

D. Discussió General

D. Discussió general

La MGS presenta un complex mecanisme de regulació de la seva activitat, així com una distribució subcel·lular regulada, que el converteixen en un objecte d'estudi molt interessant. En els primers treballs sobre la MGS es descobrí l'efecte activador de la Glc 6-P. Molt aviat, s'observà com la insulina era capaç de modificar la sensibilitat de l'enzim per Glc 6-P i això conduí al concepte de l'existència de dues formes intercanviables (a semblança del que ja es coneixia per a la glicogen fosforilasa). Tot seguit es demostrà que l'activitat de l'enzim resultava modificada per fosforilació, fent de la MGS el tercer exemple d'enzim regulat per fosforilació covalent i el primer que es fosforilava de forma múltiple i s'inactivava per aquesta modificació. Més recentment diferents estudis del nostre laboratori inclosos els que presenten en aquesta tesi doctoral han posat de manifest la distribució subcel·lular regulada de l'enzim entre el nucli i el citoplasma. Aquest nou aspecte podria ésser un nou mecanisme de control afegit als ja existents per a la MGS.

La MGS és un enzim del metabolisme de carbohidrats, per a que hauria desenvolupat aquestes funcions i mecanismes de regulació tant complexos? Si comparem les GS de mamífers i les d'altres animals com els artròpodes o els nematodes, no apareixen diferències significatives. Existeix un tant per cent de similitud entre la HsMGS i la GS de *Drosophila melanogaster* superior al 60%. Així doncs, aquesta regulació podria trobar-se també en la resta d'animals. Al comparar les glicogen sintases amb les glicogen (midó) sintases s'ha mostrat que probablement l'aparició de la regulació per fosforilació es produí per l'adquisició de diferents fragments de seqüència, absents en les G(M)S. Probablement aquestes insercions i d'altres petits canvis en la protèina també hagin donat lloc a la localització regulada de la MGS. Cal tenir en compte que la GS de llevat és molt semblant a la de mamífers, però es desconex si la GS de fongs transloca. La translocació nucleocitoplasmàtica podria haver-se adquirit abans de la separació dels regnes animal i fúngic, durant l'evolució dels eucariotes.

A diferència de molts bacteris i arqueobacteris, tots els eucariotes (exceptuant les plantes) són dependents de la metabolització de la glucosa exògena. Per tant la concentració de glicogen representaria un factor de viabilitat important. Per tal de controlar-la s'usaria la GS com a sensor en les cèl·lules eucariotes. Apareix una modificació però amb l'adveniment de la diferenciació tissular dels organismes pluricel·lulars. El fetge és un exemple clar. La funció del fetge és la d'acumular o degradar el glicogen en funció de les necessitats de la resta de l'organisme i per tant no té sentit aquesta "vigilància" de la concentració de glicogen intracel·lular. Ens els hepatòcits, per

tant la LGS hauria perdut aquesta capacitat sensora i probablement per aquesta causa l'enzim no es dirigeix al nucli.

Contràriament a la regulació covalent, el mecanisme catalític de la MGS sembla conservar-se a través de moltes proteïnes de funció similar, les G(M)S i d'altres glicosiltransferases com les de les famílies 4 i 15. De forma similar a les glicosilhidrolases amb retenció de la configuració del centre anomèric del residu glicosil, la HsMGS usaria un mecanisme de doble desplaçament que involucraria dos aminoàcids àcids. El Glu 510 de la HsMGS correspondria al primer aminoàcid, que realitzaria les funcions de nucleòfil sobre l'enllaç fosfoèster, mentre que el segon glutàmic Glu 518 podria funcionar bé com a àcid-base o com a assistent en la catàlisi. A més del mecanisme de catàlisi, l'estructura tridimensional de moltes glicosiltransferases podrien ésser molt similars tal i com ho mostren els estudis de predicció d'estructura secundària. Resta però una descripció detallada de l'estructura terciària de les GS i les G(M)S per confirmar aquesta última hipòtesi.

L'anàlisi de les seqüències de G(M)S disponibles ha permès, endemés, trobar un candidat molt adequat per a endegar la complexa tasca de la resolució de l'estructura tridimensional. Es tracta de la G(M)S de *Pyrococcus abyssi* que mostra una relació filogenètica pròxima a les GS i a més prové d'un organisme hipertermofílic, que permetria un protocol de purificació més senzill en un sistema d'expressió heteròleg. La seva mida reduïda contindria l'estructura bàsica dels enzims de síntesi del $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucà i probablement respondria a algunes de les preguntes formulades per a les GS d'organismes superiors com la HsMGS.

La localització nuclear regulada de la MGS revela una nova faceta d'un vell enzim. Aquest descobriment coincideix amb l'abandonament del punt de vista que situava els enzims citoplasmàtics distribuïts de forma uniforme tot esperant els seus substrats. La descripció i anàlisi de les localitzacions subcel·lulars dels enzims és doncs un dels temes que han promogut i promouen un canvi en la forma en que s'aborda l'estudi del metabolisme.

Quin és el sentit de transportar dins el nucli i de forma activa un enzim d'activitat altament regulada, tant al·lostèricament com per fosforilació, amb la despesa energètica que això suposa? Els resultats d'aquesta tesi doctoral mostren que la translocació de la MGS cap al nucli depèn de la degradació del glicogen i que, en canvi, és independent del tipus cel·lular i de senyals hormonals. El transport nucleocitoplasmàtic és doncs, una propietat intrínseca d'aquest enzim. Cal tenir en compte la simultaneïtat de la inactivació per fosforilació i la translocació nuclear. Ambdues ocorren en situacions de privació de glucosa. És aleshores quan s'inicia la degradació del glicogen per part de la GP.

Així doncs, el transport nuclear podria considerar-se una forma d'evitar el cicle fútil en el citoplasma. Malgrat la senzillesa d'aquesta hipòtesi, la inactivació covalent seria suficient per acomplir aquesta funció i per tant el més probable és que existeixen d'altres avantatges o funcions resultants de la translocació.

A la vista dels resultats obtinguts també poden esclarir-se fenòmens observats amb anterioritat. Durant els anys 70-80 era la síntesi de glicogen nuclear. Diferents estudis mostraren la presència de glicogen nuclear en diferents línies cel·lulars derivades de tumors [Karasaki, 1971; Zimmermann et al., 1976; Granzow et al., 1981]. Degut a l'elevada mida del glicogen, aquest no podria fabricar-se en el citoplasma i després importar-se al nucli, sino que caldria que fos sintetitzat directament en el seu interior. Alguns autors discutiren la certesa d'aquests resultats argumentant la possibilitat de que es tractés d'un artefacte a l'hora de realitzar les preparacions microscòpiques [Oron et al., 1980]. Finalment, les observacions inicials es confirmaren però el tema fou deixat de banda [Kopun et al., 1982]. Un cop establerta la presència de la MGS en l'interior del nucli aquells resultats obtinguts amb les línies tumorals poden explicar-se de forma alternativa: la formació de glicogen nuclear seria el resultat d'una alteració en el control la distribució subcel·lular de la MGS que resultaria amb la seva presència en l'interior del nucli amb presència de glucosa. Les línies cel·lulars usades sofririen d'una desregulació en els mecanismes d'import o d'export de l'enzim i l'acumulació resultant en l'interior del nucli provocaria la formació del glicogen intranuclear. Existeixen però diverses incògnites sobre de la formació d'aquest glicogen. En primer lloc cal un encebador per a la síntesi. Podria tractar-se d'una petita molècula de glicogen que fos capaç d'entrar al nucli travessant els porus nuclears per difusió passiva, o bé que la glicogenina 1 també fos capaç d'introduir-se en el nucli. El pes molecular de la GGN1 és una mica superior del límit d'exclusió acceptat. Endemés s'ha descrit la presència de glicogenina 1 en el nucli de cèl·lules de la retina en pollaste [Miozzo et al., 1996]. Per a l'enzim ramificant no ha estat descrit una localització nuclear, però sorprenentment al analitzar el grau de ramificació del glicogen nuclear, aquest era més elevat [Kopun et al., 1989]. Tantmateix, els nostres resultats usant diferents models i condicions metabòliques indiquen que no se sintetitza glicogen en l'interior del nucli cel·lular. D'altres laboratoris mostraren, usant extractes d'oòcits de *Xenopus*, la necessitat de la presència de glicogen per tal de condensar la cromatina i formar el nucli [Hartl et al., 1994]. Tot i això, no seria necessària una GS nuclear ja que en aquesta fase, l'oòcit no presenta embolcall nuclear.

Una altra possibilitat que justificaria la presència de la MGS en l'interior del nucli passaria per afavorir el contacte entre la MGS i alguna proteïna fosfatasa encarregada d'activar-la. En llevats ha estat demostrada la interacció

entre Pho85 i la GS. Tot i que no s'ha provat que aquesta interacció tingui lloc en nucli, el fet que Pho85 estigui implicada en la regulació de cicle cel·lular, mitjançant la desfosforilació de diferents ciclins, podria fer pensar que la desfosforilació de la sintasa també tingués lloc en l'interior del nucli [Wilson et al., 2002]. En el cas de les glicogen sintases musculars de mamífers es podria donar un fenomen similar. Per una banda la subunitat reguladora G_M/R_{G1} s'uneix al reticle endoplasmàtic a la vegada que al glicogen. La sortida de l'enzim des del nucli el situa directament al voltant de l'embolcall nuclear, extensió natural del reticle i per tant molt proper al seu punt de desfosforilació. Existeixen estudis que demostren que l'activació de la MGS després d'una depleció severa de glicogen té una fase ràpida i independent de glucosa 6-fosfat, seguida d'una altra ja dependent de glucosa 6-fosfat i més lenta [Montell et al., 1999]. Aquesta primera fase d'activació és molt dependent de les reserves de glicogen presents abans de la depleció del polisacàrid. Si es té amb compte que a major depleció de glicogen major és el grau de translocació nuclear de la MGS en el nucli, apareix una certa relació entre el fenomen de l'activació inicial i la distribució nuclear. Així doncs podria ocórrer que la MGS fos activada més eficientment en l'inici de la recuperació després de l'exercici per la seva localització perinuclear.

Una de les hipòtesis més interessants és però la possibilitat que la MGS en l'interior del nucli realitzi una funció no directament relacionada amb la síntesi de glicogen. Existeixen diferents evidències i arguments a favor. Primer de tot, l'agregació nuclear. Si l'acumulació dins el nucli fos exclusivament una forma de compartimentalització, bé per allunyar l'enzim del citoplasma o per tal de dirigir-lo cap al reticle en el moment que calgués per tal d'activar-lo, no seria necessària la formació d'agrupacions compactes, tal i com ocorre per a la MGS. En el cas de la glucoquinasa, per exemple, la unió a la seva proteïna reguladora es dona arreu del nucleoplasma sense cap agregació clara. Un altre argument a favor és la desorganització d'aquestes agrupacions amb el tractament amb actinomicina D. De forma similar a les proteïnes que intervenen bé en transcripció o bé en la modificació del RNA, la MGS canvia la seva localització subnuclear al inhibir la transcripció. A més a més, l'enzim col·localitza en certes ocasions amb p80-coilina i a més es produeix una disminució de la detecció de la proteïna PML, que es troba en els cossos PML, fet que suggereix una interacció entre aquestes proteïnes i la MGS. Així doncs, la MGS és dins al nucli de forma estructurada, i aquesta estructura està relacionada amb diferents subdominis funcionals del nucli.

Quina funció podria realitzar la MGS? El que sembla més probable és que senyalitzi l'escassetat de glicogen mitjançant la seva presència a l'interior del nucli. Actuari de sensor de les reserves de glucosa de la cèl·lula per a que la cèl·lula actui en conseqüència. La MGS podria modular la transcripció o la maduració d'RNA, molt probablement de forma indirecta ja que l'anàlisi de la

seva estructura primària no mostra contenir regions clares d'unió a DNA o RNA.

La depleció del glicogen cel·lular provoca la translocació de l'enzim a l'interior del nucli. Seria possible, doncs, que la MGS senyalitzés el decrement de reserves de glicogen mitjançant la interacció amb la maquinària de transcripció o de maduració del RNA. La MGS nuclear podria ésser un senyal per tal d'adaptar la cèl·lula a una situació de gran despesa energètica. Una de les possibilitats passaria per la inducció de l'expressió del propi enzim. La cèl·lula augmentaria els nivells de MGS per tal d'acumular més glicogen quan la situació es normalitzés i alhora també expressaria uns majors nivells de GP per degradar-lo. Existeixen evidències a favor d'aquesta hipòtesi. Per exemple, quan se sobreexpressa GP es produeix al seu torn un augment en l'expressió de MGS [Baqué et al., 1996]. Aquest fenomen podria explicar-se de la forma següent: l'augment de l'enzim degradatiu provocaria una disminució significativa del contingut en glicogen produint-se un augment en la translocació de la MGS i aquesta al seu torn provocaria un augment en els nivells cel·lulars de MGS. També augmenta la concentració de GP en la sobreexpressió de la GS en models transgènics [Aspiazu i Lawrence, 2000; Lawrence et al., 1997]. En alguns dels experiments presentats en aquesta tesi es mostra com una sobreexpressió de la GFP-HsMGS indueix un augment en la HsMGS endògena. Apareix doncs un model de reforçament de la maquinària de síntesi i degradació del glicogen en resposta a l'exercici continuat, que explicaria els nivells basals incrementats en alguns individus sotmesos a esforços físics [St-Onge et al., 2001]. Aquest augment sembla dependre del processament de l'RNA missatger de la MGS ja que la mutació en el polimorfisme XbaI provoca la falta d'aquesta resposta, i tenint en compte que aquest polimorfisme es troba en un intró, el més probable és que es doni aquest fenomen a través d'una optimització de la maduració del pre-mRNA o bé de la seva estabilització.

Una altra possibilitat es que la senyalització sigui dirigida al medi extern, és a dir, que una situació local, la depleció de glicogen en una o varies miofibres provoqui una resposta sistèmica. En aquest cas la presència de la MGS en el nucli induiria una resposta hormonal per tal de que l'organisme actués a favor de l'aportació de glucosa en el múscul. En aquesta línia trobem per exemple els treballs de Nauffer i Pedersen [Keller et al., 2001; Steensberg et al., 2001] en que es descriu la inducció de l'expressió interleucina-6 (IL-6) en múscul esquelètic sotmès a exercici. La magnitud d'aquesta inducció depèn de la concentració prèvia de glicogen. Tot i que els autors no descriuen quin és el lligam que existeix entre la concentració de glicogen inicial i la secreció de IL-6 per part del múscul, demostren una relació inversa entre la quantitat de IL-6 excretada i la concentració de glicogen prèvia a l'exercici. Els resultats d'aquesta tesi indiquen que seria possible que aquesta inducció tingués lloc

gràcies a la translocació de la MGS ja que també presenta aquesta relació negativa amb el glicogen. Un cop dins el nucli la MGS provocaria la transcripció de la IL-6 [Keller et al., 2001; Steensberg et al., 2001] i aquesta al ésser excretada provocaria l'augment de la producció hepàtica de glucosa [Blumberg et al., 1995]. De fet no es coneix cap hormona que senyalitzi l'esforç contràctil del múscul i que provoqui l'augment de glucosa en sang necessari per compensar-lo. Resten doncs, moltes incògnites per resoldre tant a nivell molecular com cel·lular al voltant del metabolisme del glicogen i més específicament sobre la MGS.

E. Conclusions

E. Conclusions

Les glicogen (midó) sintases i les glicogen sintases catalitzen ambdues la síntesi de $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucà i comparteixen característiques similars així com zones d'estructura secundària predita homòlogues. Per tant podrien incloure's en una mateixa "superfamília".

Les glicogen (midó) sintases d'arqueobacteris són filogenèticament properes a les glicogen sintases de fongs i mamífers. A més d'ésser similars a nivell de seqüència i estructura secundària predita presenten una especificitat de substrat semblant i una mida més reduïda. Per tant són bons models per a estudiar a nivell estructural tant les glicogen sintases com les glicogen (midó) sintases.

El residu Glu-510 de la HsMGS és essencial per a la catàlisi i el Glu-518 hi juga un paper important però secundari. Proposem que els equivalents d'aquests residus en les glicosiltransferases de les famílies 4, 5, i 15 també són fonamentals en el mecanisme de catàlisi.

La glicogen sintasa muscular de mamífers presenta una localització subcel·lular regulada entre el nucli i el citoplasma. Aquesta translocació no és exclusiva de l'enzim humà ni de les cèl·lules de tipus muscular ja que també es presenta la línia cel·lular 3T3-L1, un model d'adipòcits de ratolí. Ni la sobreexpressió ni la fusió de l'enzim a GFP alteren aquesta distribució regulada. Endemés quan se sobreexpressa la glicogen sintasa muscular en cèl·lules que no la expressen també es manté la distribució regulada.

La glucosa 6-fosfat juga un paper estimulador en l'export des del nucli de la HsMGS. L'augment de la concentració de glucosa 6-fosfat és necessària per afavorir la seva localització correcta a l'hora de sintetitzar glicogen, per tal de proporcionar el substrat i per activar a la glicogen sintasa.

La concentració de la HsMGS en el nucli es produeix en resposta a la depleció del glicogen intracel·lular. El glicogen realitzaria una funció de retenció de la proteïna en el citoplasma impedit-ne la seva translocació al nucli.

Dins del nucli la HsMGS forma agregacions esfèriques que es distribueixen pel nucleoplasma. Aquestes agrupacions col·localitzen amb p80-coilina i PML.

La capacitat de l'enzim de catalitzar la síntesi de l' $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucà no és necessària per al control de la localització subcel·lular, ja que el mutant Glu-

510 (catalíticament incapaç) es distribueix en la cèl·lula de la mateixa forma que l'enzim salvatge.

La fosforilació i desfosforilació dels llocs descrits que controlen l'activitat de la HsMGS no regulen la distribució subcel·lular d'aquest enzim. Malgrat això, existeixen certes evidències que d'altres residus no identificats es fosforilen, i tenint en compte que el transport nucleocitoplasmàtic es regula molt freqüentment mitjançant fosforilació-desfosforilació, seria possible que aquests nous llocs controlessin en alguna mesura la translocació de la HsMGS.

L'export nuclear de la HsMGS està mediat per la via clàssica d'export, que és leptomicina B sensible.

F. Materials i Mètodes

F. Materials i Mètodes

F.1. Tècniques estàndard de Biologia Molecular

F.1.1. PCR

La reacció en cadena de la polimerasa (PCR) ha estat utilitzada per a amplificar fragments de DNA a partir de plasmidis que ja inclou en el cDNA d'interès, o bé, a partir de DNA genòmic.

La PCR o reacció en cadena de la polimerasa [Saiki et al., 1988] consisteix en la utilització d'una DNA polimerasa que, en ser termoestable, pot portar a terme cicles successius de síntesi de DNA, tot suportant les elevades temperatures necessàries tant per a la separació de les cadenes del DNA, com per a la hibridació dels oligonucleòtids, o encebadors, a les cadenes complementàries del DNA. En aquest treball s'ha utilitzat sempre la Pfu Dna polimerasa (Stratagene), ja que, tot i que és menys processiva, amb la Taq DNA polimerasa es va detectar una freqüència d'errors força elevada.

Per dur a terme aquesta reacció, es necessiten, a més del DNA motlle i de l'enzim, un tampó adequat que sol contenir magnesi, dNTPs i dos oligonucleòtids, un directe i l'altre revers, que flanquegen la regió del DNA que es vol amplificar i que enceben la reacció de síntesi de DNA. La barreja de dNTPs ha de ser equimolar en els 4 nucleòtids, per tal de reduir la taxa d'error de la DNA polimerasa.

La seqüència dels encebadors emprats depèn de les regions que envolten el fragment que es vol amplificar. De manera general, els primers han de ser el més específics possible, han de tenir entre 18 i 25 nucleòtids, han de presentar un mínim del 50% de residus G i C i no han de formar dímers o estructures secundàries.

F.1.2. Electroforesi de DNA

La separació de les molècules de DNA en funció de la mida s'ha dut a terme per electroforesi en gels d'agarosa, seguint la metodologia descrita per Sambrook i col·laboradors [Sambrook et al., 1989].

S'han fet servir com a marcadors els fragments de DNA obtinguts per digestió del bacteriòfag λ , amb els enzims de restricció EcoRI i HindIII (I/EcoRI-HindIII, Promega G1731). Aquests marcadors de DNA presenten mides d'entre 21000 i 125 bp.

El tampó de càrrega de les mostres conté glicerol i un colorant, el blau de bromofenol. La seva finalitat és, d'una banda, donar densitat a les mostres i facilitar-ne la càrrega als pous del gel (glicerol) i, d'una altra, permetre el seguiment del procés electroforètic (colorant). L'electroforesi té lloc a 60-80 V a temperatura ambient. El DNA pot ser visualitzat a l'UV, gràcies a la presència de bromur d'etidi en el gel.

Gel d'electroforesi de DNA

TAE	1X
agarosa	0,8-1,5% (p/v)
bromur d'etidi	0,5 µg/ml

Es dissol completament l'agarosa en la solució de TAE 1X escalfant al microones, es deixa refredar 3-4 min i s'hi afegeix el bromur d'etidi abans d'abocar la barreja al portagels de la cubeta d'electroforesi.

TAE 50X

Tris-HCl	2 M
Na ₂ EDTA.2H ₂ O	100 mM

Es prepara dissolent en H₂O, 242 g de Tris base i 37,2 g de Na₂EDTA-2H₂O. S'hi afegeixen 57,1 ml d'àcid acètic glacial. S'ajusta el pH a 8, s'enrasa el volum a 1 litre i s'autoclava.

Tampó d'electroforesi de DNA: TAE 1X

Bromur d'etidi

Es prepara a una concentració de 2 mg/ml i es guarda en un envàs opac, protegit de la llum. S'ha de manipular amb molta precaució perquè és una substància carcinògena.

Tampó de càrrega de mostres de DNA (6X)

glicerol	30%
blau de bromofenol	0,25%

Aquest tampó s'afegeix en una proporció de 1:5 (v/v) a les mostres de DNA.

F.1.3. Clonatge

El clonatge implica diverses etapes destinades a preparar la lligació de les molècules de DNA. De manera general, les reaccions de digestió, i obtenció de fragments de DNA amb extrems roms s'han dut a terme seguint la metodologia descrita per Sambrook i col·laboradors [Sambrook et al., 1989].

Les lligacions entre inserts de DNA i plasmidis s'han dut a terme mitjançant l'enzim T₄ DNA lligasa (Rapid Ligation Kit, Roche) amb quantitats totals de 10-500 ng de DNA. Les reaccions han tingut lloc sempre en presència d'un excès de molècules d'insert en relació a les de plasmidi (relació 3:1 generalment).

Les lligacions s'han dut a terme a temperatura ambient durant 1 hora en el cas de fragments cohesius, o bé durant 2-3 hores, quan els fragments presenten extrems roms.

En el cas que, per l'estratègia de clonatge, s'ha necessitat la conversió dels extrems d'un fragment de DNA digerit de cohesius a roms, aquest ha estat incubat a 37°C durant 30 min amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa I d'E. coli.

Per clonar els fragments de DNA que provenien de PCR s'ha utilitzat el kit comercial Sure Clone Rapid Ligation Kit (Pharmacia), en el qual es lliga el vector pUC18 digerit amb SmaI i defosforilat amb els productes de PCR amb extrems roms (per a la clonació de la HsMGS amb la seqüència Kozac, (cap 3) o bé el vector pEGFPCR que es digerit amb SmaI i lligat alhora amb quantitats variables d'insert (clonació del cDNA de la glicogen midó sintasa de *P. abysii*, (cap. 1).

Per quantificar el DNA, s'ha de tenir en compte que 1 unitat d'absorbància a 260 nm, mesurada en cubeta de quars de 1000 µl, equival a una concentració de DNA de 44 µg/ml:

$$[\text{DNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = A_{260\text{nm}} \times 44 \times 1 / V_{\text{mostra}}(\mu\text{l})$$

Alternativament, es pot efectuar la quantificació del DNA lineal per electroforesi d'un determinat volum d'aquest DNA, juntament amb uns marcadors que inclouen diferents fragments amb quantitats conegudes de DNA. La concentració problema es determina comparativament, il·luminant amb radiació UV.

F.1.4. Transformació de cèl·lules competents

La transformació és una tècnica per la qual s'introdueix DNA exogen, generalment el plasmidi que conté el DNA en estudi, en cèl·lules procariotes. La tècnica de transformació pot efectuar-se seguint diferents mètodes basats en una alteració transitòria de la permeabilitat de la membrana de les cèl·lules competents, per tal de facilitar-ne l'entrada de DNA. Les transformacions s'han efectuat pel mètode del xoc tèrmic (Sambrook et al., 1989).

Protocol de transformació per xoc tèrmic

Es descongela en gel una alíquota (50 µl) de cèl·lules competents. Es barregen les cèl·lules i el DNA plasmídic en una proporció no major respecte al DNA de 10:1 (v/v) i mantenir la barreja 10 min en gel. S'incuba 90 segons a 42°C. Es manté la barreja 2-3 min en gel. S'afegeix 300-600 µl de medi LB autoclavat i s'incuba 1h, en agitació, a 37°C. Durant aquest interval, les cèl·lules transformades tenen temps de sintetitzar les proteïnes de resistència a antibiòtics codificades pel plasmidi.

S'estenen 200 µl de la suspensió de cèl·lules transformades sobre les plaques de LB-agar que incorporen l'antibiòtic corresponent i s'incuben posteriorment a 37°C, durant 12-18 hores (si excedim el temps d'incubació, poden créixer colònies satèl·lit al voltant de les bacteries resistents a causa de la destrucció de l'antibiòtic en aquella zona).

En aquest estudi s'han emprat cèl·lules E. coli DH5a. Els plasmidis emprats generen resistència a ampicil·lina (pUC18, pACCMV.pL.pA, pGFPCR) o a kanamicina (pEGFP).

El plasmidi pUC18 presenta les dianes de clonatge interrompent el gen lac-Z, de manera que permet la selecció per color de les colònies positives a partir de plaques d'LB-agar amb IPTG i X-gal. Si s'ha introduït un insert en la regió de clonatge que interromp el gen lac-Z, les colònies seran blanques, mentre que si no contenen cap insert, les colònies tindran el gen lac-Z sencer la qual cosa els donarà un color blau. De vegades, el color blau no s'aprecia massa bé i pot donar lloc a la identificació de falsos positius. Si es deixen les plaques unes hores a 4°C, s'intensifica el color blau de les colònies negatives.

Medi LB

triptona	1%
llevats	0,5%
NaCl	1%

Els 3 components es dissolen en H₂O mQ. S'ajusta el pH a 7 amb NaOH i s'autoclava. S'hi afegeix ampil·lina o kanamicina a una concentració final de 100 µg/ml abans d'inocular la corresponent colònia resistent.

Ampil·lina i kanamicina

Es prepara un estoc a 100 mg/ml (1000 X) i es conserva aliquidada i congelada a -20°C.

Plaques d'LB-agar

triptona	1%
llevats	0,5%
NaCl	1%
agar	1,5%

Es pesen la triptona, els llevats i el NaCl i es dissolen en H₂O mQ. S'ajusta el pH a 7 amb NaOH, s'hi afegeix l'agar i s'autoclava. Un cop autoclavat, es deixa refredar el medi fins a 50°C i es preparen les plaques a la campana; quan les plaques estan solidificades, es mantenen una nit de cap per avall en una estufa a 37°C, per comprovar que no estan contaminades. Després, es guarden a 4°C fins a ser utilitzades.

Plaques d'LB-agar amb antibiòtics

Es preparen com les plaques d'LB-agar, però se'ls afegeix l'antibiòtic a la concentració adequada quan la temperatura del medi autoclavat ha disminuït a 50°C per no destruir l'antibiòtic. En aquest treball s'han usat els antibiòtics ampil·lina i kanamicina. Per a la selecció per expressió del gen lac-Z, es fan servir les següents concentracions:

100 µg/ml ampil·lina
40 µg IPTG
8 µg/ml X-gal

IPTG

Es prepara a una concentració de 100 mM i es guarda aliquidat i protegit de la llum a -20°C.

X-Gal

Es prepara a una concentració de 50 mg/ml en DMF (dimetilfluorur) i es conserva a -20°C aliquidat.

F.1.5. Obtenció de DNA plasmídic

Existeixen diversos protocols per aïllar plasmidis de cultius bacterians. Aquests mètodes es basen en una lisi inicial de la paret cel·lular, seguida d'una etapa que permet purificar el DNA per precipitació o bé utilitzant alguna tècnica de tipus cromatogràfic (mitjançant columnes o resines disponibles comercialment). En els experiments descrits en aquesta memòria s'han utilitzat dues vies d'obtenció de DNA plasmídic, que es diferencien pel volum del cultiu de partida: lisi alcalina en el cas de cultius petits (2 ml) o maxipreps en el cas de cultius grans (200 ml).

Mètode de lisi alcalina (Miniprep)

Aquest mètode es basa en una lisi inicial de les parets cel·lulars bacterianes en medi bàsic, seguida d'una precipitació del DNA. El DNA obtingut sol ser poc pur, i és per això que aquest mètode solament s'ha utilitzat per aïllar DNA plasmídic provinent de colònies bacterianes transformades amb el producte de lligació. Aquest DNA s'ha utilitzat per a comprovar que la lligació havia funcionat mitjançant la seva anàlisi per restricció o per amplificació per PCR.

Es passa a un microtub 1 ml del cultiu (que prèviament ha d'haver estat creixent a 37°C en agitació constant, durant 8-15 hores). La resta del cultiu (1 ml) es desa a 4°C. Tot seguit se centrifuga el cultiu a 10000 xg durant 30 segons, per sedimentar els bacteris i s'aspira el sobrenadant. Es resuspén el precipitat de bacteris en 100 µl de TE. Es deixa 5 min a temperatura ambient. Aleshores s'afegeixen 200 µl de la solució de lisi (SDS/NaOH). S'inverteix el tub suaument 3 o 4 vegades i es deixa 5 min a temperatura ambient. Passat aquest temps s'afegeixen 150 µl de solució d'acetat potàssic i de nou s'inverteix suaument 3 o 4 vegades per després deixar 5 min precipitant en gel. Tot seguit se centrifuga el tub a 10000 xg, durant 5 min i el sobrenadant es recull en un microtub net on s'afegeixen 900 µl d'etanol i es manté la mescla 5 min a temperatura ambient. Per tal d'eliminar el sobrenadant se centrifuga 5 min a 10000 xg i el precipitat es renta amb 1 ml d'etanol al 70%. Finalment es torna a centrifugar durant 5 min i s'elimina el sobrenadant. El pellet de DNA plasmídic es deixa assecar a l'aire i es resuspén en 20 µl de la solució d'RNAsa A en TE pH 8 (50 µg/ml).

TE

Tris HCl pH8	25 mM
EDTA pH8	10 mM

Solució de lisi

NaOH	0,2 M
SDS	1 %

Es prepara en el moment de fer-la servir

Solució d'acetat potàssic

Acetat potàssic	3 M
Àcid acètic glacial	5 M

Un cop realitzades les digestions o les PCR del DNA ã llat per tal d'identificar la colònia positiva, es fa servir la resta del cultiu bacterià que s'havia guardat a 4°C per a inocular uns 200 ml de medi LB fresc. El cultiu es deixa créixer en agitació a 37°C unes 16h, i seguidament es fa una maxiprep.

Maxiprep

S'ha fet servir aquest protocol per obtenir quantitats importants de plasmidi (100-500 µg). El plasmidi purificat obtingut és d'alta puresa i es pot utilitzar tant en reaccions de restricció, lligació, etc. com per seqüenciar o transfectar. El fonament del mètode és una lisi alcalina del cultiu cel·lular, seguida d'una purificació mitjançant cromatografia d'intercanvi iònic en columna (QIAGENPlasmid Maxi prep o Concert High Purity Plasmid Maxiprep System).

Abans de començar l'ã llament del DNA, s'ha guardat un petit volum del cultiu bacterià (1 ml) amb el qual s'ha preparat un estoc de cèl·lules afegint-hi un volum de glicerol al 50% estèril per tal que quedi a una concentració final del 15%. Aquest estoc es manté congelat a -80°C i servirà per a créixer més cultiu bacterià sense necessitat de transformar.

Els plasmidis finals han estat finalment dissolts en Tris-HCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, pH 8.0.

F.1.6. Mutagènesi dirigida

S'ha usat el QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene), que es basa en una amplificació per PCR del vector que es desitja mutar amb dos encebadors complementaris que introdueixen les mutacions.

F.1.7. Seqüenciació de DNA

Totes les construccions obtingudes en aquest estudi han estat seqüenciades per tal de descartar errors de PCR. La seqüenciació del DNA plasmídic dels vectors obtinguts en aquest treball s'ha dut a terme de manera automatitzada als Serveis Científico-Tècnics (SCT) de la Universitat de Barcelona.

S'ha utilitzat l'ABI-PRISM DNA sequencing kit (Amersham). El protocol es basa en dur a terme una reacció de PCR a partir del DNA que es vol seqüenciar, en presència de ddNTP marcats, cada un d'ells, amb un indicador fluorescent de longitud d'ona diferent. De manera general, la hibridació en les reaccions de PCR per seqüenciar s'ha efectuat a 47°C.

La reacció de seqüenciació es realitza en presència d'oli mineral, que pot dificultar la recuperació del volum sencer de la reacció de seqüenciació. Per recuperar les cadenes sintetitzades és convenient pipetejar tot el contingut del microtub (oli i medi aquós) i dipositar-lo sobre un tall de parafilm. A continuació, s'ha de fer rrelliscar inclinant el parafilm fins que l'oli se separi completament de la barreja de seqüenciació. Un cop separada la fase aquosa de l'oli, les cadenes sintetitzades són precipitades, rentades i assecades segons el protocol indicat pel proveïdor del kit.

Posteriorment, aquestes cadenes són analitzades per electroforesi en un sistema acoblat a un fluorímetre. Aquesta última part és la que es duu a terme al servei de seqüenciació dels SCT amb el seqüenciador ABI-PRISM 377 automatic DNA sequencer (Applied Biosystems).

F.2. Mutants de la Hs MGS

S'han construït els diversos plasmidis que codifiquen per a mutants de la HsMGS unida a GFP, tant per deleció com per mutagènesi dirigida o en combinació.

F.2.1. Mutants creats per mutagènesi dirigida

S'utilitzà en tots els casos com a motlle el plasmidi pEGFP-HsMGS que es descriu a Ferrer et al i que codifica per a la HsMGS unida en fase per l'extrem amino a la GFP. A continuació es detallen els noms dels mutants, l'oligonucleòtid sense (el complementari invers corresponia a l'antisense) i la diana de restricció que introduïa o destruïa si era el cas.

E510A: CCTCCTACTATGCGCCATGGGGCTACAC +NcoI
 E518A: CACACCGGCTGCATGCACGGTTATG +SphI
 SalI: CGGTATCTACATTGTGCGACCGGCGGTTCC +SalI
 NES-1: CGATGTCAAGCGCGCCGGGTGCAGAGGACTGGG –HindIII
 NES-2: CGTCTTTCTGGAGGCAGCTGCTCGGGCTAACTATCTGC +PvuII
 NES-3: CCTGACCACCGCACGTGCGAGCAGGCCTCTTCAATAGC +StuI
 NLS-1: CGAGGGCCCCAGATATTGTGACCCC +NruI
 22a: CCGCACTTTAGCGATGTCAGCCTTGCCGGGCC –ClaI –HindIII
 3abc: CCACGGCCAGCCGCGGTGCCACCGGCCCCCTCGCTGG
 CACGACTCC +SacII
 45: CACGACTCGGCGCCGCACCAGGTGCGAGGACGAGGAGG +NarI
 1a: CCGCGCCGAGCGGCATGCACCTCCTCCACC +SphI
 1b: GCAAGCGCAACGCTGTGACACGGCCACC +SalI
 R1: TCAGCAGAGCGCGGCGCAGGCTATCATCCAGC
 R2: TATCATCCAGGCGAACGCCACGGAGGCCCTCTCCGACC

F.2.2. Mutants per deleció

De forma resumida es detallen les estratègies de clonatge dels diferents mutants de deleció.

Mut2: pTAC²-HsMGS (NdeI/Klenow/SalI), el fragment que contenia el cDNA de l'enzim es lligà a pEGFP-C1 (BglII/Klenow/SalI)
 Sal tail i – Sal tail: pEGFP-HsMGS (SalI), el fragment de la cua es lligà amb pEGFP-C1 (SalI) (mutant Sal tail) i la resta es relligà (-Sal tail).
 t1 i – t1: pEGFP-HsMGS (KpnI), el fragment de la cua es lligà amb pEGFP-C1 (KpnI) (mutant t1) i la resta es relligà (-t1).
 t2 i – t2: pEGFP-HsMGS (BamHI), el fragment de la cua es lligà amb pEGFP-C1 (BamHI) (mutant t2) i la resta es relligà (-t2).
 t3: pEGFP-HsMGS (HindIII), el fragment de la cua es lligà amb pEGFP-C1 (HindIII).
 MGS-RLGS: pEGFP-RLGS (SalI), el fragment de la cua carboxil es lligà al vector pEGFP-HsMGS-Sal (creat per mutagènesi i digerit amb SalI) un cop eliminat el fragment carboxil de l'enzim muscular.

F.3. Preparació d'adenovirus recombinants

El cDNA de la enhanced GFP s'obtingué per digestió del plasmidi pEGFP-C2 (Clontech) amb els enzims de restricció Eco47III i BamHI. Aleshores fou clonat en l'interior del plasmidi pACCMV.pLpA prèviament tallat en el lloc de clonatge múltiple (EcoRI, tractament amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa, BamHI). El clonatge del cDNA de la GFP-HsMGS fou molt similar al

de la GFP. El plasmidi pEGFP-HsMGS fou digerit amb NheI, tractat amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa i el fragment que contenia el cDNA d'interès tornat a tallar amb l'enzim SalI. Es purificà aquest fragment i s'introduí mitjançant lligació en el plasmidi pACCMV.pLpA previament tallat en el lloc de clonatge múltiple (EcoRI, tractament amb el fragment Klenow de la DNA polimerasa, SalI). , el cDNA de la HsMGS clonat en el plasmidi pTAC² (cedit pel Dr. Fletterick) no la posseïx i per tal de proporcionar-li'n una es decidí amplificar el cDNA usant com a encebador un oligonucleòtid que la contingues, HMGS-KOZAC: TATTCTAGACGCCACCATGCCTCTGAACCGCACTTTATCCATGTCAAGCTTGCCGGG i un antisense HMGS-DN: TATTCTAGAGCAGAGAGGCAGGACAGGCGGGG, ambós oligonucleòtids contenien la diana XbaI. Així doncs s'amplificà el cDNA de la HsMGS per PCR i el producte resultant fou clonat en el plasmidi pUC18. Se seleccionaren els clons positius, s'amplificà el plasmidi i es digerí amb XbaI al igual que el plasmidi pACCMV.pLpA on fou finalment clonat. En aquest cas se seqüencià completament la zona codificant per a la HsMGS per tal de descartar possibles errors introduïts per la polimerasa.

F. 4. Anàlisi i obtenció de seqüències

Les diferents seqüències s'obtingueren dels servidors en xarxa ExpAsy (www.expasy.ch) o NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov). Els números d'accés (SWISS-PROT, TrEMBL o NCBI) de les proteïnes estudiades s'inclouen en les figures anteriors. Les eines BLAST i ψ -BLAST [Altschul et al., 1990; Altschul et al., 1997] s'utilitzaren en xarxa mitjançant el servidor del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>). Els alineaments múltiples i els arbres filogenètics es realitzaren localment utilitzant ClustalW [Thompson et al., 1994][Saitou i Nei, 1997]. Els diagrames HCA [Lemesle-Varloot et al., 1990] s'obtingueren mitjançant el servidor DrawHCA (<http://smi.snv.jussieu.fr/hca/hca-form.html>). Les prediccions d'estructura secundària es realitzaren en el servidor Jpred² [Cuff i Burton 1999] (<http://jura.ebi.ac.uk:8888/>). La classificació de les glicosiltransferases de Campbell i col. [Campbell et al. 1997; Campbell et al. 1998] també es accessible en xarxa (<http://afmb.cnrs-mrs.fr/CAZY/index.html>).

F.5. Cultiu cel·lular

F.5.1. Cultiu primari de múscul humà

La tècnica emprada per a aïllar les cèl·lules satèl·lit de múscul humà i desenvolupar-ne el cultiu primari es descriuen per Askanas i Engel [Askanas i Engel, 1975; Askanas i Gallez-Hawkins, 1985]. Els mioblasts que permeteren l'establiment dels cultius s'aïllaren a partir de biòpsies humanes de múscul

esquelètic de pacients sense cap malaltia (Hospital de Sant Pau i de la Santa Creu; Hospital Clínic i Provincial de Barcelona).

F.5.2. Cultiu cel·lular de línies estables

Les cèl·lules COS-1, FTO2B, L6, C₂C₁₂ i 293 han estat crescudes i mantingudes en medi DMEM amb glucosa 25 mM, FBS 10%, i penicil·lina/streptomicina (100 U/ml / 0.1 mg/ml). En el cas de les cèl·lules C₂C₁₂ la diferenciació a miotub es realitzà substituïnt el 10 % de FBS per un 10 % de sèrum de cavall adult.

La línia cel·lular 3T3-L1 és un model cel·lular d'adipòcits (teixit adipós). Aquest clon cel·lular va ser aïllat per Green i Meuth (1974) dels ratolins albins Swiss (ATCC, CL-173). El medi emprat per al creixement d'aquestes cèl·lules fou DMEM (Gibco) amb 25 mM glucosa, suplementat amb un 10% de BCS inactivat (Biological Industries, Israel), Hepes 25mM i antibiòtics (medi de manteniment). En aquest medi es creixeren i subcultivaren les cèl·lules no diferenciades, a una confluència sempre menor al 80%. Per diferenciar les cèl·lules confluents al fenotip d'adipòcit es va seguir el mètode de [Rubin et al., 1978]. Durant tres dies eren incubades amb medi DMEM que contenia a més un 10% FBS, 0.25mM dexametasona, 0.1M isobuti-metilxantina (IBMX) i 5mg/ml d'insulina. Després eren incubades tres dies més amb el medi suplementat només amb insulina, i finalment les cèl·lules eren incubades només amb el medi estàndard. La diferenciació es considerà completa als 5-7 dies.

F.6. Transducció de cèl·lules eucariotes

F.6.1. Co-precipitació del DNA amb fosfat càlcic

El mètode de transfecció amb fosfat càlcic fou usat per primera vegada per Graham i Van der Eb (1973). Es basa en la barreja del DNA en un tampó de fosfats amb CaCl₂, de manera que es formen complexos de DNA i fosfat càlcic que precipiten sobre la monocapa cel·lular, adherint-se a la membrana cel·lular i penetrant al citoplasma per endocitosi.

El seu principal problema és baixa reproduïbilitat a causa de la variabilitat en la mida i forma dels complexos DNA-fosfat càlcic.

En aquest estudi solament s'ha utilitzat per a la co-transfecció de cèl·lules 293 en la construcció d'adenovirus recombinants.

F.6.2. Transfecció mitjançant dendrímers activats

Les cèl·lules han d'estar a una confluència del 60-80 % en plaques de 35 mm. Preferentment, han d'haver estat plaquejades el dia anterior ja que com més vell és el cultiu, pitjor és l'eficiència de transfecció.

El Superfect Transfection Reagent és un reactiu format per dendrímers activats, unes molècules esfèriques altament ramificades, les branques de les quals acaben en grups amino carregats. Aquests grups són els que interaccionen amb el DNA formant unes estructures compactes, amb el DNA enrotllat al voltant dels dendrímers, que són incorporades per la cèl·lula mitjançant endocitosis. Aquest reactiu s'ha utilitzat per a les transfeccions de les línies cel·lulars estables, que presenten una eficiència de transfecció molt més elevada que els cultius primaris (30-60 %).

Les cèl·lules han estat transfectades seguint el protocol de la casa comercial. En general, s'ha usat una de 2.5-3 µg de Superfect Transfection Reagent.

Aleshores les cèl·lules han estat incubades en el medi de transfecció durant 2h, rentades amb PBS i incubades en DMEM en presència de FBS 10 %, el qual afavoreix l'expressió del cDNA transfectat. Al cap de 24h, se'ls ha canviat el medi a una concentració de glucosa i d'hormones adequades a l'experiment, que s'ha dut a terme al cap de 36-48h després de la transfecció.

F.6.3. Transfecció mitjançant DEAE-dextrà

De forma equivalent a l'ús de dendrímers activats el DEAE-dextrà forma complexos amb el DNA plasmídic que són introduïts a l'interior de la cèl·lula per endocitosis. Es preparen les cèl·lules per transfectar a una confluència entre el 60 i el 80 %. El dia després de la tripsinització es renten i s'incuben amb una solució que conté, medi sense FBS ni antibiòtics, el DNA plasmídic a transferir a una concentració de 2 µg/ml, 125 µg/ml de DEAE-dextrà i 0.1 mM de cloroquina. La cloroquina produeix un augment del pH dels endosomes aturant-ne la seva fusió amb els lisosomes i permetent que el DNA incorporat no es degradi.

La durada de les incubacions depèn de les cèl·lules usades, per al cas de les COS-1 normalment es mantingueren amb aquesta solució durant 3 hores. Tot seguit se sotmeten a un xoc amb DMEM 10% FBS 10% DMSO durant 2min, es renten amb medi DMEM 10% FBS i es mantingueren en aquest mateix medi 24 h. Després el medi se substitueix per l'adequat en cada experiment i aquest es realitza entre les 36 i les 48 hores post-transfecció.

F.6.4. Infecció de cèl·lules en cultiu amb adenovirus recombinants

Abans de procedir a la infecció, s'han preparat les solucions infectives mitjançant la dilució dels estocs d'adenovirus en medi DMEM (glucosa 25 mM sense FBS) per tal d'aconseguir la multiplicitat d'infecció o moi (multiplicity of infection) adequada. La moi es defineix com el nombre d'unitats formadores de calves (pfu, plaque forming units) que hi ha per cèl·lula. A partir d'una moi de 5, s'assegura gairebé un 100 % d'eficiència d'infecció en cèl·lules en cultiu primari com els miotubs. És per això que en la majoria d'estudis es feu servir una moi d'entre 5 i 10.

Les cèl·lules a infectar han estat rentades amb PBS i, seguidament, tractades durant 1.5-2h amb 1ml (plaques de 60 mm de diàmetre) o 0.5 ml (plaques de 35 mm de diàmetre) de solució infectiva. Passat aquest temps se'ls ha retirat el medi d'infecció, s'ha rentat la monocapa cel·lular amb PBS i s'hi ha afegit medi fresc amb diferents concentracions de glucosa, drogues o hormones segons l'experiment. Abans de realitzar l'experiment, s'han deixat transcórrer entre dos i quatre dies per a permetre l'expressió de la proteïna recombinant.

F.7. Condicions experimentals

En general, i amb alguna petita variació, el protocol experimental seguit en els experiments de localització subcel·lular ha estat el següent:

En el dia previ a l'experiment, les cèl·lules han estat rentades amb PBS i incubades en medi DMEM sense glucosa durant unes 16 hores (controls), seguida d'una incubació de 6 hores amb medi DMEM amb glucosa a concentració elevada (25 ò 30 mM) o sense.

En acabar les incubacions, les cèl·lules han estat rentades 2 vegades amb PBS, fixades durant 20 min en paraformaldehid al 4 % (p/v) en PBS o bé amb metanol i rentades 2 vegades amb PBS.

Les diferents drogues utilitzades han estat, forskolina 100 μ M, leptomicina B 100 nM, actinomicina D 10 μ g/ml, isoproterenol 100 μ M i cicloheximida 2 μ M.

F.8. Determinació de metabòlits i activitats enzimàtiques

F.8.1. Glicogen

Els nivells de glicogen es determinaren a partir de cèl·lules congelades en N₂ líquid. Les mostres s'homogenitzaren en fred amb 100-200 µl de KOH al 30 % (p/v), i foren escalfats fins a 100 °C durant 15 minuts. L'homogenizat resultant fou finalment centrifugat a 5000 xg durant 15 minuts a 4 °C, i amb el sobrenedant obtingut es procedí a la determinació de glicogen.

El polisacàrid es va determinar seguint la tècnica descrita per Chan i Exton [Chan i Exton, 1976] basada en la utilització de l'enzim amiloglucosidasa. Els resultats s'expressaren com a mg glucosa/mg de proteïna.

F.8.2. Determinació de l'activitat glicogen sintasa

Les cèl·lules se separaren del seu suport mitjançant una rasqueta en la presència d'entre 100 i 200 µl d'un tampó Tris/HCl 10 mM a pH 7.0, KF 150 mM, EDTA 15 mM, sacarosa 600 mM, β-mercaptoetanol 50 mM i els inhibidors de proteases: leupeptina 10 µg/ml, benzamidina 1mM i PMSF 1mM.

L'activitat d'aquest enzim fou determinada mitjançant la mesura de la incorporació d'UDP-[¹⁴C]-glucosa a glicogen, seguint en línies generals la tècnica descrita per Thomas i col·laboradors [Thomas et al., 1968]. Aquesta radioactivitat es mesurava en un comptador de cintil·lació líquida (LKB 1217 RACKBETA, Wallac, USA). Els resultats de l'activitat total d'aquest enzim s'expressaren en mU/mg proteïna.

Per a mesurar l'estat d'activació de la sintasa s'obtingué fent servir la relació d'activitats sense i amb glucosa 6-fosfat descrita per Thomas i col·laboradors [Thomas et al., 1968]. Aquesta relació s'obté pel quocient de les dues activitats enzimàtiques mesurades sense glucosa 6-fosfat i a una concentració de 10.8 mM. El procediment per l'obtenció de l'activitat fou el mateix que l'utilitzat per la mesura de l'activitat total.

F.8.3. Valoració de la concentració de proteïnes pel mètode de Bradford

S'ha emprat el mètode de Bradford, basat en el canvi de color del blau brillant de Comassie en resposta a diferents concentracions de proteïna [Bradford, 1976]. En una solució àcida, el blau brillant de Comassie, quan es lliga a proteïnes, canvia el màxim d'absorbència de 465 nm a 595 nm.

F.9. Tècnica de Western Blot

F.9.1. Electroforesi

L'electroforesi discontinua en gel de poliacrilamida amb SDS (SDS-PAGE) és un dels mètodes més emprats per separar barreges de proteïnes en funció dels seus pesos moleculars. La tècnica fou descrita per Laemmli (1970). Aquesta tècnica es basa en utilitzar dos tipus de gels, amb diferent pH i concentració d'acrilamida: el gel concentrador de porus grans (stacking) a la part superior, i el gel separador (running) a la part inferior. Aquestes diferències fan que les mostres s'acumulin en estretes bandes abans de produir-se la separació durant la migració de les proteïnes en el gel separador.

L'electroforesi s'ha dut a terme en gels de poliacrilamida i SDS, de 10 x 8 cm de grandària i de 0.75 mm de gruix, emprant l'aparell d'electroforesi miniprotean (Bio-Rad). S'han utilitzat gels del 10 % d'acrilamida (p/v).

Un cop homogenitzades i centrifugades, les diferents fraccions s'han dil·luides en tampó de càrrega, la composició final del qual és: Tris/HCl 50 mM a pH 6.8, DTT 10 mM, 2% (p/v) SDS, 2-mercaptoetanol 4% (v/v) (redueix els ponts disulfur), glicerol 10% (v/v) (augmenta la densitat), blau de bromofenol 0.1% (p/v) (colorant). Seguidament, s'han incubat durant 3-10 min (depenent del volum de mostra) a 100°C, per desnaturalitzar les proteïnes.

El tampó d'electroforesi usat ha estat Tris/HCl 25 mM, glicina 192 mM, SDS 0.1%, pH 8.3. L'electroforesi s'ha dut a terme a un voltatge fix de 200V i una intensitat variable d'uns 80-30 mA, durant 45 min aproximadament.

F.9.2. Transferència

La transferència de proteïnes separades en l'electroforesi implica el traspàs i la immobilització d'aquestes sobre una membrana sintètica. En el nostre cas, s'han transferit les proteïnes electroforèticament a un suport de nitrocel·lulosa a partir del gel de poliacrilamida descrit en 10.1, de forma que la resolució de les bandes de proteïnes obtinguda durant l'electroforesi no s'ha perdut ni en la transferència ni en etapes posteriors.

La tècnica emprada fou descrita per Gershoni i Palade [Gershoni i Palade, 1983]. S'ha utilitzat el sistema de transferència líquida (Bio-Rad). El tampó de transferència ha estat format per Tris/HCl 20mM, glicina 150mM i metanol al 20%(v/v), pH 8.3. La transferència s'ha dut a terme a un voltatge fix de 100V i una intensitat variable d'uns 300-350 mA, durant 30 min.

S'ha submergit la membrana en una solució de vermell Poinceau 0.2% en àcid tricloroacètic al 3%. S'ha utilitzat aquesta tinció per comprovar l'eficiència de la transferència i la relació aproximada entre les quantitats de proteïnes carregades a cada carril. S'ha eliminat l'excés de colorant amb aigua per visualitzar les bandes proteiques, i s'ha rentat amb PBS (tampó salí amb fosfats, fosfat de sodi 10 mM, pH 7.4, i NaCl 140 mM) i detergent Tween-20 0.05% (v/v) per eliminar completament la tinció. En aquest punt, la membrana de nitrocel·lulosa ja es pot usar per detectar l'antigen d'interès.

F.9.3. Immunoblot

Consta de quatre etapes: a) bloqueig de la membrana, b) incubació amb anticòs primari, c) incubació amb un anticòs secundari i d) detecció de les proteïnes d'interès.

a) Bloqueig de la membrana: s'ha incubat la membrana amb una solució de PBS, BSA (albúmina de sèrum boví) al 3% (p/v) i 0.05% (v/v) Tween-20. En aquest pas, les zones vacants de la membrana de nitrocel·lulosa són ocupades per la BSA, d'aquesta forma s'evita la unió inespecífica de l'anticòs al suport. La durada del bloqueig ha oscil·lat de 30 min a 1 hora a temperatura ambient, o tota la nit a 4°C amb agitació.

b) Incubació de l'anticòs primari: la incubació s'ha fet amb la dilució adient del sèrum immune que responia a la nostra proteïna d'interès en la solució de bloqueig. El temps d'incubació ha estat d'una hora i mitja a temperatura ambient, tot i que es pot perllongar tota la nit a 4°C. Passat aquest temps, s'ha rentat la membrana amb PBS i Tween-20 0.05% (v/v) tres vegades i durant aproximadament 10 min, per eliminar l'excés d'anticòs.

c) Incubació de l'anticòs secundari: la naturalesa de l'anticòs secundari s'ha escollit en funció de l'anticòs primari emprat. Els anticòs secundaris reconeixen la cadena pesada de les immunoglobulines i duen associada una activitat enzimàtica per poder ser detectats. En el nostre cas s'ha tractat d'anti-IgGs associats a peroxidasa (Amersham i Dako). La dilució en la solució de bloqueig depèn del secundari escollit (α rabbit 1/5000 i α sheep 1/2000 (v/v)). El temps d'incubació ha estat d'una hora. Posteriorment s'ha rentat de la mateixa manera que en l'apartat anterior.

d) Detecció: els anticòs secundaris emprats estaven conjugats directament a la peroxidasa de rave (horseradish peroxidase, HRP). Així doncs, el mètode de detecció s'ha basat en una reacció quimioluminiscent molt activada, en la que l'enzim acoblat catalitza l'oxidació de luminol, provocant una emissió de llum a una longitud d'ona de 428nm, que pot ser detectada

mitjançant contacte amb una pel·lícula fotogràfica. S'ha incubat la membrana durant 5 min amb la solució que contenia els substrats de la reacció quimioluminiscent (ECL Plus, Amersham) i s'ha posat a contactar amb una pel·lícula fotogràfica. Després d'una exposició d'interval variable, s'ha procedit al revelat. L'avantatge del mètode usat ha estat la facilitat per obtenir diferents exposicions de forma ràpida.

F.10. Electroforesi bidimensional

El mètode d'electroforesi en dues dimensions utilitza dues electroforesis independents, la primera és un isoelectroenfocament que separa les proteïnes pel seu punt isoelèctric i la segona és una SDS-PAGE corrent que destria principalment segons el pes molecular.

Per a l'isoelectroenfocament, s'usà el sistema PROTEAN II xi 2-D (BioRad). Dins dels capil·lars d'1.5 mm es polimeritzà la següent mescla:

Gel d'isoelectroenfocament

4.12g urea
0.975 ml acrilamida 30%
1.5 ml Nonidet P-40 10%
1.5ml H₂O
200 µl amfòlits pH: 5-7
100 µl amfòlits pH: 3.5-10
15 µl Persulfat d'amoni
10 µl TEMED

Un cop polimeritzada la mescla es col·locaren en l'aparell i un cop situats es diposità la mostra en la part superior del capil·lar. Tot seguit s'afegiren 10 µl de solució de lisi i 10 µl més de solució de coberta.

Solució de lisi

29.42 g urea
10 ml Nonidet P-40 10%
1ml amfòlits pH: 7-9
0.771 g DTT
H₂O fins a 50 ml

Solució de coberta

12.012 g urea
0.25 ml amfòlits pH: 7-9

Materials i Mètodes

12.5 ml Nonidet P-40 10%
0.366 g DTT
H₂O fins a 25 ml

Un cop tancat l'aparell es col·locà en la cambra superior NaOH 20 mM i en l'inferior H₃PO₄ 10 mM. Aleshores se sotmeteren les mostres a diferents voltatges: 15 min a 100 V, 1 hora a 200 V, 1 hora a 300 V i finalment 3 hores a 400 V. S'extragueren els gels de l'interior dels capil·lars i s'equilibraren amb n tampó d'equilibri durant uns 15 min.

Tampó d'equilibri

15 ml Tris-HCl 1 M pH: 6.8
50 ml SDS 10%
3.86g DTT
25 ml glicerol
H₂O fins a 250 ml

La segona electroforesi es realitza col·locant el gel capil·lar al damunt d'un gel separador de SDS-PAGE. Al damunt s'afegeix una solució d'agarosa que permet a més crear un pou per tal de carregar els marcadors pretenyits.

Solució d'agarosa

6 ml Tris-HCl 1 M pH: 6.8
20 ml SDS 10%
1.55 g DTT
10 ml glicerol
1 g agarosa
0.5 mg blau de bromofenol
H₂O fins a 100 ml

A partir d'aquí el procediment seguit fou el mateix per a la tècnica de Western, detallada en l'apartat anterior.

F.11. Immunoprecipitació

Es pot dividir el procediment experimental en: lisi de les cèl·lules per alliberar l'antigen, formació del complex anticòs-antigen, purificació i anàlisi del complex immune.

a) Lisi de les cèl·lules per alliberar l'antigen. Per establir les condicions òptimes de la immunoprecipitació cal tenir en compte la naturalesa del tampó

de lisi per alliberar el màxim antígen possible, ja que s'immunoprecipita a partir de la fracció soluble.

b) Formació del complex anticòs-antigen: els criteris per optimitzar aquesta fase de la immunoprecipitació es basen en la quantitat d'anticòs afegida, el volum final i l'afinitat de l'anticòs per l'antigen.

S'han utilitzat 10 μ l de l'anticòs corresponent. S'ha incubat durant una hora i mitja a temperatura ambient amb agitació constant.

c) Purificació del complex immune: Kessler [Kessler, 1975] va proposar utilitzar la protèina A, provinent de la paret cel·lular del bacteri *S.aureus*, com a suport. La protèina A s'uneix al domini F_c de l'anticòs, sense interferir en la unió d'aquest últim a l'antigen. La protèina A, al seu torn, es troba unida a sefarosa, facilitant la purificació per centrifugació. La solució estoc de protèina A s'ha preparat afegint 2 ml de PBS-azida sòdica 0.01% (p/v) a 250 mg de protèina A-sefarosa CL-4B. S'han afegit 20 μ l de la suspensió de protèina A-sefarosa a la mescla de reacció de l'apartat anterior i s'ha incubat durant 30 min agitant a temperatura ambient. A continuació, s'ha centrifugat a 10000xg durant 5 min. En aquest punt, es disposava de la fracció soluble que contenia els components no immunoprecipitats i un sediment que corresponia a l'immunoprecipitat. Aquest últim s'ha rentat tres vegades amb el mateix tampó d'immunoprecipitació. Per últim, s'ha centrifugat a 10000xg durant 5 min i s'ha eliminat tot el sobrenedant, resuspenent el sediment de la immunoprecipitació en 50-150 μ l de tampó d'immunoprecipitació, depenent de la proporció de protèina d'interès en el lisat total.

d) Anàlisi del complex immune purificat: s'ha dut a terme mitjançant l'estudi per gel de poliacrilamida-SDS amb posterior immunoblot (apartat 10.3). Per saber si el sèrum immunoprecipitava, s'han analitzat els sobrenedants que contenien les protèines no immunoprecipitades. Si el sèrum és bo, s'ha d'observar la desaparició de senyal en el sobrenedant obtingut després d'immunoprecipitar, la qual cosa es tradueix en l'aparició de resposta en l'immunoprecipitat.

F.12. Immunofluorescències

F.12.1. Protocol estàndard

Les cèl·lules crescudes sobre cubreobjectes han estat rentades en PBS, fixades en paraformaldehid en PBS al 4% durant 20 min, i rentades altra vegada en PBS.

Posteriorment, han estat incubades amb NaBH₄ (1mg/ml) durant 10 min., permeabilitzades amb Tritó X-100 en PBS al 0.2% (v/v) durant 10 min i bloquejades amb BSA al 3% (p/v) en PBS i Tritó-X100 0.2% 10 min més.

S'han incubat amb l'anticòs primari durat 45 min. a temperatura ambient. S'han rentat en PBS i s'han incubat 30 min. amb l'anticòs secundari conjugat als fluoròfors isotiocianat de fluorescència (FITC), Texas red i/o isotiocianat de tetrametilrodamina (TRITC) segons el cas.

Finalment, han estat rentades en PBS, aigua i etanol, assecades a l'aire i muntades en portaobjectes de vidre amb medi de muntatge (Immunofluore Mounting Medium, ICN).

Per tal d'examinar l'autofluorescència de cada tipus cel·lular i per determinar l'especificitat dels anticossos primaris, s'han dut a terme controls mitjançant la incubació de les cèl·lules fixades amb l'anticòs secundari solament.

Per a la tinció nuclear en vermell, els cubres s'han tractat amb RNAsa A (lliure de DNAsa) 1 µg/ml en PBS durant 30 min després de la permeabilització, i amb iodur de propidi 0.2 µg/ml durant els últims 10 min de la incubació amb l'anticòs secundari.

F.12.2. Protocol optimitzat

És equivalent a l'enterior però la fixació es realitza amb metanol purr a -20°C durant 15 min. No es realitza el pas amb NaBH₄ i la permeabilització es manté durant 30 min.

F.12.3. Anticossos

A part de l'anticòs MGS3 s'han utilitzat diferents anticossos comercials i cedits:

- MGS Lawrence: cedit pel Dr. Lawrence (pollastre)
- αglicogen: cedit pel Dr. Baba (IgM monoclonal)
- αactina: Sigma (monoclonal)
- αcentromer: Binding Site (humà)
- αSm: Binding Site (humà)
- αp80-coilina (R228): cedit pel Dr. Chan (monoclonal)
- αPML (5E10): cedit pel Dr. Stuurman (monoclonal)

α fosfotreonina i α fosfoserina: Zymed (conill)
 α fosfotirosina: Zymed (còctel de monoclonals)
 α GFP: Clontech (conill)

F.13. Microscòpia confocal

Les imatges confocals fluorescents han estat obtingudes amb un làser d'escaneig per a microscòpia confocal Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) adaptat a un microscopi invertit Leitz DMIRBE amb un objectiu Plan-Apo 63 x (NA 1.4 oil) de Leitz. La font de llum provenia d'un làser de kriptó/argó de 75 mW. La fluorescència verda (que provenia de la GFP o dels anticossos secundaris conjugats a FITC) i la fluorescència vermella (que provenia dels anticossos secundaris conjugats a Texas Red o del iodur de propidi) han estat obtingudes amb el làser a 488 i 568 nm, respectivament. Les seccions òptiques obtingudes han estat d'aproximadament 0.5 μ m en tots els casos.

G. Bibliografia

G. Bibliografia

Abdian, P. L., Lellouch, A. C., Gautier, C., Ielpi, L., Geremia, R. A. 2000. Identification of essential amino acids in the bacterial alpha -mannosyltransferase aceA. *J Biol Chem* 275:40568-75.

Agius, L., Stubbs, M. 2000. Investigation of the mechanism by which glucose analogues cause translocation of glucokinase in hepatocytes: evidence for two glucose binding sites. *Biochem J* 346 Pt 2:413-21.

Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., et al. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-402

Aoki, H., Shiroza, T., Hayakawa, M., Sato, S., Kuramitsu, H. K. 1986. Cloning of a *Streptococcus mutans* glucosyltransferase gene coding for insoluble glucan synthesis. *Infect Immun* 53:587-94.

Armstrong, C. G., Browne, G. J., Cohen, P., Cohen, P. T. 1997. PPP1R6, a novel member of the family of glycogen-targetting subunits of protein phosphatase 1. *FEBS Lett* 418:210-4.

Askanas, V., Engel, W. K. 1975. A technique of fiber selection from human muscle tissue cultures for histochemical-electronmicroscopic studies. *J Histochem Cytochem* 23:144-6.

Askanas, V., Gallez-Hawkins, G. 1985. Synergistic influence of polypeptide growth factors on cultured human muscle. *Arch Neurol* 42:749-52.

Azpiazu, I., Manchester, J., Skurat, A. V., Roach, P. J., Lawrence, J. C., Jr. 2000. Control of glycogen synthesis is shared between glucose transport and glycogen synthase in skeletal muscle fibers. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 278:E234-43.

Baba, O. 1993. [Production of monoclonal antibody that recognizes glycogen and its application for immunohistochemistry]. *Kokubyo Gakkai Zasshi* 60:264-87

Bai, G., Zhang, Z. J., Werner, R., Nuttall, F. Q., Tan, A. W., Lee, E. Y. 1990. The primary structure of rat liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. Absence of phosphorylation sites 1a and 1b. *J Biol Chem* 265:7843-8

- Bak, J. F., Moller, N., Schmitz, O., Saaek, A., Pedersen, O. 1992. In vivo insulin action and muscle glycogen synthase activity in type 2 (non-insulin-dependent) diabetes mellitus: effects of diet treatment. *Diabetologia* 35:777-84
- Ball, S., Guan, H. P., James, M., Myers, A., Keeling, P., et al. 1996. From glycogen to amylopectin: a model for the biogenesis of the plant starch granule. *Cell* 86:349-52.
- Bao, Y., Yang, B. Z., Dawson, T. L., Jr., Chen, Y. T. 1997. Isolation and nucleotide sequence of human liver glycogen debranching enzyme mRNA: identification of multiple tissue-specific isoforms. *Gene* 197:389-98.
- Baqué, S., Guinovart, J. J., Gómez-Foix, A. M. 1996. Overexpression of muscle glycogen phosphorylase in cultured human muscle fibers causes increased glucose consumption and nonoxidative disposal. *J Biol Chem* 271:2594-8.
- Baqué, S., Montell, E., Camps, M., Guinovart, J. J., Zorzano, A., Gómez-Foix, A. M. 1998a. Overexpression of glycogen phosphorylase increases GLUT4 expression and glucose transport in cultured skeletal human muscle. *Diabetes* 47:1185-92.
- Baqué, S., Montell, E., Guinovart, J. J., Newgard, C. B., Gómez-Foix, A. M. 1998b. Expression of glucokinase in cultured human muscle cells confers insulin-independent and glucose concentration-dependent increases in glucose disposal and storage. *Diabetes* 47:1392-8.
- Berkner, K. L. 1992. Expression of heterologous sequences in adenoviral vectors. *Curr Top Microbiol Immunol* 158:39-66.
- Berkner, K. L., Schaffhausen, B. S., Roberts, T. M., Sharp, P. A. 1987. Abundant expression of polyomavirus middle T antigen and dihydrofolate reductase in an adenovirus recombinant. *J Virol* 61:1213-20.
- Birnbaum, M. J. 1992. The insulin-sensitive glucose transporter. *Int Rev Cytol* 137:239-97.
- Blumberg, D., Hochwald, S., Brennan, M. F., Burt, M. 1995. Interleukin-6 stimulates gluconeogenesis in primary cultures of rat hepatocytes. *Metabolism* 44:145-6.
- Bosco, D., Meda, P., Iynedjian, P. B. 2000. Glucokinase and glucokinase regulatory protein: mutual dependence for nuclear localization. *Biochem J* 348 Pt 1:215-22.

- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-54
- Brown, K. S., Kalinowski, S. S., Megill, J. R., Durham, S. K., Mookhtiar, K. A. 1997. Glucokinase regulatory protein may interact with glucokinase in the hepatocyte nucleus. *Diabetes* 46:179-86.
- Browner, M. F., Nakano, K., Bang, A. G., Fletterick, R. J. 1989. Human muscle glycogen synthase cDNA sequence: a negatively charged protein with an asymmetric charge distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:1443-7
- Buleon, A., Colonna, P., Planchot, V., Ball, S. 1998. Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* 23:85-112.
- Bult, C. J., White, O., Olsen, G. J., Zhou, L., Fleischmann, R. D., et al. 1996. Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. *Science* 273:1058-73.
- Calder, P. C. 1991. Glycogen structure and biogenesis. *Int J Biochem* 23:1335-52.
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., Henrissat, B. 1997. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 326:929-39
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., Henrissat, B. 1998. A classification of nucleotide-diphospho-sugar glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities. *Biochem J* 329:719
- Cao, Y., Mahrenholz, A. M., DePaoli-Roach, A. A., Roach, P. J. 1993. Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function. *J Biol Chem* 268:14687-93
- Cárdenas, M. L. 1995. Glucokinase: its regulation and role in liver metabolism Austin: R. G. Landes Company
- Cardona, S., Remonsellez, F., Guiliani, N., Jerez, C. A. 2001. The Glycogen-Bound Polyphosphate Kinase from *Sulfolobus acidocaldarius* Is Actually a Glycogen Synthase. *Appl Environ Microbiol* 67:4773-80.
- Carling, D., Hardie, D. G. 1989. The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase and phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1012:81-86

Carmo-Fonseca, M., Mendes-Soares, L., Campos, I. 2000. To be or not to be in the nucleolus. *Nat Cell Biol* 2:E107-12.

Caudwell, F. B., Cohen, P. 1980. Purification and subunit structure of glycogen-branching enzyme from rabbit skeletal muscle. *Eur J Biochem* 109:391-394

Chan, T. M., Exton, J. H. 1976. A rapid method for the determination of glycogen content and radioactivity in small quantities of tissue or isolated hepatocytes. *Anal Biochem* 71:96-105

Charnock, S. J., Davies, G. J. 1999. Structure of the nucleotide-diphospho-sugar transferase, SpsA from *Bacillus subtilis*, in native and nucleotide-complexed forms. *Biochemistry* 38:6380-5

Cid, E., Gomis, R. R., Geremia, R. A., Guinovart, J. J., Ferrer, J. C. 2000. Identification of two essential glutamic acid residues in glycogen synthase. *J Biol Chem* 275:33614-21.

Coderre, L., Kandror, K. V., Vallega, G., Pilch, P. F. 1995. Identification and characterization of an exercise-sensitive pool of glucose transporters in skeletal muscle. *J Biol Chem* 270:27584-8.

Cohen, P. 1986. Muscle glycogen synthase. A *The Enzymes*, ed. P. D. Boyer, E. G. Krebs. pp. 3rd. Vol. 17A. Orlando: Academic Press

Cohen, P., Hardie, D. G. 1991. The actions of cyclic AMP on biosynthetic processes are mediated by cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochim Biophys Acta* 1094:292-292

Coulary, B., Aigle, M., Schaeffer, J. 2001. Evidence for glycogen structures associated with plasma membrane invaginations as visualized by freeze-substitution and the Thiery reaction in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Electron Microsc (Tokyo)* 50:133-7.

Cross, D. A., Alessi, D. R., Cohen, P., Andjelkovich, M., Hemmings, B. A. 1995. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 by insulin mediated by insulin mediated by protein kinase B. *Nature* 378:785-789

Crouvoisier, M., Mengin-Lecreulx, D., van Heijenoort, J. 1999. UDP-N-acetylglucosamine:N-acetylmuramoyl-(pentapeptide) pyrophosphoryl undecaprenol N-acetylglucosamine transferase from *Escherichia coli*: overproduction, solubilization, and purification. *FEBS Lett* 449:289-92.

- Cuff, J. A., Barton, G. J. 1999. Evaluation and improvement of multiple sequence methods for protein secondary structure prediction. *Proteins* 34:508-19
- Dallner, G., Ernster, L. 1968. Subfractionation and composition of microsomal membranes: a review. *J Histochem Cytochem* 16:611-32.
- Davies, G., Sinnott, M. L., S.G., W. 1998. *Glycosyl Transfer* New York: Academic. 119-208 pp.
- de la Iglesia, N., Veiga-da-Cunha, M., Van Schaftingen, E., Guinovart, J. J., Ferrer, J. C. 1999. Glucokinase regulatory protein is essential for the proper subcellular localisation of liver glucokinase. *FEBS Lett* 456:332-8.
- Dela, F., Larsen, J. J., Mikines, K. J., Ploug, T., Petersen, L. N., Galbo, H. 1995. Insulin-stimulated muscle glucose clearance in patients with NIDDM. Effects of one-legged physical training. *Diabetes* 44:1010-20.
- Di Mauro, S., Trojaborg, W., Gambetti, P., Rowland, L. P. 1971. Binding of enzymes of glycogen metabolism to glycogen in skeletal muscle. *Arch Biochem Biophys* 144:413-22.
- Dundr, M., Misteli, T. 2001. Functional architecture in the cell nucleus. *Biochem J* 356:297-310.
- Elbein, S. C., Hoffman, M., Ridinger, D., Otterud, B., Leppert, M. 1994. Description of a second microsatellite marker and linkage analysis of the muscle glycogen synthase locus in familial NIDDM. *Diabetes* 43:1061-5
- Engel, W. K. 1961. Cytological localization of glycogen in cultured skeletal muscle. *J Histochem Cytochem* 9:38-43
- Farkas, I., Hardy, T. A., DePaoli-Roach, A. A., Roach, P. J. 1990. Isolation of the GSY1 gene encoding yeast glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene. *J Biol Chem* 265:20879-86
- Farkas, I., Hardy, T. A., Goebel, M. G., Roach, P. J. 1991. Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled. *J Biol Chem* 266:15602-7
- Farkas, I., Toth, B., Vereb, G., Csontos, C., Gergely, P. 1988. Activation/dephosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by the catalytic subunits of protein phosphatase-1 and 2A. *Acta Biochim Biophys Hung* 23:231-46

Fernàndez-Novell, J. M., Bellido, D., Vilaró, S., Guinovart, J. J. 1997. Glucose induces the translocation of glycogen synthase to the cell cortex in rat hepatocytes. *Biochem J* 321:227-31

Fernàndez-Novell, J. M., Castel, S., Bellido, D., Ferrer, J. C., Vilaró, S., Guinovart, J. J. 1999. Intracellular distribution of hepatic glucokinase and glucokinase regulatory protein during the fasted to refed transition in rats. *FEBS Lett* 459:211-4.

Ferrer, J. C., Baqué, S., Guinovart, J. J. 1997. Muscle glycogen synthase translocates from the cell nucleus to the cytosol in response to glucose. *FEBS Lett* 415:249-52

Fiol, C. J., Mahrenholz, A. M., Wang, Y., Roeske, R. W., Roach, P. J. 1987. Formation of protein kinase recognition sites by covalent modification of the substrate. Molecular mechanism for the synergistic action of casein kinase II and glycogen synthase kinase 3. *J Biol Chem* 262:14042-8.

Francois, J., Parrou, J. L. 2001. Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Fems Microbiol Rev* 25:125-45.

Fuchs, G., Winter, H., Steiner, I., Stupperich, E. 1983. Enzymes of gluconeogenesis in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* 136:160-162

Gall, J. G. 2000. Cajal bodies: the first 100 years. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:273-300.

Gall, J. G. 2001. A role for Cajal bodies in assembly of the nuclear transcription machinery. *Febs Lett* 498:164-7.

Garcia-Rocha, M., Roca, A., De La Iglesia, N., Baba, O., Fernandez-Novell, J. M., et al. 2001. Intracellular distribution of glycogen synthase and glycogen in primary cultured rat hepatocytes. *Biochem J* 357:17-24.

Gastinel, L. N., Cambillau, C., Bourne, Y. 1999. Crystal structures of the bovine beta4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *Embo J* 18:3546-57

Geremia, R. A., Petroni, E. A., Ielpi, L., Henrissat, B. 1996. Towards a classification of glycosyltransferases based on amino acid sequence similarities: prokaryotic alpha-mannosyltransferases. *Biochem J* 318:133-8

- Geremia, R. A., Roux, M., Ferreiro, D. U., Dauphin-Dubois, R., Lellouch, A. C., Ielpi, L. 1999. Expression and biochemical characterisation of recombinant AceA, a bacterial alpha-mannosyltransferase. *Mol Gen Genet* 261:933-40
- Giovannone, B., Scaldaferrri, M. L., Federici, M., Porzio, O., Lauro, D., et al. 2000. Insulin receptor substrate (IRS) transduction system: distinct and overlapping signaling potential. *Diabetes Metab Res Rev* 16:434-41.
- Gluzman, Y., Ahrens, B. 1982. SV40 early mutants that are defective for viral DNA synthesis but competent for transformation of cultured rat and simian cells. *Virology* 123:78-92.
- Golay, A., Munger, R., Assimacopoulos-Jeannet, F., Bobbioni-Harsch, E., Habicht, F., Felber, J. P. 2002. Progressive defect of insulin action on glycogen synthase in obesity and diabetes. *Metabolism* 51:549-53.
- Gomez-Foix, A. M., Coats, W. S., Baque, S., Alam, T., Gerard, R. D., Newgard, C. B. 1992. Adenovirus-mediated transfer of the muscle glycogen phosphorylase gene into hepatocytes confers altered regulation of glycogen metabolism. *J Biol Chem* 267:25129-34.
- Gomis, R. R., Cid, E., García-Rocha, M., Ferrer, J. C., Guinovart, J. J. 2002. Liver glycogen synthase but not the muscle isoform differentiates between glucose 6-phosphate produced by glucokinase or hexokinase. *J Biol Chem* 2002
- Gomis, R. R., Ferrer, J. C., Guinovart, J. J. 2000. Shared control of hepatic glycogen synthesis by glycogen synthase and glucokinase. *Biochem J* 351:811-6.
- Gorlich, D., Kutay, U. 1999. Transport between the cell nucleus and the cytoplasm. *Annu Rev Cell Dev Biol* 15:607-60.
- Graham, F. L., Prevec, L. 1995. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol Biotechnol* 3:207-20.
- Graham, F. L., Smiley, J., Russell, W. C., Nairn, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* 36:59-74.
- Graham, F. L., van der Eb, A. J. 1973. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. *Virology* 54:536-9.

Granzow, C., Kopun, M., Zimmermann, H. P. 1981. Role of nuclear glycogen synthase and cytoplasmic UDP glucose pyrophosphorylase in the biosynthesis of nuclear glycogen in HD33 Ehrlich-Lette ascites tumor cells. *J Cell Biol* 89:475-84.

Gunja-Smith, Z., Marshall, J. J., Mercier, C., Smith, E. E., Whelan, W. J. 1970. A revision of the Meyer-Bernfeld model of glycogen and amylopectin. *FEBS Lett* 12:101-104.

Ha, S., Walker, D., Shi, Y., Walker, S. 2000. The 1.9 Å crystal structure of *Escherichia coli* MurG, a membrane-associated glycosyltransferase involved in peptidoglycan biosynthesis. *Protein Sci* 9:1045-52.

Hanashiro, I., Roach, P. J. 2002. Mutations of muscle glycogen synthase that disable activation by glucose 6-phosphate. *Arch Biochem Biophys* 397:286-92.
Hardy, T. A., Roach, P. J. 1993. Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J Biol Chem* 268:23799-805.

Hargreaves, M., Richter, E. A. 1988. Regulation of skeletal muscle glycogenolysis during exercise. *Can J Sport Sci* 13:197-203.

Hartl, P., Olson, E., Dang, T., Forbes, D. J. 1994. Nuclear assembly with lambda DNA in fractionated *Xenopus* egg extracts: an unexpected role for glycogen in formation of a higher order chromatin intermediate. *J Cell Biol* 124:235-48.

Heilmeyer, L. M. J. 1991. Molecular basis of signal integration in phosphorylase kinase. *Biochim Biophys Acta* 1094

Hiken, J. F., Lawrence, J. C., Jr. 1984. Glycogen synthase in rat adipocytes and skeletal muscle is phosphorylated on both serine and threonine. *FEBS Lett* 175:55-8.

Hood, J. K., Silver, P. A. 1999. In or out? Regulating nuclear transport. *Curr Opin Cell Biol* 11:241-7.

Horwitz, M. S. 1990. Adenoviridae and its replication. *A Virology*, ed. B. N. Fields. pp. 1679-1721. Nova York: Raven Press

Huang, X., Vaag, A., Hansson, M., Weng, J., Laurila, E., Groop, L. 2000. Impaired insulin-stimulated expression of the glycogen synthase gene in skeletal muscle of type 2 diabetic patients is acquired rather than inherited. *J Clin Endocrinol Metab* 85:1584-90.

Hubbard, M. J., Cohen, P. 1993. On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation. *Trends Biochem Sci* 18:172-7.

Igarashi, R. Y., Meyer, C. R. 2000. Cloning and sequencing of glycogen metabolism genes from *Rhodobacter sphaeroides* 2.4.1. Expression and characterization of recombinant ADP-glucose pyrophosphorylase. *Arch Biochem Biophys* 376:47-58.

Iynedjian, P. B. 1993. Mammalian glucokinase and its gene. *Biochem J* 293:1-13.

Jansen, K., Stupperich, E., Fuchs, G. 1982. Carbohydrate synthesis from acetyl CoA in the autotroph *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol* 132:355-364

Kapitonov, D., Yu, R. K. 1999. Conserved domains of glycosyltransferases. *Glycobiology* 9:961-78

Karasaki, S. 1971. Cytoplasmic and nuclear glycogen synthesis in Novikoff ascites hepatoma cells. *J Ultrastruct Res* 35:181-96.

Kaslow, H. R., Lesikar, D. D. 1984. Isozymes of glycogen synthase. *FEBS Lett* 172:294-8

Kaslow, H. R., Lesikar, D. D., Antwi, D., Tan, A. W. 1985. L-type glycogen synthase. Tissue distribution and electrophoretic mobility. *J Biol Chem* 260:9953-6

Katzen, H. M., Soderman, D. D., Wiley, C. E. 1970. Multiple forms of hexokinase. Activities associated with subcellular particulate and soluble fractions of normal and streptozotocin diabetic rat tissues. *J Biol Chem* 245:4081-96.

Kawarabayasi, Y., Hino, Y., Horikawa, H., Jin-no, K., Takahashi, M., et al. 2001. Complete genome sequence of an aerobic thermoacidophilic crenarchaeon, *Sulfolobus tokodaii* strain 7. *Dna Res* 8:123-40.

Kawarabayasi, Y., Sawada, M., Horikawa, H., Haikawa, Y., Hino, Y., et al. 1998. Complete sequence and gene organization of the genome of a hyperthermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res* 5:55-76.

Keller, C., Steensberg, A., Pilegaard, H., Osada, T., Saltin, B., et al. 2001. Transcriptional activation of the IL-6 gene in human contracting skeletal muscle: influence of muscle glycogen content. *Faseb J* 15:2748-50.

Kessel, R. G., Beams, H. W. 1990. Freeze fracture and scanning electron microscope studies on the nuclear envelope and perinuclear cytomembranes (parabasal apparatus) in the protozoan, *Lophomonas blattarum*. *J Submicrosc Cytol Pathol* 22:367-78.

Kessler, S. W. 1975. Rapid isolation of antigens from cells with a staphylococcal protein A-antibody adsorbent: parameters of the interaction of antibody-antigen complexes with protein A. *J Immunol* 115:1617-24.

Kilimann, M. W. 1990. Molecular genetics of phosphorylase kinase: cDNA cloning, chromosomal mapping and isoform structure. *J Inherited Metabolic Disease* 13:435-41

Kopun, M., Spring, H., Granzow, C. 1982. Nuclear glycogen synthase--fact or artifact? *FEBS Lett* 147:207-10.

Koshland, D. E. J. 1953. Stereochemistry and the mechanism of enzymatic reactions. *Biological Reviews* 28:416-436

Kurth-Kraczek, E. J., Hirshman, M. F., Goodyear, L. J., Winder, W. W. 1999. 5' AMP-activated protein kinase activation causes GLUT4 translocation in skeletal muscle. *Diabetes* 48:1667-71.

Lane, R. D., Hegazy, M. G., Reimann, E. M. 1989. Subcellular localization of glycogen synthase with monoclonal antibodies. *Biochem Int* 18:961-70.

Lawrence, J. C., Jr., Hiken, J. F., DePaoli-Roach, A. A., Roach, P. J. 1983. Hormonal control of glycogen synthase in rat hemidiaphragms. Effects of insulin and epinephrine on the distribution of phosphate between two cyanogen bromide fragments. *J Biol Chem* 258:10710-9

Lawrence, J. C., Jr., Skurat, A. V., Roach, P. J., Azpiazu, I., Manchester, J. 1997. Glycogen synthase: activation by insulin and effect of transgenic overexpression in skeletal muscle. *Biochem Soc Trans* 25:14-9.

Lemesle-Varloot, L., Henrissat, B., Gaboriaud, C., Bissery, V., Morgat, A., Mornon, J. P. 1990. Hydrophobic cluster analysis: procedures to derive structural and functional information from 2-D-representation of protein sequences. *Biochimie* 72:555-74

Ly, H. D., Withers, S. G. 1999. Mutagenesis of glycohydrolases. *Annual Review of Biochemistry* 68:487-522

- Madsen, B. 1986. Glycogen phosphorylase: control by phosphorylation. A The Enzymes, ed. P. D. Boyer, E. G. Krebs. pp. 366-394. Vol. 17. Orlando: Academic Press
- Mahrenholz, A. M., Wang, Y. H., Roach, P. J. 1988. Catalytic site of rabbit glycogen synthase isozymes. Identification of an active site lysine close to the amino terminus of the subunit. *J Biol Chem* 263:10561-7.
- Maitra, P. K., Bhosale, S. B., Kshirsagar, D. C., Yeole, T. Y., Shanbhag, A. N. 2001. Metabolite and enzyme profiles of glycogen metabolism in *Methanococcoides methylutens*. *Fems Microbiol Lett* 198:23-9.
- Majer, M., Mott, D. M., Mochizuki, H., Rowles, J. C., Pedersen, O., et al. 1996. Association of the glycogen synthase locus on 19q13 with NIDDM in Pima Indians. *Diabetologia* 39:314-21
- Manchester, J., Skurat, A. V., Roach, P., Hauschka, S. D., Lawrence, J. C., Jr. 1996. Increased glycogen accumulation in transgenic mice overexpressing glycogen synthase in skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:10707-11.
- McGrory, W. J., Bautista, D. S., Graham, F. L. 1988. A simple technique for the rescue of early region I mutations into infectious human adenovirus type 5. *Virology* 163:614-7.
- Melendez, R., Melendez-Hevia, E., Mas, F., Mach, J., Cascante, M. 1998. Physical constraints in the synthesis of glycogen that influence its structural homogeneity: a two-dimensional approach. *Biophys J* 75:106-14.
- Michael, W. M. 2000. Nucleocytoplasmic shuttling signals: two for the price of one. *Trends Cell Biol* 10:46-50.
- Misteli, T. 2000. Cell biology of transcription and pre-mRNA splicing: nuclear architecture meets nuclear function. *J Cell Sci* 113:1841-9
- Montell, E., Arias, A., Gomez-Foix, A. M. 1999. Glycogen depletion rather than glucose 6-P increments controls early glycogen recovery in human cultured muscle. *Am J Physiol* 276:R1489-95.
- Morera, S., Lariviere, L., Kurzeck, J., Aschke-Sonnenborn, U., Freemont, P. S., et al. 2001. High resolution crystal structures of T4 phage beta-glucosyltransferase: induced fit and effect of substrate and metal binding. *J Mol Biol* 311:569-77.
- Mu, J., Roach, P. J. 1998. Characterization of human glycogenin-2, a self-glucosylating initiator of liver glycogen metabolism. *J Biol Chem* 273:34850-6

- Mu, J., Skurat, A. V., Roach, P. J. 1997. Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *J Biol Chem* 272:27589-97
- Mukhtar, M., Stubbs, M., Agius, L. 1999. Evidence for glucose and sorbitol-induced nuclear export of glucokinase regulatory protein in hepatocytes. *FEBS Lett* 462:453-8.
- Mulichak, A. M., Losey, H. C., Walsh, C. T., Garavito, R. M. 2001. Structure of the UDP-glucosyltransferase GtfB that modifies the heptapeptide aglycone in the biosynthesis of vancomycin group antibiotics. *Structure (Camb)* 9:547-57.
- Nakayama, T., Esumi, M., Nakabayashi, H. 1994. Sequence of the 5'-flanking region of the gene encoding human muscle glycogen synthase. *Gene* 150:391-3.
- Nakielny, S., Campbell, D. G., Cohen, P. 1991. The molecular mechanism by which adrenalin inhibits glycogen synthesis. *Eur J Biochem* 199:713-22.
- Newgard, C. B., Brady, M. J., RM, O. D., Saltiel, A. R. 2000. Organizing glucose disposal: emerging roles of the glycogen targeting subunits of protein phosphatase-1. *Diabetes* 49:1967-77
- Newgard, C. B., Hwang, P. K., Fletterick, R. J. 1989. The family of glycogen phosphorylases: structure and function. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 24:69-99
- Nichols, D. J., Keeling, P. L., Spalding, M., Guan, H. 2000. Involvement of conserved aspartate and glutamate residues in the catalysis and substrate binding of maize starch synthase. *Biochemistry* 39:7820-5
- Nielsen, J. N., Derave, W., Kristiansen, S., Ralston, E., Ploug, T., Richter, E. A. 2001. Glycogen synthase localization and activity in rat skeletal muscle is strongly dependent on glycogen content. *J Physiol* 531:757-69.
- Nikoulina, S. E., Ciaraldi, T. P., Abrams-Carter, L., Mudaliar, S., Park, K. S., Henry, R. R. 1997. Regulation of glycogen synthase activity in cultured skeletal muscle cells from subjects with type II diabetes: role of chronic hyperinsulinemia and hyperglycemia. *Diabetes* 46:1017-24
- Nuttall, F. Q., Gannon, M. C., Bai, G., Lee, E. Y. 1994. Primary structure of human liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. *Arch Biochem Biophys* 311:443-9

- Olson, A. L., Pessin, J. E. 1996. Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family. *Ann Rev Nutr* 16:235-256
- Olson, M. O., Dundr, M., Szebeni, A. 2000. The nucleolus: an old factory with unexpected capabilities. *Trends Cell Biol* 10:189-96.
- Orho, M., Bosshard, N. U., Buist, N. R., Gitzelmann, R., Aynsley-Green, A., et al. 1998. Mutations in the liver glycogen synthase gene in children with hypoglycemia due to glycogen storage disease type 0. *J Clin Invest* 102:507-15
- Orho, M., Nikula-Ijas, P., Schalin-Jantti, C., Permutt, M. A., Groop, L. C. 1995. Isolation and characterization of the human muscle glycogen synthase gene. *Diabetes* 44:1099-105.
- Orho-Melander, M., Almgren, P., Kanninen, T., Forsblom, C., Groop, L. C. 1999a. A paired-sibling analysis of the XbaI polymorphism in the muscle glycogen synthase gene. *Diabetologia* 42:1138-45
- Orho-Melander, M., Shimomura, H., Sanke, T., Rasmussen, S. K., Nanjo, K., et al. 1999. Expression of naturally occurring variants in the muscle glycogen synthase gene. *Diabetes* 48:918-20.
- Oron, Y., Cardell, R., Lerner, J. 1980. Nuclear glycogen synthase--an artifact of preparation. *FEBS Lett* 118:255-8.
- Pante, N., Aebi, U. 1996. Molecular dissection of the nuclear pore complex. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 31:153-99.
- Parker, P. J., Caudwell, F. B., Cohen, P. 1983. Glycogen synthase from rabbit skeletal muscle: effect of insulin on the state of phosphorylation of the seven phosphoserine residues in vivo. *Eur J Biochem* 130:227-234
- Pastorino, J. G., Shulga, N., Hoek, J. B. 2002. Mitochondrial binding of hexokinase II inhibits Bax-induced cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 277:7610-8.
- Pederson, B. A., Cheng, C., Wilson, W. A., Roach, P. J. 2000. Regulation of glycogen synthase. Identification of residues involved in regulation by the allosteric ligand glucose-6-P and by phosphorylation. *J Biol Chem* 275:27753-61.

Pellegrini, G., Rossier, C., Magistretti, P. J., Martin, J. L. 1996. Cloning, localization and induction of mouse brain glycogen synthase. *Brain Res Mol Brain Res* 38:191-9

Petroni, E. A., Ielpi, L. 1996. Isolation and nucleotide sequence of the GDP-mannose:cellobiosyl-diphosphopolyprenol alpha-mannosyltransferase gene from *Acetobacter xylinum*. *J Bacteriol* 178:4814-21

Pitcher, J., Smythe, C., Campbell, D. G., Cohen, P. 1987. Identification of the 38-kDa subunit of rabbit skeletal muscle glycogen synthase as glycogenin. *Eur J Biochem* 169:497-502.

Preiss, J. 1996. ADPglucose pyrophosphorylase: basic science and applications in biotechnology. *Biotechnol Annu Rev* 2:259-79.

Preiss, J., Romeo, T. 1989. Physiology, biochemistry and genetics of bacterial glycogen synthesis. *Adv Microb Physiol* 30:183-238.

Preller, A., Wilson, J. E. 1992. Localization of the type III isozyme of hexokinase at the nuclear periphery. *Arch Biochem Biophys* 294:482-92.

Ragano-Caracciolo, M., Berlin, W. K., Miller, M. W., Hanover, J. A. 1998. Nuclear glycogen and glycogen synthase kinase 3. *Biochem Biophys Res Commun* 249:422-7.

Raska, I., Andrade, L. E., Ochs, R. L., Chan, E. K., Chang, C. M., et al. 1991. Immunological and ultrastructural studies of the nuclear coiled body with autoimmune antibodies. *Exp Cell Res* 195:27-37.

Rea, S., James, D. E. 1997. Moving GLUT4: the biogenesis and trafficking of GLUT4 storage vesicles. *Diabetes* 46:1667-77.

Roach, P. J. 1986. Liver glycogen synthase. A *The Enzymes*, ed. P. D. Boyer, E. G. Krebs. pp. 499-539. Vol. 17A. Orlando: Academic Press

Roach, P. J. 1990. Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation. *Faseb J* 4:2961-8

Roach, P. J., Cao, Y., Corbett, C. A., DePaoli-Roach, A. A., Farkas, I., et al. 1991. Glycogen metabolism and signal transduction in mammals and yeast. *Adv Enzyme Regul* 31:101-20

Roach, P. J., Cheng, C., Huang, D., Lin, A., Mu, J., et al. 1998. Novel aspects of the regulation of glycogen storage. *J Basic Clin Physiol Pharmacol* 9:139-51.

- Roach, P. J., DePaoli-Roach, A. A., Larner, J. 1978. Ca²⁺-stimulated phosphorylation of muscle glycogen synthase by phosphorylase b kinase. *J Cyclic Nucleotide Res* 4:245-57
- Roach, P. J., Larner, J. 1976a. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. II. Enzyme phosphorylation state and effector concentrations as interacting control parameters. *J Biol Chem* 251:1920-5.
- Roach, P. J., Takeda, Y., Larner, J. 1976. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase. I. Relationship between phosphorylation state and kinetic properties. *J Biol Chem* 251:1913-9.
- Romeo, T., Kumar, A., Preiss, J. 1988. Analysis of the *Escherichia coli* glycogen gene cluster suggests that catabolic enzymes are encoded among the biosynthetic genes. *Gene* 70:363-76.
- Rubin, C. S., Hirsch, A., Fung, C., Rosen, O. M. 1978. Development of hormone receptors and hormonal responsiveness in vitro. Insulin receptors and insulin sensitivity in the preadipocyte and adipocyte forms of 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 253:7570-8.
- Rybicka, K. K. 1996. Glycosomes--the organelles of glycogen metabolism. *Tissue Cell* 28:253-65.
- Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., Scharf, S. J., Higuchi, R., et al. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-91.
- Saitou, N., Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4:406-25.
- Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular cloning*. 3a ed. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Saxena, I. M., Brown, R. M., Jr., Fevre, M., Geremia, R. A., Henrissat, B. 1995. Multidomain architecture of beta-glycosyl transferases: implications for mechanism of action. *J Bacteriol* 177:1419-24
- Schalin-Jantti, C., Harkonen, M., Groop, L. C. 1992. Impaired activation of glycogen synthase in people at increased risk for developing NIDDM. *Diabetes* 41:598-604
- Scheer, U., Hock, R. 1999. Structure and function of the nucleolus. *Curr Opin Cell Biol* 11:385-90.

Seoane, J., Trinh, K., RM, O. D., Gomez-Foix, A. M., Lange, A. J., et al. 1997. Metabolic impact of adenovirus-mediated overexpression of the glucose-6-phosphatase catalytic subunit in hepatocytes. *J Biol Chem* 272:26972-7.

She, Q., Singh, R. K., Confalonieri, F., Zivanovic, Y., Allard, G., et al. 2001. The complete genome of the crenarchaeon *Sulfolobus solfataricus* P2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98:7835-40.

Shimomura, H., Sanke, T., Ueda, K., Hanabusa, T., Sakagashira, S., Nanjo, K. 1997. A missense mutation of the muscle glycogen synthase gene (M416V) is associated with insulin resistance in the Japanese population. *Diabetologia* 40:947-52

Shiota, C., Coffey, J., Grimsby, J., Grippo, J. F., Magnuson, M. A. 1999. Nuclear import of hepatic glucokinase depends upon glucokinase regulatory protein, whereas export is due to a nuclear export signal sequence in glucokinase. *J Biol Chem* 274:37125-30.

Sillje, H. H., Paalman, J. W., ter Schure, E. G., Olsthoorn, S. Q., Verkleij, A. J., et al. 1999. Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 181:396-400.

Sinnott, M. L. 1990. Glycosylhydrolases. *Chemical Reviews* 90:1171-1202

Sirover, M. A. 1997. Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J Cell Biochem* 66:133-40.

Skurat, A. V., Dietrich, A. D., Zhai, L., Roach, P. J. 2002. GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis. *J Biol Chem* 26

Skurat, A. V., Roach, P. J. 1995. Phosphorylation of sites 3a and 3b (Ser640 and Ser644) in the control of rabbit muscle glycogen synthase. *J Biol Chem* 270:12491-7.

Skurat, A. V., Wang, Y., Roach, P. J. 1994. Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites. *J Biol Chem* 269:25534-42

Smith, R. L., Lawrence, J. C. J. 1985. Insulin action in denervated skeletal muscle. Evidence that reduced stimulation of glycogen synthesis does not involve decreased insulin binding. *J Biol Chem* 260:273-278

- Smythe, C., Watt, P., Cohen, P. 1990. Further studies on the role of glycogenin in glycogen biosynthesis. *Eur J Biochem* 189:199-204
- Solnick, D. 1981. Construction of an adenovirus-SV40 recombinant producing SV40 T antigen from an adenovirus late promoter. *Cell* 24:135-43.
- Spector, D. L. 2001. Nuclear domains. *J Cell Sci* 114:2891-3.
- Steensberg, A., Febbraio, M. A., Osada, T., Schjerling, P., van Hall, G., et al. 2001. Interleukin-6 production in contracting human skeletal muscle is influenced by pre-exercise muscle glycogen content. *J Physiol* 537:633-9.
- St-Onge, J., Joanisse, D. R., Simoneau, J. A. 2001. The stimulation-induced increase in skeletal muscle glycogen synthase content is impaired in carriers of the glycogen synthase XbaI gene polymorphism. *Diabetes* 50:195-8.
- Sutherland, C., Leighton, I. A., Cohen, P. 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem J* 296:15-19
- Tagaya, M., Fukui, T. 1987. [New affinity label for nucleotide-binding sites: nucleoside polyphosphopyridoxal]. *Seikagaku* 59:1020-6.
- Takata, H., Takaha, T., Okada, S., Takagi, M., Imanaka, T. 1997. Characterization of a gene cluster for glycogen biosynthesis and a heterotetrameric ADP-glucose pyrophosphorylase from *Bacillus stearothermophilus*. *J Bacteriol* 179:4689-98.
- Tang, P. M., Bondor, J. A., Swiderek, K. M., DePaoli-Roach, A. A. 1991. Molecular cloning and expression of the regulatory (RG1) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase. *J Biol Chem* 266:15782-15789
- Thomas, J. A., Schlender, K. K., Lerner, J. 1968. A rapid filter paper assay for UDPglucose-glycogen glucosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-14C-glucose. *Anal Biochem* 25:486-99
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., Gibson, T. J. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res* 22:4673-80
- Thon, V. J., Khalil, M., Cannon, J. F. 1993. Isolation of human glycogen branching enzyme cDNAs by screening complementation in yeast. *J Biol Chem* 268:7509-7513

Thorburn, A. W., Gumbiner, B., Bulacan, F., Brechtel, G., Henry, R. R. 1991. Multiple defects in muscle glycogen synthase activity contribute to reduced glycogen synthesis in non-insulin dependent diabetes mellitus. *J Clin Invest* 87:489-95

Tomaschewski, J., Gram, H., Crabb, J. W., Ruger, W. 1985. T4-induced alpha- and beta-glucosyltransferase: cloning of the genes and a comparison of their products based on sequencing data. *Nucleic Acids Res* 13:7551-68.

Towbin, H., Staehelin, T., Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4

Toyoda, Y., Miwa, I., Kamiya, M., Ogiso, S., Nonogaki, T., et al. 1994. Evidence for glucokinase translocation by glucose in rat hepatocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 204:252-6.

Ugalde, J. E., Lepek, V., Uttaro, A., Estrella, J., Iglesias, A., Ugalde, R. A. 1998. Gene organization and transcription analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* glycogen (glg) operon: two transcripts for the single phosphoglucomutase gene. *J Bacteriol* 180:6557-64.

Vaag, A., Alford, F., Beck-Nielsen, H. 1996. Intracellular glucose and fat metabolism in identical twins discordant for non-insulin-dependent diabetes mellitus (NIDDM): acquired versus genetic metabolic defects? *Diabet Med* 13:806-15

Van Doren, K., Gluzman, Y. 1984. Efficient transformation of human fibroblasts by adenovirus-simian virus 40 recombinants. *Mol Cell Biol* 4:1653-6.

Van Roessel, P., Brand, A. H. 2002. Imaging into the future: visualizing gene expression and protein interactions with fluorescent proteins. *Nat Cell Biol* 4:E15-20.

Van Schaftingen, E. 1994. Short-term regulation of glucokinase. *Diabetologia* 37 Suppl 2:S43-7.

Vestergaard, H., Andersen, P. H., Lund, S., Schmitz, O., Junker, S., Pedersen, O. 1994. Pre- and posttranslational upregulation of muscle-specific glycogen synthase in athletes. *Am J Physiol* 266:E92-101.

Videira, P. A., Cortes, L. L., Fialho, A. M., Sa-Correia, I. 2000. Identification of the pgmG gene, encoding a bifunctional protein with phosphoglucomutase

and phosphomannomutase activities, in the gellan gum-producing strain *Sphingomonas paucimobilis* ATCC 31461. *Appl Environ Microbiol* 66:2252-8.

Villar-Palasi, C., Guinovart, J. J. 1997. The role of glucose 6-phosphate in the control of glycogen synthase. *Faseb J* 11:544-58.

Vrieling, A., Ruger, W., Driessen, H. P., Freemont, P. S. 1994. Crystal structure of the DNA modifying enzyme beta-glucosyltransferase in the presence and absence of the substrate uridine diphosphoglucose. *Embo J* 13:3413-22

Wanson, J. C., Drochmans, P. 1972. Role of the sarcoplasmic reticulum in glycogen metabolism. Binding of phosphorylase, phosphorylase kinase, and primer complexes to the sarcovesicles of rabbit skeletal muscle. *J Cell Biol* 54:206-24.

Whelan, W. J. 1971. Enzymic explorations of the structures of starch and glycogen. *Biochem J* 122:609-22.

White, M. F., Kahn, C. R. 1994. The insulin signaling system. *J Biol Chem* 269:1-4

Wilson, J. E. 1997. An introduction to the isoenzymes of mammalian hexokinase types I-III. *Biochem Soc Trans* 25:103-7.

Yu, J. P., Ladapo, J., Whitman, W. B. 1994. Pathway of glycogen metabolism in *Methanococcus maripaludis*. *J Bacteriol* 176:325-32.

Zhang, W. M., Browner, M. F., Fletterick, R. J., DePaoli-Roach, A. A., Roach, P. J. 1989. Primary structure of rabbit skeletal muscle glycogen synthase deduced from cDNA clones. *Faseb J* 3:2532-6

Zhong, S., Salomoni, P., Pandolfi, P. P. 2000. The transcriptional role of PML and the nuclear body. *Nat Cell Biol* 2:E85-90.

Zimmermann, H. P., Granzow, V., Granzow, C. 1976. Nuclear glycogen synthesis in Ehrlich ascites cells. *J Ultrastruct Res* 54:115-23.

Annex

FileUp

MSF: 2059 Type: P Check: 0 ..

Name: VC1726 Len: 2059
Name: UGST_WHEAT Len: 2059
Name: UGST_SORBI Len: 2059
Name: UGST_ORYGL Len: 2059
Name: UGST_MANES Len: 2059
Name: UGST_MAIZE Len: 2059
Name: UGST_ANTMA Len: 2059
Name: UGS4_SOLTU Len: 2059
Name: UGS3_SOLTU Len: 2059
Name: UGS2_WHEAT Len: 2059
Name: UGS2_SOLTU Len: 2059
Name: TM0895 Len: 2059
Name: s111393 Len: 2059
Name: s110945 Len: 2059
Name: Q9SEI7 Len: 2059
Name: Q43012 Len: 2059
Name: PM0544 Len: 2059
Name: PH0069 Len: 2059
Name: PAB2292 Len: 2059
Name: O65365 Len: 2059
Name: O64927 Len: 2059
Name: O64926 Len: 2059
Name: O64923 Len: 2059
Name: O49064 Len: 2059
Name: O48900 Len: 2059
Name: O48899 Len: 2059
Name: O24206 Len: 2059
Name: NP_484075 Len: 2059
Name: MJ1606 Len: 2059
Name: L98347 Len: 2059
Name: HI1360 Len: 2059
Name: GYS_NEUCR Len: 2059
Name: GYS_DROME Len: 2059
Name: GYS_CAEEL Len: 2059
Name: GYS2_YEAST Len: 2059
Name: GYS2_RAT Len: 2059
Name: GYS2_HUMAN Len: 2059
Name: GYS1_YEAST Len: 2059
Name: GYS1_RABIT Len: 2059
Name: GYS1_MOUSE Len: 2059
Name: GYS1_HUMAN Len: 2059
Name: GLGA_RHITR Len: 2059
Name: GLGA_AGRTU Len: 2059
Name: glgA Len: 2059
Name: DR0594 Len: 2059
Name: CT798 Len: 2059
Name: CAD17393 Len: 2059
Name: CAC69955 Len: 2059
Name: CAC49811 Len: 2059
Name: CAC47425 Len: 2059
Name: CAC08537 Len: 2059
Name: BS_glgA Len: 2059
Name: BH1085 Len: 2059
Name: BAB79770 Len: 2059
Name: BAB54020 Len: 2059
Name: BAA99156 Len: 2059
Name: BAA82346 Len: 2059

Name: aq_721 Len: 2059
 Name: AF433156_1 Len: 2059
 Name: AF432915_1 Len: 2059
 Name: AF395537_1 Len: 2059
 Name: AF383878_1 Len: 2059
 Name: AF234163_1 Len: 2059
 Name: AF210699_1 Len: 2059
 Name: AF173900_1 Len: 2059
 Name: AE004643_6 Len: 2059
 Name: AAL64907 Len: 2059
 Name: AAK28335 Len: 2059
 Name: AAF39055 Len: 2059
 Name: AAD45815 Len: 2059
 Name: AAC70779 Len: 2059

//

	1				50
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	MDVPFPLHRS	LSCTSVSNAI	THLKIKPILG	FVSHGTTSL	VQSSSWRKDG
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	...MEMVLR	SQSPLCLRSG	PVLIFRPTVA	GGGGGTQSL	RTTRFARRRV
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU

glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1MEM	AHSPLCSRSR	PVLVVRPATA	ATG.FAQPII	RCRRFTRTRL
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

51

100

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	MVTGVSFSIC	ANFSGRRRRK	VSTPRSQGSS	PKG FVPRKPS	GMSTQRKVQK
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	IRCVVASPGC	PNRKSR	TASPNVKVAA	YSNYAPRLLV	ESSSKKSEHH
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360

GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	LRCLVASADY	SKRNPRR...	ASTPKPKGAA	SRTYAPRPTV	ESSMKKIGQS
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

101

150

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	SN..GDKESK	STSTSKESI	SNQKTVEAR.VETS	DDDTKGVVRD
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292

O65365
O64927
O64926
O64923	DSSRHREETI	DTYNGLSGSD	AAELTSNRDV	EIEVDLQHIS	EEELPGKVSI
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	G...TDEGDL	GTSNGKLSSE	ATEQTSN...VEESS	EVDMSGNVSS
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

151

200

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA

UGS4_SOLTU	HKFLEDEDEI	NGSTKSISMS	PVRVSSQFVE	S
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	NASLGEMETV	DEAEVEEDKF	EVDTSGIVLR	NVAVREVDPK	DEHNAKDVVV
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	SVFLEGMDDA	FEAETEEEEE	QNQSP
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335

AAF39055
AAD45815
AAC70779
	201				250
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU E
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	VDSSGTAPDN	AAVEEVVDEA	EVEEDMVDVD	ILGLDLNNAT	IEEIDLMEEA
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156

BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

251

300

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTUETGG	DDKDAVKLNK	SKRSEESGFI
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	LLENFDVDSP	GNASSGRTYG	GVDELGELPS	TSVDCIAING	KRRSLKPKPL
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA

DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1ELSS	ESMDDDAIDR	KLDEYRGKIS
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

301

350

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	IDSVIR.....
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	PIVRFQEQEQ	IVLSIVDEEG	LIASSCEEGQ	PVVDYDKQEE	NSTAFDEQKQ
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR

GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	ALISSK.....P.....
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779
	351				400
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	E QSGSQGETNA
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365

O64927
O64926
O64923	LTDDFPEEGI	SIVHFPEPNN	DIVGSSKFLE	QKQELDGSYK	QDRSTTGLHE
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	EP.....	..TSVSSTHV	QDRSIVGFHE
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779
	401				450
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	SSKGSHAVGT	KLYEILQVDV	EPQQ.....

UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	QDQSVVSSHG	QDKSIVGVPQ	QIQYNDQZIA	GSHRQDQZIA	GAPEQIQSVA
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	QEKSVVSFHE	QDRSIVSVPE	QSQP...SSG
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055

AAD45815
AAC70779
	451				500
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	GYIKPNQSIV	GSCCKQHELII	PEPKKIESII	SYNEIDQSIV	GSHKQDKSVV
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346

aq_721
AF433156_1
AF432915_1
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

501

550

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	SVPEQIQSIV	SHSKPNQSTV	DSYRQAESII	GVPEKVQSIT	SYDKLDQSIV
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594

CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

551

600

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	GSLKQDEPII	SVPEKIQSIV	HYTKPNQSIV	GLPKQQQSIV	HIVEPKQSID
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME

GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

601

650

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTUL	KENNAGNVEY	KGPVASKLLE
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927

O64926
O64923	GFPKQDLSIV	GISNEFQTKQ	LATVGTHDGL	LMKGVEAKET	SQKTEGDTLQ
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1V	SGQNP..TEE	KTIISGQDVT
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	ITKASDVEHT	ESN.
UGS3_SOLTU

651

700

UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	ATFNVDNLSQ	KQEGLTKEAD	EITIIIEKIND	EDLVMIEEQK	SIAMNEEQTI
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	EEAPEEITGK	SIE
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815

AAC70779
	701				750
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU EIDD	LDTNSFFKSD	LIEEDEPLAA
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	VTEEDIPMAK	VEIGIDKAKF	LHLLSEEESS	WDENEVGIIE	ADEQYEVDET
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721

AF433156_1
AF432915_1REPLS	RETEKVLFAD	DDPRIIKDEQ
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

751

800

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	GTVETGDSSL	NLRLEMEANL	RRQAIERLAE	ENLLQGIRLF	CFPEVVKPDE
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	SMSTEQDIQE	SPNDDLDPQA	LWSMLQELAE	KNYSLGNKLF	TYPDVLKADS
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798

CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	YEPDIAPVQ.	...DDVDPQV	LRRRLEELAE	KNYLAGNKCF	VFPEVVQADS
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

801

850

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	DVEIFLNRGL	STLKNESDVL	IMGAFNEWRY	RSFTTRLTET	HLNGDWWCK
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	TIDLIFYNRDL	SAVANEPDVL	IKGAFNGWKW	RFFTEKLHKS	ELAGDWWCK
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL

GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	VIDLYLNHSM	SALASEPDIL	IKGAFNGWRW	KKFTQKMHKS	ELTGDWWCCK
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779
	851				900
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	IHVPKEAYRA	DFVFFNGQDV	YDNNNGNDFS	ITVKGGMQII	DFENFLLEEK
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926

O64923	LYIPKQAYRM	DFVFFNGHTV	YENNNNNDFV	IQIESTMDEN	LFEDFLAEK
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	LHIPKQAYRL	DFVFFNGDTI	YENNNHNDV	LQIESEINEH	SFEDFLVEEK
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779
	901				950
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	WREQEKLAK	QAERERLAE	QRRIEAEKAE	IEADRAQAKE	EAAKKKKVLR
UGS3_SOLTUFL	KSWIPIIPVN	FIFCDFYVME	NSILLHSGNQ
UGS2_WHEAT

UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	QRELENLANE	EAERRRQTDE	QRRMEEERAA	DKADRVQAKV	EVETKKNKLC
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	QRELERLAAE	EAERKRQAE	ERRKEEERAA	MEADRAQAKA	EVEMNKNKLO
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1	MAFIGS	LPFIIQTKAE	SSVLLHDKNL
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	ELMVKATKTR	DITWYIEPSE	FKCEDKVRLY	YNKSSGPLSH	AKDLWIHGGY
UGS3_SOLTU	FHPNLPLLAL	RPKKLSLIHG	SSREQMWRNQ	RVKATGENSG	EAASADESND
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	NVLGLARAPV	DNLWYIEPIT	TGQEATVRLY	YNINSRPLVH	STEIWMHGGY
O49064
O48900M	PGAISSSSSA	FLLPVASSS	.PRRRRGSVG
O48899MS	SAAVSSSSST	FFLALASAS	.PGRRRARV
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1

AF432915_1	NLLNSASRYA	DNLWYIEPHT	YKAGDRVKLF	YNRSSRPLMH	NTEIWMHGGY
AF395537_1M	SGAIASSPAA	TLFLAGSSSS	SPRRRR.SRV
AF383878_1MAAA	AVSSLLAPSG	SCYSPGCHSC	WPGPGGGRR	LPSRRRPIT
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1	QRSRFSVFPC	RSQ.....N.	SFNLAVSLSL	SFKPVRATGK	EGVSGDGSSED
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

1001

1050

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	NNWKDGLSIV	KKLVKSERID	GDWWYTEVVI	PDQALFLDWV	FADGPPKHAI
UGS3_SOLTU	ALQVTIEKSK	KVLAMQQDLL	QQIAERRKVV	SSIKSSLANA	KGTYDGGSGS
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923	NNWIDGLSFA	ERLVHHHDKD	CDWWFADV VV	PERTYVLDWV	FADGPPGSAR
O49064
O48900	AALRSYGYSG	AELRLHWARR	GP..PQDGAA	SVRAAAPAG	.GESEE....
O48899	GSSPFHTGAS	LSFAFWAPPS	PPRAPRDAAL	VRAEAEAGGK	DAPPERSG..
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393

CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	NNWSDGLSIA	EKLIKSYEKD	GDWWYADVTL	PEGALVLDWV	FADGPPGNAR
AF395537_1	SGVWWHLYGG	TGLRLHWERR	GL.VRDGAV	VCSASAAGGE	DGVAKA....
AF383878_1	AAARPTWAVP	RRSRLEWGRV	EAQ.NSGAR	TSCRAALQWL	SSTARSHVN.
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1	TLQATIEKSK	KVLALQRDLL	QKIAERRKLV	SSIQSSVGDH	DTNKTSHE..
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

1051

1100

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU	AYDNNHRQDF	HAIVPNHIPE	ELYWVEEEHQ	IFKTLQEERR	LREAAMRAKV
UGS3_SOLTU	LSDVDIPDVD	KDYNVTVPST	AATGITDVKD	NTPPAISHDF	VESKREIKRD
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTUMGSLQTPT
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365MPRK	GATLNKDSK	KT.....	.TK.RNPKTV
O64927MKSF	MRRDALGAGL
O64926
O64923	NYDNNGGHDF	HATLPNNMTE	EEYWMEEEQR	IYTRLQEQERR	EREEAIKRKA
O49064M	ATPSAVGAAC	LLLARAAWPA
O48900AAKSSSSSQA	GAVQGSTAKA
O48899DAARLP	RARRNAVSKR	RDPLQPVGRY	GSATGNTART
O24206MATAA	GMGIGAACLV
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST

GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGR TU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1
AF432915_1	NYDNNGRQDF	HAVVPNNISE	DLFWVEEEHM	IFKRLQKERK	EREDADRRKS
AF395537_1KTKSAGSSKA	VAVQGSTAKA
AF383878_1VG..	..YGSPLVFP	GLTKPGSSRC	LCVVMVGNA	GNQVGDDSD
AF234163_1MAA	TGVGAGCLAP	SVRLRADPAA
AF210699_1
AF173900_1	Q.RENSLANS	DNTSTSDVNM	HQ.....	.QQ.....N
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

VC1726
1101	1150
UGST_WHEAT	MAALVTSQLA
UGST_SORBI	MSTLATSQLV
UGST_ORYGL	MSALTTSQLA
UGST_MANES	MATVIAAH.F
UGST_MAIZE	MAALATSQLV
UGST_ANTMA	MATVTASQ.L
UGS4_SOLTU	EKTALLKTET	KERTMKSFL	SQKHVVYTEP	LDIQAGSSVT	VYYNPANTVL
UGS3_SOLTU	LADERAPPLS	RSSITASSQI	SSTVSSKR..	TLNVPPETPK
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU	NLSNKSCLCV	SGRVVKGLRV	ERQVGLGF..S	WLLKGRNRK
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012	MSALTTSQLA
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365	GSTERPAVKS	KVSLSPSQVT	SSTVNSQE..	PAKATYETVK
O64927	RGAASKPVS	RVASVRPAPT	AYRTACQVAK	VDEMVSVDDEE	LTRLRKENEL
O64926MLIRIG	APPRGPRR..	PCIPAAHQLR
O64923	ERNAKMKAE	KEKTMRMFLV	SQKHIVYTEP	LEIHAGTTID	VLYNPSNTVL

O49064	AVGDRARPRR	LQRVLRRCV	AELSREG...P	APRPLPPALL
O48900	VDSASPPNPL	TSAPKQSQA	AMQNGTS...	GGSSASTAAP
O48899	GAASCQNAAL	ADVEIKSIVA	APPTSIVKFP	APGYRMILPS	GDIAPETVLP
O24206	APQVRPGRRL	RLQVRRCV	AELSRDGG..S	AQRPLAPAPL
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955	MATVTASSNI
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346	MATVSMAS.C
aq_721
AF433156_1	MAVASTSR..
AF432915_1	EITAKMKAEM	KEKTMRDFLL	SQKHIVYTEP	LEVRAGTTVD	VLYNPSNTVL
AF395537_1	DHVEDSVS..	.SPKYVKPAV	AKQNGEV...	VSRATKSDAP
AF383878_1	GIKVTNEKLR	AVIRKSKEVL	EIHRNLEKI	SASERK...K	ITSIIEDSSI
AF234163_1	RATACVVRAR	LRRVARGRYV	AELSREGP..A	ARPAQQLAPP
AF210699_1	MATVTASQ.F
AF173900_1	GPVLPSSYVH	STADEVSETA	SSAINRGH..	AKDDKELEQH
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779	MATVTGSY.V
VC1726
UGST_WHEAT	TSGTVLSVTD	RFRRP....	GFQGLRPRN.	..PADAALGM	RTVGASAAPK
UGST_SORBI	ATHAGLGVPD	ASMFR...RG	GVQGLRAAAR	ASAAAGDALS	MRTSACPAPR
UGST_ORYGL	TSATGFGIAD	RSAPSSLLRH	GFQGLKPRS.	PAGGDATSL	VTT SARATPK
UGST_MANES	VSRSSHLSIH	A.LETKANNL	SHTGPWTQTI	TPNGLRSLNT	MDKLQMKTQS
UGST_MAIZE	ATRAGLGVPD	ASTFR...RG	AAQGLRGAR.	.ASAAADTLS	MRTSARAAPR
UGST_ANTMA	VSHVHGATS	S.PDTKTN.L	AQVGLRNQQF	THNGLRSINM	VDKLQMRNNA
UGS4_SOLTU	NGKPEIWFRC	SFNRWTHRLG	PLPPQKMSPA	ENGTHVRATV	KVPLDAYMMD
UGS3_SOLTU	SSQETLLDVN	SRKSLVDVPG	KKIQSYMPS.	.LRKESSASH	VE.QR..NEN
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU	VQSLCVTSSV	SDGSSIAENK	NVSEGLLLGA	ERDGSVSVVG	FQLIPHSVAG
	1151				1200

TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7MNSI	FPCTGDQETV	STSTGEITHH	EEKK.....	.E.....AI
Q43012	TSATGFGIAD	RSAPSSLLRH	GFQGLKPRS.	PAGGDASSLS	VTT SARATPK
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365	SSQVMPLDVD	SQKNVTSFSR	EILLSEVPS.	.SSSMASAST	LEDEK..RDH
O64927	LRAQLALYQQ	NQQPSVGAAA	VAPPAAATKV	LEKPAPAKQA	SVDGGIIWPK
O64926	LASSVIIAFV	LRGCPRVQLS	LPLESEMYIE	PAAPVAEAPE	AE.....
O64923	TGKPEVWFRC	SFNRWMPGG	VLPPQKMVQA	ENGSHLKATV	YVPRDAYMMD
O49064	APP.....L	VPGFAPPAAE	PTGEPASTPP	PVPDAG.LGD	LGLEP..EGI
O48900	VSGPKADHPS	APVTKREIDA	SAVKPEPAGD	DARPVESIGI	AEP....VDA
O48899	APKPLHESPA	VDGDSNGIAP	PTVEPLVQEA	TWDFKKYIGF	DEP....DEA
O24206	VKQPVLPTFL	VPTSTPPAPT	QSPAPAPTPP	PLPDSG.VGE	IEPDL..EGL
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEELMPDHARMP
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT
GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955	VSRTSHVNLP	TVSCEFKTAP	MRLGSIRKAN	THNGLRVLNS	LDELLNRTPI
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346	VASKGAW..	..TETKVKSS	GQMSLNRHEL	KYDGLRSLNK	VLVRSTHASK
aq_721
AF433156_1P	SSARPIVINA	ASFGVKKTANQ.LLRE	LARGSARKST
AF432915_1	NGKPEVWFRC	SFNRWTHPSG	PLPPQKMVNA	ENGSHLRATV	RVPLDAYMMD
AF395537_1	VSKP.KVDPS	VPASKAEADG	NAQAVE.SKA	ALDKKEDVGV	AEP....LEA
AF383878_1	YNEQDPFGQR	DSSFYHLDEV	PDDDEFSDYL	QMYLDRHPDQ	SEVVA..TQD
AF234163_1	VVPG.....	F..LAPPPPA	PAQSPAPTQP	PLPDAG.VGE	LAPDLLLEGI
AF210699_1	AAYVHGGATS	..VDSKSN.L	GQIGQRAQLI	THNGLRSVNR	ADALQMRNNV
AF173900_1	ASPRTAFVKN	STKQFKEMDS	EKLQTEIPS	FLSNTTIDIST	INEEN..SEH
AE004643_6
AAL64907
AAK28335MTTDET	VNGATTTPKVT
AAF39055
AAD45815I
AAC70779	VSR SACFNSQ	GRTEAKVNSP	QKINLNSQAF	TYVGLRSLNK	LHVQTARATK

1201

1250

VC1726	MEQFNWFTV	SEVQGLVKSG
UGST_WHEAT	QSR.....	KPHRFDR..R	CLSMVVRATG	SGGMNLVFBG	AEMAPWSKTG
UGST_SORBI	QQP.....	AARRGGRGR	FPSLVVCAT.	.AGMNVVFBG	AEMAPWSKTG
UGST_ORYGL	QQR.....	SVQRGSR..R	FPSVVVYATG	.AGMNVVFBG	AEMAPWSKTG
UGST_MANES	KAVKK.....	VSATGNG..R	PAAKIICGH.	..GMNLIFVG	AEVGPWSKTG
UGST_MAIZE	HQQ.....	QARRGGR...	FPSLVVCAS.	.AGMNVVFBG	AEMAPWSKTG
UGST_ANTMA	KQSRSL....	VKKTNG..S	PLGKIICGT.	..GMNLVFBG	AEVGPWSKTG
UGS4_SOLTU	FVFSEREDGG	IFDNKSGMDY	HIPVFGGVAK	EPPMHIVHIA	VEMAPIAKVG
UGS3_SOLTU	L.EGSSAEAN	EET..EDPVN	IDEKPPPLAG	TNVMNIIILVA	SECAPWSKTG
UGS2_WHEATEAAPYAKSG
UGS2_SOLTU	DATMVESHDI	VANDRDDLSE	DTEEMEETPI	KLTFNIIFVT	AEAAPYSKTG
TM0895MKVVFVS	YEVFPFAKVG
s111393MYIVQIA	SECAPVIKAG
s110945MKILFVA	AEVSPLAKVG
Q9SEI7	DQIVMADFGV	PGNRAVEEGA	AEVGIPSGKA	EVVNNLVFVT	SEAAPYSKTG
Q43012	QQR.....	SVQRGSR..R	FPSVVVYATG	.AGMNVVFBG	AEMAPWSKTG
PM0544MKVLHAC	SELYPLLKTG
PH0069MRMNSQW	GFKMKILIMG	FEYLPVK.VG
PAB2292MKVLLLG	FEFLPVK.VG
065365	R.ESSSKEID	VGT..EDPVN	EDLKPPPLAG	TNVMNVILVC	AECAPWSKTG
064927	PGEAFWERSP	RASPMPLQGG	AAEAPPVERD	GNPMHIIHIT	AEMAPIAKVG
064926E.....EPPA	VE.KPPPLAG	PNVMNVVMVG	AECAPWSKTG
064923	FVFSESEEGG	IYDNRNGLDY	HIPVFGSIAK	EPPMHIVHIA	VEMAPIAKVG
049064	AEGSIDNTVV	VAS..EQDSE	IVVGKEQARA	KVTQSIVFVT	GEASPYAKSG
048900	KADAAPATDA	AAS..APYDR	EDNEPGPLAG	PNVMNVVVVA	SECAPFKKTG
048899	KDDSRVGADD	AGS..FEHY.	GDNSGPLAG	ENVMNVIVVA	AECSPWCKTG
024206	TEDSIDKTIF	VAS..EQESE	IMDVKEQAQA	KVTRSVFVT	GEASPYAKSG
NP_484075MYIVQIA	SECAPVIKAG
MJ1606MKIVILA	PTITPIVSYG
L98347MK	ERKMKVLFAS	SECAPFFKTG
HI1360MKILHVC	SELYPLLKTG
GYS_NEUCRMA	HDNREPRE..	..VKNHLLFE	VATEVAHRVG
GYS_DROME	..MNRRFSR	VESGADLKDY	FDRGDIAS..	..RENRWNF	VAWEVANKVG
GYS_CAEEL	RNLSSNKIAK	TIAGEDLDEE	EVLEMDAGQS	AREEGRFVFE	CAWEVANKVG
GYS2_YEASTSRD..	..LQNHLLFE	TATEVANRVG
GYS2_RATMLRGR	SLSVTSLGGL	PAWEAERLP.	..VEDLLLFE	VSWEVTNKVG
GYS2_HUMANMLRGR	SLSVTSLGGL	PQWEVEELP.	..VEELLLLFE	VAWEVTNKVG
GYS1_YEASTARD..	..LQNHLLFE	VATEVTNRVG
GYS1_RABITPLSR	TLSVSSLPGL	EDWEDEFD..	..LENSVLFE	VAWEVANKVG
GYS1_MOUSEMPLSR	SLSVSSLPGL	EDWEDEFD..	..PENAVLFE	VAWEVANKVG
GYS1_HUMANMPLNR	TLSMSSLPGL	EDWEDEFD..	..LENAVLFE	VAWEVANKVG
GLGA_RHITRMKVLSVS	SEVFPLIKTG
GLGA_AGRTUMNVLSVS	SEIYPLIKTG
glgAMQVLHVC	SEMFPLLKTG
DR0594MARGR	PCLSAQRLGE	EPRVNSTGRY	SGPMRVLHLA	SEVFPFSRSG
CT798MKIIHTA	IEFAPVIKAG
CAD17393MSLNVLFVA	SEAVPLAKTG
CAC69955	KMKGVQSRKK	GVQRKNV..R	PKGIIIVCG..	...MNLIFVG	TEVAPWSKTG
CAC49811MQILSVT	AEIFPLVKTG
CAC47425MNILSVA	SEVYPLVKTG
CAC08537	MKRYESLWFE	DELKHVWMIS	AELEKVASLG
BS_glgAMKILFAV	SECTPFVKSG
BH1085MNVLHVA	SECNPFFKTG
BAB79770MEG	FKLIKVL FAT	SEANPFIKTG
BAB54020MQVLSVT	PEIFPLIKTG
BAA99156MRIVQVA	VEFTP IVKVG
BAA82346	MGSSLAA..K	SSKSGRE..K	VLEKIECG..	...MNLIFVG	AEVAPWSKTG
aq_721MRVLFCS	SEIYPYAKTG
AF433156_1	SRS.....	.AVTGATG..	..AT.....	.CALDIVMVA	AEVAPWSKTG
AF432915_1	FVFSESEEGG	IYDNRNGMDY	HSPVTDVAK	EPPMHIVHIA	VEMAPIAKVG

AF395537_1	KADAGGDAGA	VSS..ADDS.	ENKESGPLAG	PNVMNVIVVA	SECSPFCKTG
AF383878_1	YEAQLSQISE	MGQ..SVAEG	TSDDPSASAS	VDLINIILVA	AECAPWSKTG
AF234163_1	AEDSIDTIVV	AAS..EQDSE	IMDANDQPLA	KVTRSIVFVT	GEAAPYAKSG
AF210699_1	KVS.....	.AKRVGQ..V	PINKDRCETS	..GMTLIFVS	AECGPWSKTG
AF173900_1	SNESTSPMVD	IFE..SDSMT	EDMKPPPLAG	DNVMNVILVA	AECAPWSKTG
AE004643_6	.MGHSVAGVC	LEEPAVLTA	PSLLHPQDPP	QQRDRILFVT	AELSDFVKVG
AAL64907MYAP	ERLRRIYIIT	FEYGGVLKVG
AAK28335	RKFSSSKIVR	QLSGLNISDQ	G..SVTDRGEN	ARTEGRYVFE	CSWEVANKVG
AAF39055MKITHTA	IEFAPVIKAG
AAD45815	AEGSIDETVV	VAS..EQDSE	IVVGKEQARA	KVTQSIVFVT	GEASPYAKSG
AAC70779	TSS.....	SSLKATN..K	DLVKIVCGN.	..GMNLVFBVG	AEVGPWSKTG

1251

1300

VC1726	GLADVAKALP	QALKALH..Q	QVAIALPAYR	SVPGK.....	.E.....
UGST_WHEAT	GLGDVLGGLP	AAMAANG..H	RVMVISPRYD	QYK.....	...DAW....
UGST_SORBI	GLGDVLGGLP	PAMAANG..H	RVMVVSPLYD	QYK.....	...DAW....
UGST_ORYGL	GLGDVLGGLP	PAMAANG..H	RVMVISPRYD	QYK.....	...DAW....
UGST_MANES	GLGDVLGGLP	PAMAARG..H	RVMTVSPRYD	QYK.....	...DAW....
UGST_MAIZE	GLGDVLGGLP	PAMAANG..H	RVMVVSPLYD	QYK.....	...DAW....
UGST_ANTMA	GLGDVVGGLP	PAMAGNG..H	RVMTVSPRYD	QYK.....	...DAW....
UGS4_SOLTU	GLGDVVTSL	RAVQDLNHN	DIILPKYDCL	KMNN.....	.VKDFR....
UGS3_SOLTU	GLGDVAGALP	KALARRG..H	RVMVAPRYD	NYP.....	...EPQ....
UGS2_WHEAT	GLGDVCGSLP	IALAARG..H	RVMVMPRYL	NGS....	SDK NYAKAL....
UGS2_SOLTU	GLGDVCGSLP	MALAARG..H	RVMVVSPLYL	NGGP...SDE	KYANAV....
TM0895	GLADVAGTLP	KYLKKGH..V	DVTIVMPKHR	IVEKNAEKFG	YEIKKV....
s111393	GLGDVIYGLS	RELELRGHCV	ELILPMYDCM	RYDH.....	..IWGLH....
s110945	GMGDVVGSLP	KVLHQLG..H	DVRVFMPPY	FIGDKIDVP.
Q9SEI7	GLGDVCGSLP	IALARG..H	RVMVISPRYL	NGTA...ADK	NYARAK....
Q43012	GLGDVLGGLP	PAMAANG..H	RVMVISPRYD	QYK.....	...DAW....
PM0544	GLADVAGALP	FAQKEIG..I	DARIVLPAYP	AIKAGI....
PH0069	GLAEALTSIA	EALASLG..H	EVLVFTPSHG	RFQ.....
PAB2292	GLAEALTAIS	EALASLG..H	EVLVFTPSHG	RFQ.....
O65365	GLGDVAGALP	KALARRG..H	RVMVVVPLYG	NYA.....	...EPQ....
O64927	GLGDVVTGLA	KAALARG..H	FVTVMLPFYE	CLP...KDQ	IEGLKHECDI
O64926	GLGDVMAALP	KALVRRG..H	RVMVVVPRYE	NYD.....	...NAW....
O64923	GLGDVVTSL	RAVQDLGHN	EVILPKYGCL	NLSN.....	.VKNLQ....
O49064	GLGDVCGSLP	VALAARG..H	RVMVMPRYL	NGT....	SDK NYANAF....
O48900	GLGDVVGALP	KALARRG..H	RVMVVIPLYG	EYA.....	...EAR....
O48899	GLGDVVGALP	KALARRG..H	RVMVVVPRYG	DYV.....	...EAF....
O24206	GLGDVCGSLP	IALALRG..H	RVMVMPRYM	NGA....	LNK NFANAF....
NP_484075	GLGDVVYGLS	RELEIRGNCV	ELILPKYDCM	RYDH.....	.VWGLH....
MJ1606	GLGDVVRDLP	KFLKKN..E	VVLTNLNHN	RYFT.....	...LP...Y
LH98347	GLGDVAGALP	KELAKKSEID	SVAVILPYFK	N....EMKEE	YRSLK....
HI1360	GLADVLAGALP	QAQONIG..L	DARFLLPAYP	AITGTI....
GYS_NEUCR	GIYSVLKSKA	PVTTAEYG..D	RYTLIGPLNH	QSAAVEVEEL	EPSNP....
GYS_DROME	GIYTVIRSKA	YVSTEEMG..E	QLCMMGPYKE	HCARTEMEEM	EFPRG....
GYS_CAEEL	GIYTVLRSKA	QISTEELG..D	QYCMFGPMKD	GKWRLEVDPI	EPEN....
GYS2_YEAST	GIYSVLKSKA	PITVAQYK..D	HYHLIGPLNK	ATYQNEVDIL	DWKKPEAFSD
GYS2_RAT	GICTVIQSKA	KTTANEWG..E	NYFLIGPYFE	HNVKTQVEPC	RPAN....
GYS2_HUMAN	GIYTVIQTKA	KTTADEWG..E	NYFLIGPYFE	HNMKTQVEQC	EPVN....
GYS1_YEAST	GIYSVLKSKA	PVTVAQYG..D	NYTLGPLNK	ATYESEVEKL	DWEDESIFPE
GYS1_RABIT	GIYTVLQTKA	KVTGDEWG..D	NYFLVGPYTE	QGVRTQVELL	EPPT....
GYS1_MOUSE	GIYTVLQTKA	KVTGDEWG..D	NYFLVGPYTE	QGVRTQVELL	EPPT....
GYS1_HUMAN	GIYTVLQTKA	KVTGDEWG..D	NYFLVGPYTE	QGVRTQVELL	EAPT....
GLGA_RHITR	GLADVVGALP	IALKPYG..V	ETKTLIPGYP	AVMKAI....
GLGA_AGRTU	GLADVVGALP	IALEAHG..V	RTRTLIPGYP	AVKAAV....
glgA	GLADVIGALP	AAQIADG..V	DARVLLPAFP	DIRRGV....
DR0594	GLGDVLGALP	AVQARLGEDA	EVTVLSPWYA	SLQ.....
CT798	GLGDALYGLA	KALAANHTTE	VVIPLYPKLF	TLPK.....	.EQDLC....
CAD17393	GLGDMVGACA	GALQRAG..L	HVTVMPLPGYP	AAQAQLR...
CAC69955	GLGDVLGGLP	PALSANG..H	RVMTVTPRYD	QYK.....	...DAW....

CAC49811	GLADVAGSLP	KALRAHG..I	HTRSFVPGYP	GVMRAL....
CAC47425	GLADVVGALP	SALLPHG..V	RTRTLVPGYP	SVLKKL....
CAC08537	GLGPVVYNLG	KELVKQG..I	KVTVIMPSHG	RHLNDYYRSL	LKLNEIS...
BS_glgA	GLADVAGALP	KALARLG..N	EVAVMLPKYSQIPEP	WKKRMK....
BH1085	GLADVLGSLP	KALIKQG..I	NVSVILPKYGHLSDE	WQNQLT....
BAB79770	GLGDVMGALP	KELKRKG..I	DARVILPKYSAIKGE	LLDKLS....
BAB54020	GLADVTGALP	VALAAG..V	TMRTLIPGFP	AVMEGF....
BAA99156	GLGDAVASLS	KELAKQNDVE	VLLPHYPLIS	KFS.....	.SSQVL....
BAA82346	GLGDVLGGLP	SALAEHG..H	RVMTVSPRYD	QYK.....	...DAW....
aq_721	GLADFSFLI	KYLKKYG..V	KVKGVMPPYK	TLK.....
AF433156_1	GLGDVTGGLP	IELVKRG..H	RVMTIAPRYD	QYA.....	...DAW....
AF432915_1	GLGDVVTSL	RAVQDLGHN	EVILPKYDCL	NLSN.....	.VKDLH....
AF395537_1	GLGDVVGALP	KALARRG..H	RVMVVIPIRYG	EYA.....	...EAK....
AF383878_1	GLGDVAGALP	KALARRG..H	RVMVVVPMYK	NYA.....	...EPQ....
AF234163_1	GLGDVCGSLP	IALAARG..H	RVMVVMPRYL	NGT....SDK	NYAKAL....
AF210699_1	GLGDVVGGLP	PALAAANR..H	RVMTVSPRYD	QYK.....	...DAW....
AF173900_1	GLGDVAGSLP	KALARRG..H	RVMVVIPIRYG	NYV.....	...EPQ....
AE004643_6	GLGDFSAAALP	RVLKREHS..	.VRVLLPGYR	QVLER.....C
AAL64907	GLGEAVRQYA	VGLASRG..Y	DVTVLMPSHG	RHLDPHRG..	.FDLYPLDFK
AAK28335	GIYTVIRSKA	PVSTDELG.D	QYCM LGPYNE	ERVKLEVEVL	EPET.....
AAF39055	GLGDALYGLA	KALAVNHTTE	VVIPLYPKLF	TSLH.....	.EQDLF....
AAD45815	GLGDVCGSLP	VALAARG..H	RVMVVMPRYL	NGT....SDK	NYANAF....
AAC70779	GLGDVLGGLP	PALAGNG..H	RVMTVSPRYD	QYK.....	...DAW....

1301

1350

VC1726	.DAELVLETE	LTHWPHTQYR	VLKRDLDGVP	IYLIDCPAYF	DRPALYAE..
UGST_WHEAT	..DTSVISEI	KVVDRYERVR	YFHICYKRGVD	RVFVDHPCFL	EKVRGKTKEK
UGST_SORBI	..DTSVSEI	KMGDGYETVR	FFHCYKRGVD	RVFIDHPLFL	ERVWGKTEEK
UGST_ORYGL	..DTSVVAEI	KVADRYERVR	FFHCYKRGVD	RVFIDHPSFL	EKVWGKTGEK
UGST_MANES	..DTSVSVEI	KIGDRIETVR	FFHSYKRGVD	RVFVDHPMFL	EKVWGKTGSK
UGST_MAIZE	..DTSVSEI	KMGDGYETVR	FFHCYKRGVD	RVFVDHPLFL	ERVWGKTEEK
UGST_ANTMA	..DTSVVVEI	KVGDSIETVR	FFHCYKRGVD	RVFVDHPIFL	EKVWGKTGSK
UGS4_SOLTU	..FHKNYFWGGTEIK	VWFGKVEGLS	VYFLEP..QN	GLFSKGCV..
UGS3_SOLTU	..DSGVRKIY	KVDGQDQDVT	YFQALLMDCD	FVFIHSHMFR	HIGNN.....
UGS2_WHEAT	..YTAKHIKI	PCFGGSHEVT	FFHEYRDNVD	WVFDHPSYH	RPGS.....
UGS2_SOLTU	..DLDV RATV	HCFGDAQEVA	FYHEYRAGVD	WVFDHSSYC	RPGT.....
TM0895	..AESLSVSH	VKTDQKFDIY	ESVLP GSDVK	TYFVANDYYF	SA.ED.....
s111393	..DAYRNLEV	PWYGSSIFCD	VFCGWVHGRL	CFFIQPKSSD	NFFNRGHY..
s110945	..KEPVWKG	EAMFQQFAVY	QSYLPDTPKIP	LYLFGHPAFD	SRRIYG....
Q9SEI7	..DLGIRVTV	NCFGGSQEV	FYHEHRDQVD	WVFDHKSYP	RPGN.....
Q43012	..DTSVVAEI	KVADRYERVR	FFHCYKRGVD	RVFIDHPSFL	EKVWGKTGEK
PM0544	..PETTVAEI	FDNFAG.HIV	LRYG EYKGLG	VYLIDAPHL	QREGNP....
PH0069	..G.SEIGII	KAFGGKVAIK	VHLEENGNLR	IYRIGGGLLD	HQDVG....
PAB2292	..G.EEIGKI	RVFGEEVQVK	VSYEERGNLR	IYRIGGGLLD	SEDVYG....
065365	..HTGVRKMF	KIDGQDMEVN	YFHAYIDNVD	FVFIDSPIFQ	HRGNN.....
064927	EVPKGYRWDG	EIRVGPLKTS	VFWGRVQGCP	VYLIKPADDT	NCNIFR....
064926	..ETGIRKIY	SVFNSNQEVG	YFHAFVDGVD	YVFDHPTFH	GRGKN....
064923	..IHQSFSWGGSEIN	VWRGLVEGLC	VYFLEP..QN	GMFGVG YV..
049064	..YTEKHIRI	PCFGGEHEVT	FFHEYRDSVD	WVFDHPSYH	RPGN.....
048900	..DLGVR RRY	KVAGQDSEVT	YFHSYIDGVD	FVFVEAPPFR	HRHNN.....
048899	..DMGIRKYY	KAAGQDLEVN	YFHAFIDGVD	FVFIDAPLFR	HRQDD.....
024206	..YTEKHIRI	PCFGGEHEVT	FFHEYRDSVD	WVFDHPSYH	RPGN.....
NP_484075	..EAYLNLWV	PWFGAAIHCT	VYCGWVHGRV	CFFIEPHSED	NFFNRGCY..
MJ1606	EDIKKITVIY	KGAKITFDVL	RTKHPTTGVD	LIVFSNE..S	VNNLN.....
L98347	..DEFYDFVD	VGWRHEYVGV	KSLEK.EGVK	YYFLDNEHYF	GR.GQ.....
HI1360	..PNTQVVAE	FDNFAG.HVV	LRYG EYNGVG	IYLIDAPHL	GREGNP....
GYS_NEUCR	E...LKATI	Q AMRDRGIGIL	YGRWLI EGAP	RVLLFDTKTA	YGYMNEWKTD
GYS_DROME	..NPLLDVAVN	SLRSRGYKIH	TGRWLV DGNP	QLILFDIGSA	AWKLDQFKSE
GYS_CAEEL	..RTIRAAMK	RFQADGFRM	YGRWLI EGYP	KVILFDLGS	AVKMNEWKHE
GYS2_YEAST	EMRPVQHALQ	TMESRGVHFV	YGRWLI EGAP	KVILFDLDSV	RGYSNEWKGD
GYS2_RAT	..DAVRKAVD	AMNKHGCVH	FGRWLI EGSP	YVVLFDISS	VWNLDRWKGD

GYS2_HUMAN ..DAVRAVD AMNKHGCVH FGRWLI EGSP YVVLFDIGYS AWNLDRWKGD
 GYS1_YEAST ELLPIQKTLM SMREKGVNFV YGNWLI EGAP RVILFELDSV RHFLNEWKAD
 GYS1_RABIT ..PALKRTLD SMNSKGCKVY FGRWLI EGGP LVVLLDVGAS AWALERWKGE
 GYS1_MOUSE ..PELKRTLD SMNSKGCKVY FGRWLI EGGP LVVLLDVAAS AWALERWKGE
 GYS1_HUMAN ..PALKRTLD SMNSKGCKVY FGRWLI EGGP LVVLLDVGAS AWALERWKGE
 GLGA_RHITR ..RDPVVRLE LPDLLGEAAT ILEVEHAGIS FLVLDAPAYY SRTGGP....
 GLGA_AGRU ..TDPVKCFE FTDLLGEKAD LLEVQHERLD LLILDAPAYY ERSGGP....
 glgA ..TDAQVVS RDTFAG.HIT LFLGHYNGVG IYLIDAPHL Y DRPGSP....
 DR0594 ..G.EPQELW RGEAWGEQAW LGELRQDGVR YLFLGLNEFQ RP.....
 CT798 ..SIQKLSYF FAG..EQEAT AFSYFYEGIK VTLFKLDTQP ELFENAET..
 CAD17393 ..DARVACALP DLPGGPARVL LGAMPDTGVP VLLLDAPALF DRPGNP....
 CAC69955 ..DTNVTIEV KVGDRTEKVR FFHCFKRGVD RVFVDHPIFL EKVWGKTGTK
 CAC49811 ..SDATPVAE FESLFGERAT LIAARAHGLD LFVLDAPAFY DRQ GAL....
 CAC47425 ..KKKKPVGR FDNLFHPAT VLAAEVNGVD LLVLDQPALY ARDGGP....
 CAC08537 LVAEGDRIGI DGKSYHYKLG FEHGNLDGMN VVLIKGLDYN TGRIIDS...
 BS_glgA ..KQAECTVA VGWRQYCGI EHMAE.NDVN YYFIDNEYF NR.DS....
 BH1085 ..LKKSFTVS VTWRNQYCGL EQFVD.QGVT YYFIDNEYF KR.ER....
 BAB79770 ..FKKWF MVP VGWRNQYCGV YQCEY.DEVI YYLLDSEFYF HR.NG....
 BAB54020 ..KKRKAVYQ YPLLQGGKAS IHAVQIAGLD LFVLDAPHLF DRPGGP....
 BAA99156 ..SERSFYFE FLG..KQQAS AISYSYEGLT LTIITLDSQI ELFSTTS...
 BAA82346 ..DTNVTVEV KVADRIETVR FFHCYKQGV RVFVDHPCFL EKVWGKTGSK
 aq_721 ..AENLRKTDK GVTLLNLNGKD YTFEVEYSED CYFLRNDEL F GRDYIYGP..
 AF433156_1 ..DTSVVVDI MG...EKVR YFHSIKKGVH RVWIDHPWFL AKVWGKTGSK
 AF432915_1 ..YRQSFTWGNTEIK VVFGKVEDVP VYFLEP..QN GMFWVGCV..
 AF395537_1 ..DLGVRKRY RVAGQDSEVS YFHAFIDGVD FVFLEAPPFR HRHND.....
 AF383878_1 ..YLTGEP RRY QVAGQMEVI YHAYIDGVD FVFIDNPIFH HVEND.....
 AF234163_1 ..YTGHKIKI PCFGGSEVT FFHEYRDND WVFVDHPSYH RPGS.....
 AF210699_1 ..DTSVVVEI QVGDKVETVG FFHCYKRGVD RVFVDHPLFL EKVWGKTGSK
 AF173900_1 ..DTGVRKRY KVDGQDFEVS YFQAFIDGVD FVFIDSPMFR HIGND.....
 AE004643_6 RDLRIIGSLP GRAAIPPCEI GLVTLDDGLE VMLVLCPLLY EREGTP....
 AAL64907 ..ACGNRLGQ DGRAYPYCIG AEITFQNGVK IVMFKGLDYA TGHVDFR..
 AAK28335 ..ASVKYTL E CMKNWGFKVT YGRWLI EGYP KVVLFDIGSA AWKLDTWKHE
 AAF39055 ..ATQKIPYF FAG..EQEAT AFSYFYEGIK VTLLKLD SQP ELFEEAET..
 AAD45815 ..YTEKHIRI PCFGGEHEVT FFHEYRDSVD WVFVDHPSYH RPGN.....
 AAC70779 ..DTGVSVEI KVGDRFETVR FFHCYKRGVD RVFVDHPLFL EKVWGKTESK

1351

1400

VC1726NNQAY ADNGERFGFF SAACLDVLPK LGIQP.....
 UGST_WHEAT IYGPDAGTDY EDNQRFSL L CQAAL E VPRI LDLNNNPHFS GPYAML CRAV
 UGST_SORBI IYGPDAGTDY KDNQLRFSLL CQAAL E APRI LSLNNNPFYS GPY.....
 UGST_ORYGL IYGPDTGVDY KDNQMRFSLL CQAAL E APRI LNLNNNPFYK GTY.....
 UGST_MANES IYGPFRAGLDY QDNQLRFSLL CLAAL E APRV LNLNSSKNFS GPY.....
 UGST_MAIZE IYGPVAGTDY RDNQLRFSLL CQAAL E APRI LSLNNNPFYS GPY.....
 UGST_ANTMA IYGNPAGTDY QDNQLRFSLL CQAAL E APRV LNLTSKYFS GPY.....
 UGS4_SOLTUYGC SNDGERFGFF CHAAL E FLLQ GGFS.....
 UGS3_SOLTU IYG...G NR VDILKRMVLF CKAAI E VPWH VPCGGVCYGD G.....
 UGS2_WHEAT LYGDNF.GAF GDNQFRY TLL CYAAL E AP LI LELGGYIYGQ
 UGS2_SOLTU PYGDIY.GAF GDNQFRY TLL SHAAL E AP LV LPLGGFTYGE
 TM0895VYAG PDLGEQA IFF CAATLDLV.. .KHLDLK PDI VH.....
 s111393YGA LDDHMRFAFF SKAAL E FLLR SNKR.....
 s110945G.. DDEAWRFTFF SNGAA E FAWN HWKP.....
 Q9SEI7 PYGDSK.GAF GDNQFRY TLL CHAAL E AP LV LPLGGFTYGE
 Q43012 IYGPDTGVDY KDNQMRFSLL CQ...EAPRI LNLNNNPFYK GTY.....
 PM0544 .YHDQWYNDY ADNYKRFALL GWVAAEL A.T GLDSWWHADV VH.....
 PH0069PGW EGLIRKTVIF GKASV LLLNE LLKS....ED
 PAB2292PGW DGLIRKAVTF GRASV LLLND LLRE....EP
 O65365 IYG...G NR VDILKRMDF CKAAI VVPWH VPCGGICYGD G.....
 O64927 ..GGRIYGG S YNEMEAYLYF CRACLE YLNV SQON.....
 O64926 IYG...GER QEILFRCALL CKAAAL E AVWH VPCGGITYGD D.....
 O64923YGR .DDRRRFGFF CRSALE FLLQ SGSS.....
 O49064 LYGDKF.GAF GDNQFRY TLL CYAAL E AP LI LELGGYIYGQ

048900	IYG...GER	LDILKRMILF	CKAAVEVPWY	APCGGTVYGD	G.....
048899	IYG...GSR	QEIMKRMILF	CKVAVEVPWH	VPCGGVVCYGD	G.....
024206	LYGDNF.GAF	GDNQFRYTL	CYAACEAPLI	LELGGYIYGQ
NP_484075YGC	DDDDMRFAFF	SKAALEFLHQ	SNKR.....
MJ1606	VWDPIKYEIF	ADLVITYLDE	VKDID.....
L98347LYGY	GDDGERFAFF	DLALCQLL..	.EKLDIFPDV	LH.....
HI1360	.YHDAYYNDY	GDNYKRFALL	GWVGAELA.T	GLDSWWRAEV	VH.....
GYS_NEUCR	LWNVASIPSP	DNDEETNEAI	VFGYLVAVFL	GEFVCHEKRK
GYS_DROME	MWEKCHIGIP	HLDIETNDAI	ILGFMIAEFL	EEFRNFAVTY	SQNNEL....
GYS_CAEEEL	LFEQCKIGIP	HEDIESNDAY	ILGFMVALFL	KHFRESVTSY	TP.....
GYS2_YEAST	LWVSLVIGIPSP	ENDFETNDAI	LLGYTVAVFL	GEVAHLDSQH
GYS2_RAT	FWEACGVGIP	HDDREANDML	IFGSLTAWFL	KEVTDHADGK
GYS2_HUMAN	LWEACSVGIP	YHDREANDML	IFGSLTAWFL	KEVTDHADGK
GYS1_YEAST	LWVSLVIGIPSP	EHDHETNDAI	LLGYVVVWFL	GEVSKLDSSH
GYS1_RABIT	LWDTCNIGVP	WYDREANDAV	LFGFLTWWFL	GEFLAQNEEK	P.....
GYS1_MOUSE	LWDTCNIGVP	WYDREGNDAY	LYSFLTWWFL	GEFLAQNEEK	P.....
GYS1_HUMAN	LWDTCNIGVP	WYDREANDAV	LFGFLTWWFL	GEFLAQSEEK	P.....
GLGA_RHITR	.YVDATGKDY	PDNWRRFAL	SLAGAEIA.A	GLLPGWRPDL	VH.....
GLGA_AGRTU	.YLGQTGKDY	PDNWRRFAL	SLAAARIG.A	GVLPGRPDM	VH.....
glgA	.YHDTNLFAY	TDNVLRFALL	GWVGAEMA.S	GLDPFWRPDV	VH.....
DR0594GLYH	PDDVERFCFAF	GRAALPALDA	VGVT.....
CT798IYT	SDDAFRFCAF	SAAAASYIQK	EG.....
CAD17393	.YLDACGEPY	ADNALRFAAF	SHAAHVAGG	VPDLP.....
CAC69955	LYGPAAGDDY	QDNQLRFSIF	CQAALAEARV	LNLKSNKYFS	GPY.....
CAC49811	.YVDRHGRDY	ADNWKRFAL	SLVASQIA.R	GLVFNWRPHI	IH.....
CAC47425	.YLDSTGRDY	PDNFRRFAL	SLAAAEIAGN	GIIPNWKPDI	VH.....
CAC08537WNIY	DNAMEKSSLL	ARAVEKYAKF	SIPNDIP...
BS_glgALYGH	YDDGERFAFF	SRAVLEAA..	.KVVNVQADI	VH.....
BH1085LYGY	LDEAERFTFF	NHAVLSSL..	.PFLDESPDL	IH.....
BAB79770LYGE	GDDGERFAFF	DRAVLETL..	.KEIDWCPDI	IH.....
BAB54020	.YGNASGADW	PDNWRRFAL	SQAGADIA.G	GAISGYLPEI	VH.....
BAA99156VYS	ENNVVRFSAF	AAAAAYLQE	ADP.....
BAA82346	LYGPSAGVDY	EDNQLRYSLL	CQAALAEAPRV	LNLNSNKYFS	GPY.....
aq_721PGWGY	EDNDIRFGGF	SRAVSELIST	GQLEAD....
AF433156_1	LYGPRSGADY	LDNHKRFALF	CKAAIEAARV	LPFG..P...
AF432915_1YGR	.NDESRFGFF	CHSALEFLRQ	NGSS.....
AF395537_1	IYG...GER	FDVLKRMILF	CKAAVEVPWF	APCGGSIYGD	G.....
AF383878_1	IYG...GDR	TDILKRMVLL	CKAAIEVPWY	VPCGGYCYGD	G.....
AF234163_1	LYGDNF.GAF	GDNQFRYTL	CYAACEAPLI	LELGGYIYGQ
AF210699_1	VYGPSAGVDY	EDNQLRFSLL	SLAALAEAPRV	LNLTSNKYFS	GPY.....
AF173900_1	IYG...GNR	MDILKRMVLF	CKAAVEVPWH	VPCGGVVCYGD	G.....
AE004643_6	.YMDDQGNW	PDNHLRFARL	CLAAAEIAGG	RGAQGWQPG.
AAL64907WGVY	EYTEEKAALF	ARAVVAFAER	FGLP.....
AAK28335	IWEKCHIGVP	YHDQESNDAI	IFGFMVAVFL	QTFTNSVEGF	DP.....
AAF39055IYT	NDDAFRFCAF	SAAAAYIQK	EG.....
AAD45815	LYGDKF.GAF	GDNQFRYTL	CYAACEAPLV	LELGGYIYGQ
AAC70779	LYGPKTGVDY	KDNQLRFSLL	CQAALAEAPRV	LNLNSNKHFS	GPY.....

1401

1450

VC1726DII	HANDWHTGLV	PFLKTRYRY	DSFFEQVKS	LTVHNAIFKG
UGST_WHEAT	PRRAGEDVVF	VCNDWHTGLL	ACYLKSNYQS	NGIYRTAKVA	FCIHNISYQG
UGST_SORBI	...GEDVVF	VCNDWHTGPL	SCYLKSNYQS	NGIYKDAKTA	FCIHNISYQG
UGST_ORYGL	...GEDVVF	VCNDWHTGPL	ASYLKNNYQP	NGIYRNAKVA	FCIHNISYQG
UGST_MANES	...GEEVAF	IANDWHTALL	PCYLKAIYQP	MGIYKHAKVA	FCIHNIAYQG
UGST_MAIZE	...GEDVVF	VCNDWHTGPL	SCYLKSNYQS	HGIYRDAKTA	FCIHNISYQG
UGST_ANTMA	...GEDVVF	VANDWHTALL	PCYLKSMYQS	KGMYLHAKVA	FCIHNIAYQG
UGS4_SOLTUPDII	HCHDWSSAPV	AWLFKEQYTH	YGLSK.SRIV	FTIHNLEFG.
UGS3_SOLTUNLVF	IANDWHTALL	PAYLKAYYRD	NGIMNYTRSV	LVIHNIAHQG
UGS2_WHEATNCMF	VVNDWHASLV	PVLLAAKYRP	YGVYRDSRST	LVIHNIAHQG
UGS2_SOLTUKCLF	LANDWHAALV	PLLLAAKYRP	YGVYKDARSI	VAIHNIAHQG
TM0895V	..NDWQTALI	PVYLKTVYRD	DPYFSRTATV	LTIHNLYGQG

s111393PDII HCHDWQTGLV PVLLYEIYRF HGMDH.QRVC YTIHNFKHQG
s110945EII HCHDWHTGMI P.....VW MHQSPDIATV FTIHNLAYQG
Q9SEI7KSLF LVNDWHAGLV PILLAAKYRP YGVYKDARSI LIIHNLAHQG
Q43012GEDVVF VCNDWHTGPL PSYLKNNYQP NGIYRNAKVA FCIHNISYQG
PM0544A ..HDWHAGLASAYLF NKGRP.AKSV FTIHNLAYQG
PH0069LPDVL HFHDWHTVFA GALIKKYFRI PA.....V FTIHRNLNKS.
PAB2292LPDVV HFHDWHTVFA GALIKKYFKI PA.....V FTIHRNLNKS.
O65365NLVF IANDWHTALL PVYLKAYFRD NGVMKFTRSV LVIHNIAHQG
O64927PHVL QLHDWHAATA SMLYWDVYNP NG.FSRTRLM LTIHNLNDNTG
O64926NLCF IANDWHTALL PVYLQAHYRD YGEMTYARCA FVIHNMAHQG
O64923PNII HCHDWSSAPV AWLHKENYAK SSLAN.ARUV FTIHNLEFG.
O49064NCMF VVNDWHASLV PVLLAAKYRP YGVYKDSRSI LVIHNLAHQG
O48900NLVF IANDWHTALL PVYLKAYYRD NGLMQYARSV LVIHNIAHQG
O48899NLVF IANDWHTALL PVYLKAYYRD HGLMQYTRSV LVIHNIAHQG
O24206KCMF VVNDWHASLV PVLLAAKYRP YGVYRDARSV LVIHNLAHQG
NP_484075PDII HCHDWQTGLI PVMLYEIYKY HGMDT.QRVC YTIHNFKHQG
MJ1606VV SGHDWMCGLA IAKCNDILD LPTTLTIHNEA FKGEMIEYKG
L98347V ..NDWQTAMV PFLLEKEYNW IKAYEKIKTV LTIHNIEFQG
HI1360A ..HDWHAGLCVAYLF NKGKP.AKSV FTIHNLAYQG
GYS_NEUCRAVIA HFHEWLAGVA LPLTKKRQID VTTIFTTHAT LLGRYLCAG.
GYS_DROME ...SAPRIVA HFHEWQAGVG LIVLRTRLVE IATVFTTHAT LLGRYLCAG.
GYS_CAEELLVVA HFHEWQAGVG LLMTRLWKL D IATVYTTTHAT LLGRHLCAG.
GYS2_YEASTAIVA HFHEWLAGVA LPLCRKRRI D VVTIFTTHAT LLGRYLCASG
GYS2_RATHVIA QFHEWQAGTG LILSRARKLP IATIFTTHAT LLGRYLCAA.
GYS2_HUMANYVVA QFHEWQAGIG LILSRARKLP IATIFTTHAT LLGRYLCAA.
GYS1_YEASTAIIG HFHEWLAGVA LPLCRKRRI D VVTIFTTHAT LLGRYLCAG
GYS1_RABITHVVA HFHEWLAGIG LCLCRARRLP VATIFTTHAT LLGRYLCAG.
GYS1_MOUSEYVVA HFHEWLAGVG LCLCRARRLP VATIFTTHAT VLGRYLCAG.
GYS1_HUMANHVVA HFHEWLAGVG LCLCRARRLP VATIFTTHAT LLGRYLCAG.
GLGA_RHITRA ..HDWQSALVPVYMR YYPTPELPSV LTIHNIAFQG
GLGA_AGRTUA ..HDWQAAMTPVYMR YAETPEIPSL LTIHNIAFQG
glgAA ..HDWHAGLAPAYLA ARGRP.AKSV FTVHNLAYQG
DR0594DVL HGHDWQAGLV VAHARLR... GLR.....TA FSVHNLQYQG
CT798ANIV HLHDWHTGLV AGLLKQQPCS QLQ....KIV LTLHNFGYRG
CAD17393AFDIV QAHDWHAALV PLLVKRAGRP VK.....TV LTVHNLAFQG
CAC69955GEDVIF VANDWHTALI SCYMKSMYQS IGIFRNAKVV FCIHNIAFQG
CAC49811A ..HDWHAAMSLLYLK YAGDDTIPRV LTVHNLAFQG
CAC47425V ..HDWQTALTPVYMR FGPAPDLPTV MTIHNIAFQG
CAC08537SII HVHDWHSVIA GVTAKFTFEA RRVIVPLVFT VHLLNKVSAP
BS_glgAT ..HDWHTAMV NYLLKEEYRK HPFYERMKSV LTIHNLQFQG
BH1085C ..HDWQSGLI PAYMKTGSVE NP....VPTV FTIHNLRQYQG
BAB79770C ..NDWQTGMI PVLHKLEYSK DPFYKNIKTV TSIHNLLFQG
BAB54020A ..HDWQSAMTLAYMR YGKAVGTSPM MTVHNLAFQG
BAA99156ADIV HLHDWHVGLL AGLLKNPLNP VHS....KIV FTIHNFGYRG
BAA82346GEDVIF VANDWHTALL PCYLKSMYQT RGVYRNTKVA FCIHNISYQG
aq_721VV HANDWQTALI PLFLKEVFKT PVK.....TV FTIHNLAYQG
AF433156_1GEDCVF VANDWHSALV PVLLKDEYQP KGQFTKAKSV LAIHNIAFQG
AF432915_1PDII HCHDWSSAPV AWLFKEQYQA NGLSN.GRVV FTIHNLEFG.
AF395537_1NLVF IANDWHTALL PVCLKAYYRD NGLMQYTRSV LVIHNIAHQG
AF383878_1NLVF LANDWHTALL PVYLKAYYHD NGFMIYARSV LVIHNIAHQG
AF234163_1SCMF VVNDWHASLV PVLLAAKYRP YGVYRDSRST LVIHNLAHQG
AF210699_1GEDVVF VANDWHTAVL PCYLKTIYQP KGIYTNKVV LCIHNIAFQG
AF173900_1NLAF IANDWHTALL PVYLKAYYRD NGLMQYTRSV LVIHNIAHQG
AE004643_6LV HANDWPSALT PAYMAWNGVR TP.....SL FTIHNLAYQG
AAL64907DLI HINDWPTVLA GVALKDLGER RG...LAIPT LFTIHLSDWY
AAK28335LVWA HFHEWQAGVG LILCRLWKL N VSTVFTTHAT LLGRHLCAG.
AAF39055ADIV HLHDWHVGLV AGLLKQQPCP QLQ....KIV LTLHNFGYRG
AAD45815NCMF VVNDWHASLV PVLLAAKYRP YGVYKDSRSI LVIHNLAHQG
AAC70779GEDVVF VANDWHTALL PCYLKSLYKS KGIYKSAKVA FCIHNIAFQG

VC1726	IFSYHQLEVI	PELNLSGMEF	LQYGHDH...
UGST_WHEAT	RFSFDDFAQL	NLPDRFKSSF	DFIDGYDKPV	EGR.....
UGST_SORBI	RFAFSDFPEL	NLPERFKSSF	DFIDGYEKPV	EGR.....
UGST_ORYGL	RFAFEDYPEL	NLSERFRSSF	DFIDGYDTPV	EGR.....
UGST_MANES	RFAFSDFPRL	NLPDKFKSSF	DFIDGYEKPV	KGR.....
UGST_MAIZE	RFAFSDYPEL	NLPERFKSSF	DFIDGYEKPV	EGR.....
UGST_ANTMA	RFGSSDFCLL	NLPDQFKSSF	DFFDGYEKPV	KGR.....
UGS4_SOLTU
UGS3_SOLTU	RGPLEDFSYV	DLPPHYMDPF	KLYDPVG...GE
UGS2_WHEAT	VEPASTYPDL	GLPPEWYGAL	EWVFPEWARR	HALDK.....GE
UGS2_SOLTU	VEPAVTYNNL	GLPPQWYGAV	EWIFPTWARA	HALDT.....GE
TM0895	VFDPKYLSFA	GLPDYVYTID	G.LEFYG...
s111393	IAGANILHAT	GLNNDSSYYFS	YDRLQDNFNP	N.....
s110945	PWRGLLETMT	WCP.....	..WYMQG...
Q9SEI7	VEPAATYTNL	GLPSEWYGAV	GWVFPTWART	HALDT.....GE
Q43012	RFAFEDYPEL	NLSERFKSSF	DFIDGYDTPV	EGR.....
PM0544	QFAYHHLVEI	GLPAGMFHVD	G.LELHG...
PH0069	KIPAFYFHEA	GLP.....	.ELAPYP...
PAB2292	KLPAFYFHEA	GLS.....	.ELAPYP...
065365	RGPMDDFSIV	DLPAQYADLF	KLYDPVG...GD
064927	ETRQDEFFFT	GVPGENFATI	DKALDERTIG	HNP.....E
064926	RGPFVSEHL	ELNEEYRERF	RLYDPIG...GE
064923
049064	VEPASTYPDL	GLPPEWYGAL	EWVFPEWARR	HALDK.....GE
048900	RGPVDDFVNF	DLPEHYIDHF	KLYDNIG...GD
048899	RGPVDFPYM	DLPEHYLQHF	ELYDPVG...GE
024206	VEPASTYPDL	GLPPEWYGAL	EWVFPEWARR	HALDK.....GE
NP_484075	IGGVKTLWAT	GLNREAYYFQ	DDKLRDDHNP	F.....
MJ1606	EVMTFLELGI	KYADAVNTVS	PSHAEEIKN.
L98347	LMHGDAELSE	FGMGMERYFE	GVVRHNG...
HI1360	QFSYHHLYEI	GLPTGMFHVE	G.LELFG...
GYS_NEUCR	SVDFYNNLQW	FDVDAEAGKR	GIYHRYCIER	AAAHSAD...V
GYS_DROME	NTDFYNNLDK	FAVDEEAGKR	QIYHRYCLER	GATHLAH...V
GYS_CAEEL	GADLYNNLDS	FDLDAEAGKR	KIYHQYCLER	AACQTAH...I
GYS2_YEAST	SFDFYNCLER	VDVDHEAGRF	GIYHRYCIER	AAAHSAD...V
GYS2_RAT	NIDFYNQLDK	FNIDKEAGER	QIYHRYCMER	ASVHCAH...V
GYS2_HUMAN	NIDFYNHLDK	FNIDKEAGER	QIYHRYCMER	ASVHCAH...V
GYS1_YEAST	DVDFYNNLQY	FDVDQEAGKR	GIYHRYCIER	AAAHTAD...V
GYS1_RABIT	AVDFYNNLEN	FNVDKEAGER	QIYHRYCMER	AAAHAH...V
GYS1_MOUSE	AVDFYNNLEN	FIVDKEAGER	QIYHRYCMER	AAAHAH...V
GYS1_HUMAN	AVDFYNNLEN	FNVDKEAGER	QIYHRYCMER	AAAHAH...V
GLGA_RHITR	QFGADIFPGL	RLPAHAFSVE	G.IEYYG...
GLGA_AGRTU	QFGANIFSKL	ALPAHAFGME	G.IEYYN...
glgA	MFYAHHMNDI	QLPWSFFNIH	G.LEFNG...
DR0594	RWNLHEAAGW	TGLPDWTFGP	DGVEFFG...
CT798	YTTREILEAS	SLN....EFY	ISQYQLFRDP	Q.....
CAD17393	NFPRIAQDL	GLPPEAVREA	G...FFG...
CAC69955	RFAFTDYSLL	NLPDQFKSSF	DFLDGHVKPI	VGR.....
CAC49811	QFPAHYFPEL	GLPAEAYSID	G.VEYYG...
CAC47425	QFGASVFPPEL	ALPPDAFSTQ	F.VEYYG...
CAC08537	.WHYASEDWS	GLMNYPHYIW	RIIKHDLYTT	REVWDFFS..
BS_glgA	IFPPDVTHDL	LGLEMDHFHY	ERLECNNG...
BH1085	AFPPDVFREL	LHFAPHFAG	.LEMDG...
BAB79770	NFSADVLPPEL	FGYDYEPVRN	GSLEFYG...
BAB54020	QFGAGIFGEL	GLPAVAMALD	G.VEYYG...
BAA99156	YCSTQLLAAS	QID...DFH	LSHYQLFRDP	Q.....
BAA82346	RHPFEDFPLL	NLPNEYRSAF	DFTDGHLKPV	RGR.....
aq_721	LFPKETVERV	GIPPYLFHME	AVEFWG....
AF433156_1	RMWEEAFKDT	KLPQAADFCL	AFSDGYAKVY	TEATPMEEDE	KPPLTGKTYK
AF432915_1
AF395537_1	RGPVDDFATM	DLPEHYIDHF	RLYDPVG...GE

AF383878_1	RGPLDDFSYL	DLPVDYMDLF	KLYDPFG...GD
AF234163_1	VEPASTYPDL	GLPPEWYGAL	EWVFPEWARR	HALDK.....GE
AF210699_1	RFAFSDFYKL	NLPDQLKSSF	DFMDGYEKPV	KGR.....
AF173900_1	RGPSGDFSIV	GLPEHYIDLF	KLHDPIDG...GD
AE004643_6	LCDLQCSAEL	GLPDEALSHE	SMEFHGR...
AAL64907	SFPWHYAEWS	GLANRQHLVW	RVCCHRFEHY	SAVWDEG...
AAK28335	GADLYNNIDK	FSVDNEAGKK	NIYHRYCIER	AAVNMAH...T
AAF39055	YTTREVLEAS	SLN....EFY	LSHYQLFRDP	Q.....
AAD45815	VEPASTYPDL	GLPPEWYGAL	EWVFPEWARR	HALDK.....GE
AAC70779	RHAFSDLSLL	NLPNEFRSSF	DFIDGYDKPV	KGR.....

1501

1550

VC1726	.VSMLRAGIA	FADKVNVAVSP	NYAAELLTPL	GAHGLVDDFV	RRAR...DL
UGST_WHEAT	KINWMKAGIL	QADKVLTVSP	YYAEELISGE	ARGCELDNIM	RLTG....I
UGST_SORBI	KINWMKAGIL	EADRVLTVSP	YYAEELISGI	ARGCELDNIM	RLTG....I
UGST_ORYGL	KINWMKAGIL	EADRVLTVSP	YYAEELISGI	ARGCELDNIM	RLTG....I
UGST_MANES	KINWMKAGIL	ESDRVLTVSP	YYAQEVISGV	ERGVELDNFI	RKTG....I
UGST_MAIZE	KINWMKAGIL	EADRVLTVSP	YYAEELISGI	ARGCELDNIM	RLTG....I
UGST_ANTMA	KINWMKAGIL	ESDRVTVSP	YYAMELVSGA	EKGVELDNVI	AKTS....I
UGS4_SOLTU	.ADLIGRAMT	NADKATTVSP	TYSQEVSG..N	PVIAPHLHKF
UGS3_SOLTU	HFNIFAAGLK	TADRVVTVSH	GYSWELKTSQ	G.GWGLHQII	NEND...WKL
UGS2_WHEAT	AVNFLKGAVV	TADRIVTVSQ	GYSWEVTTAE	G.GQGLNELL	SSRK...SVL
UGS2_SOLTU	TVNVLKGAIA	VADRILTVSQ	GYSWEITTPPE	G.GYGLHELL	SSRQ...SVL
TM0895	QLNFLKGGIV	FSDVINTVSP	TYAEEIQTEE	Y.GEKLGDVVL	RMR...SK.DL
s111393	AINFMKGGIV	YSNYVNTVSP	HHAWEARFSD	I....SCGLG	HTLEIHQQKF
s110945	.DNVMAAIIQ	FANRVTTVSP	TYAQIQTPA	Y.GEKLEGLL	SYLSG...NL
Q9SEI7	AVNVLKGAIV	TSDRIITVSQ	GYAWEITTVE	G.GYGLQDLL	SSRK...SVI
Q43012	KINWMKAGIL	ESDRVLTVSP	YYAEELISGI	ARGCELDNIM	RLTG....I
PM0544	QISYLKAGLY	YSDAVTAVSP	TYAKEITTPPE	F.GYGLQGLL	TTLNSQG.KL
PH0069	DLDPHTGGY	IADIVTTVSR	GYLLEWDFD	R.....N..	.FNG...KV
PAB2292	DIDPEHTGGY	IADIVTTVSR	GYLIDEWGFF	R.....N..	.FEG...KI
O65365	HFNIFAAGLK	TADRVVTVSH	GYAWELKTSE	G.GWGLNGIR	NENE...WKL
O64927	RLNLMKGGIV	YCNVAVTVSP	TYANEVLNGG	AAGWLRSTFA	RPELR...SKF
O64926	HMNVMKAGLE	CAHRLVAVSK	CYAWECQTVPE	G.GWGLHEVI	KVNN...WKL
O64923	.AHHIGKAMR	YCDKATTVSN	TYSKEVSG..H	GAIVPHLGKF
O49064	AVNFLKGAVV	TADRIVTVSK	GYSWEVTTAE	G.GQGLNELL	SSRK...SVL
O48900	HSNVFAAGLK	TADRVVTVSN	GYMWELKTSE	G.GWGLHDI	NQND...WKL
O48899	HANIFAAGLK	MADRVVTVSR	GYLWELKTVE	G.GWGLHDI	RSND...WKI
O24206	AVNFLKGAVV	TADRIVTVSQ	GYSWEVTTAE	G.GQGLNELL	SSRK...SVL
NP_484075	ALNYMKGGIV	YSNAVTTVSP	NHALEAQYTD	V....GCGLG	HTLYLHKEKF
MJ1606	.YPYIKKYL	NKPF CGILNG	IDIDEYDPMK	I IERM CNLSN	NKLDPRNYAY
L98347	MLNMLKTGIL	YADRVNTVSP	TYAKEIQTSE	F.GCGLESIL	QYV...DG.KV
HI1360	QISYLKAGLY	YSDASTAVSP	TYAQEITTPPE	F.AYGLQGLL	SGLQAQG.RL
GYS_NEUCR	FTTVSHITAY	ESEHLLKRKP	DGVLPNGLNV	TKFSAMHEFQ	NLHQQNKEKI
GYS_DROME	FTTVSEITGY	EAEHLLKRKP	DIITPNGLNV	KKFSAIHEFQ	NLHAVAKEKI
GYS_CAEEL	FTTVSEITGL	EAEHFLCRKP	DVLT PNGLNV	VKFAALHEFQ	NLHAQNKEKI
GYS2_YEAST	FTTVSQITAF	EAEHLLKRKP	DGILPNGLNV	IKFQAFHEFQ	NLHALKKEKI
GYS2_RAT	FTTVSEITAI	EADDMLKRKP	DVVT PNGLNV	KKFSAVHEFQ	NLHATYKARI
GYS2_HUMAN	FTTVSEITAI	EAEHMLKRKP	DVVT PNGLNV	KKFSAVHEFQ	NLHAMYKARI
GYS1_YEAST	FTTVSQITAL	EAEHLLKRKP	DGILPNGLNV	VKFQAVHEFQ	NLHALKDKI
GYS1_RABIT	FTTVSQITAI	EAQHLLKRKP	DIVTPNGLNV	KKFSAMHEFQ	NLHAQSKARI
GYS1_MOUSE	FTTVSQITAI	EAQHLLKRKP	DIVTPNGLNV	KKFSAMHEFQ	NLHAQSKARI
GYS1_HUMAN	FTTVSQITAI	EAQHLLKRKP	DIVTPNGLNV	KKFSAMHEFQ	NLHAQSKARI
GLGA_RHITR	DVGFLKGGLO	TAHALTTVSP	SYAEEILTPE	F.GMGLEGVI	ASK..AY.NL
GLGA_AGRTU	DVSFLKGGLO	TATALSTVSP	SYAEEILTAE	F.GMGLEGVI	GSR..AH.VL
glgA	QISFLKAGLY	YADHITAVSP	TYAREITEPQ	F.AYGMEGLL	QQRHREG.RL
DR0594	DLNLMKAGLN	FAGHVTTVSP	TYAQEITTPQ	Y.GEGLEGLL	VRLTHEG.RL
CT798	TCVLLKGALY	CSDFVTTVSP	TYAKEILEDY	S....DYEIH	DAITARQHHL
CAD17393	QFSFLKAGLM	WADRITTVSR	TYAREILTDA	F.GYGMQDVL	RARR...HDL
CAC69955	KINWMKAGII	ESHRVLTVSP	YYAQELVSGP	DKGVELDNIL	RRVG....V
CAC49811	DIGFLKGGLO	AADAITTVSP	TYAREIMSPA	F.GMGLEGVM	NER..HA.DV

CAC47425	DVGFLKGGLO	TASAITTVSP	SYAQEILTPE	F.GMGLDGLL	SSR..VA.DL
CAC08537	SGSIEKFGSY	EADLITSVSK	SYLTYDIFNF	IGNWIENKSC	IHYN.GTDWE
BS_glgA	FVNFMKAGII	AADHVTTVSP	TYRNEIMTPY	Y.GEQLEQVL	QYR..ED.DV
BH1085	AINFLKGALV	HSDRVTTVSP	TYAQEIQTPE	F.GEGLHGLL	HQE..RG.KT
BAB79770	GMSFMKGAIN	YSDRILTVE	TYAKEIKTPY	F.GENLDGLL	RER..GY.AL
BAB54020	GVGFLKAGLQ	AAWAITTVSP	TYAQEIRSPE	F.GMGLDGLI	NMR..SS.DL
BAA99156	TSVLMKGALY	CSDYITTVSL	TYVQEIINDY	S....DYELH	DAILARNSVF
BAA82346	KINWMKAAAIL	ESDLVLTVSP	YYAKELVSGE	DRGVELDNII	RKTG.....V
aq_721	LVNFMKGGIV	FSDLITTVSP	TYAKEIQTQE	Y.GYGLEGVL	KKYS...YKL
AF433156_1	KINWLKGGII	AADKLVTVSP	NYATEIAADA	AGGVELDTVI	RAKG.....I
AF432915_1	.AHHIGKAMA	RCDKATTVSY	TYSREVSG..H	GAIAPHFSKF
AF395537_1	HSNVFAAGLK	MADRAVTVSH	GYLWEIKTMD	G.GWGLHEII	NHND...WKL
AF383878_1	HLNIFAAGIK	AADRLTVSH	GYAWELKTAE	G.GWGLHGII	NESD...WKF
AF234163_1	AVNFLKGAVV	TADRIVTVSQ	GYSWEVTTAE	G.GQGLNELL	SSRK...SVL
AF210699_1	KINWMKAGII	ESDRVLTVSP	YYANELVSGP	DKGVELDNIL	RKCT.....V
AF173900_1	HFNIFAPGLK	VADRVVTVSH	GYAWELKTSE	G.GWGLHNII	NENH...WKL
AE004643_6	.LSFLKAGIA	HAHHITTVSE	TYAQEITTPPE	Y.GCGLHGIL	KYKVE.KRQL
AAL64907	WGSVERFGVV	EADIVSTVSY	GYLEELLRKY	G.....DWI	REKS.....
AAK28335	FTTVSDITGL	EAHELLKRKP	DIITPNGLNV	IKFAALHEFQ	NLHAMAKEKV
AAF39055	TCVLLKGALY	CSDFVTTVSP	TYAKEILQDY	S....DYEIH	DAITARQHHL
AAD45815	AVNFLKGAVV	TADRIVTVSK	GYSWEVTTAE	G.GQGLNELL	SSRK...SVL
AAC70779	KINWMKAGVL	ESDRVFTVSP	YYAKELVSGE	DRGVELDNII	RSIG.....I

1551

1600

VC1726	HGIVNGCDYS	EWNPRTDHYL	P...ATYSDE	PESMRKGGAL	CKTALQEEELH
UGST_WHEAT	TGIVNGMDVS	EWDPKDKFLL	T....VNYD	VTTALEGKAL	NKEALQAEVGG
UGST_SORBI	TGIVNGMDVS	EWDPKDKYI	A....VKYD	VSTAVEAKAL	NKEALQAEVGG
UGST_ORYGL	TGIVNGMDVS	EWDPKDKYI	T....AKYD	ATTAIEAKAL	NKEALQAEAG
UGST_MANES	AGIINGMDVQ	EWNPVTDKYI	D....IHVD	ATTVMADAKPL	LKEALQAEVGG
UGST_MAIZE	TGIVNGMDVS	EWDPKDKYI	A....VKYD	VSTAVEAKAL	NKEALQAEVGG
UGST_ANTMA	TGIVNGMDTQ	EWNPATDKHI	D....TNYD	ITTVMDAKPL	LKEALQAAVGG
UGS4_SOLTU	HGIVNGIDPD	IWDPLNDKFI	PIPYTSENVV	E.....GKT	AAKEALQKRL
UGS3_SOLTU	QGIVNGIDTK	EWNPELDVHL	PRSDGYMNY	LDTLQGTGKPK	CKAALQKELG
UGS2_WHEAT	NGIVNGIDIN	DWNPTTDKCL	P....HHYS	VDDLGS.KAK	CKAELQKELG
UGS2_SOLTU	NGITNGIDVN	DWNPTSTDEHI	A....SHYS	INDLSG.KVQ	CKTDLQKELG
TM0895	YGILNGIDYE	LYNPATDRYI	Y....VNYD	VNRLEL.KWE	NKVKLQEEELG
s111393	GGILNGLDYE	VWNPEIDPLL	ASNFSVKTFG	D.....KAK	NKQALRERLL
s110945	VGILNGIDTE	IYNPAEDRFI	S....NVF	DADSLDKRVK	NKIAIQEETG
Q9SEI7	NGITNGINVD	EWNPTSTDEHI	P....FHYS	ADDVSE.KIK	CKMALQKELG
Q43012	TGIVNGMDVS	EWDPKDKYI	T....TKYD	ATTAIEAKAL	NKEALQAEAG
PM0544	VGILNGVDDQ	IWHPNHDAYI	E....HHYK	LKAMTG.KRK	NKEALQAYFN
PH0069	TYVFNGIDCS	FWNENYLKGS	R.....KE	RRSSILAKFG
PAB2292	TYVFNGIDCS	FWNESYLTGS	R.....DE	RKKSLLSKFG
065365	QGIVNGIDIE	EWNPQLDVYL	K.SDGYANYS	LDTLQGTGKPK	CKAALQKEMN
064927	HGILNGIDCE	EWNPATDALL	P....ANFD	ADRPAG.KAL	CKEFLQKGLG
064926	RGIVNGIDYK	EWNPICDEFLL	T.TDGYAHYD	VDTLAEGKAK	CKAALQKELG
064923	YGILNGIDPD	IWDPYNDNFI	PVHYTCENVV	E.....GKR	AAKRALQKQF
049064	NGIVNGIDIN	DWNPATDKCI	P....CHYS	VDDLGS.KAK	CKGALQKELG
048900	QGIVNGIDMS	EWNPAVDVHL	H.SDDYTNYT	FETLDTGKRQ	CKAALQKQLG
048899	NGIVNGIDHQ	EWNPKVDVHL	R.SDGYTNYS	LETLDAGKRQ	CKAALQRELG
024206	NGIVNGIDIN	DWNPTSTDKFL	P....YHYS	VDDLGS.KAK	CKAELQKELG
NP_484075	SGVLNGIDYD	FWNPEIDRHI	PDNYSQDDFE	Q.....KLY	NKKALRERLL
MJ1606	ISPYSAESD	NIKPKIKYSW	FYRGGVYEVV	EDWNKIDKGI	SATDVEVHGG
L98347	SGILNGIDYD	IYNPENDILI	P....YHFS	EEELSG.KGQ	MKAELQKRTG
HI1360	VGILNGVDEN	IWHPNVDQYI	P....HHYK	LKYMAG.KKK	NKAELQAYFN
GYS_NEUCR	HDFVRGHFYG	HYDFEPENTL	YFFTAGRYEF	RNKGVMFIE	SLARLNHRLK
GYS_DROME	NEFVRGHFYG	HIDFDLTKTL	YFFIAGRYEF	GNKGADIFIE	ALARLNAMLK
GYS_CAEEL	NQFIRGHFHG	HLDFDLTKTL	YFFTAGRYEF	SNKGGDMFIE	SLARLNHYLK
GYS2_YEAST	NDFVRGHFYG	CFDFDLNNTL	YFFIAGRYEY	KNKGADMFIE	ALARLNHYLK
GYS2_RAT	QDFVRGHFYG	HLDFDLEKTL	FLFIAGRYEF	SNKGADIFLE	SLSRLNFLLR
GYS2_HUMAN	QDFVRGHFYG	HLDFDLEKTL	FLFIAGRYEF	SNKGADIFLE	SLSRLNFLLR

GYS1_YEAST	NDFVRGHFHG	CFDFDLNNTV	YFFIAGRYEY	KNKGADMFI	SLARLNRYLK
GYS1_RABIT	QEFVRGHFYG	HLDFNLDKTL	YFFIAGRYEF	SNKGADVFL	ALARLNRYLLR
GYS1_MOUSE	QEFVRGHFYG	HLDFNLDKTL	YFFIAGRYEF	SNKGADVFL	ALARLNRYLLR
GYS1_HUMAN	QEFVRGHFYG	HLDFNLDKTL	YFFIAGRYEF	SNKGADVFL	ALARLNRYLLR
GLGA_RHITR	YGIVNGIDAD	IWNPATDPMI	A.....QTYS	AATLKE.RAI	NRHRVVEHFG
GLGA_AGRTU	HGIVNGIDAD	VWNPATDHLI	H.....DNYS	AANLKN.RAL	NKKAVAEHFR
glgA	SGVLNGVDEK	IWSPETDLLL	A.....SRYT	RDTLED.KAE	NKRQLQIAMG
DR0594	SGILNGLDQD	RWNPRTPDI	A.....	AYSDPAGKAG	AVKALRQEFG
CT798	RGILNGIDTT	IWGPETDPNL	AKNYTKELFE	TPSIFFEAKA	ENKKALYERL
CAD17393	VAILNGIDNA	VWNPSKDAYL	S.....RPF	AGNLSG.KHA	AKLQLQTLR
CAC69955	TGIVNGMDVQ	EWNPSTDKYI	S.....IKYD	ASTVLEGGAL	LKEELQAEVG
CAC49811	VGIVNGIDLE	VWDPSSDPCI	E.....HHYS	ARVPLR.RLP	NRQVLLRHFG
CAC47425	TGIVNGIDGE	TWDPQTDPHI	P.....AHYG	PGTLKR.RAG	NRKALEERFG
CAC08537	VEETKKYAYS	KFGTEDRAEI	RKRLFDELEV	LRVTPEDYTT	GNILWNNRFN
BS_glgA	TGILNGIDDT	FYQPKSDPYI	E.....AQYD	SGDLAC.KLE	NKTKLQQRMG
BH1085	RGILNGIDLE	DFDPKTDPHV	T.....YPYK	HNQME..KRK	NKQVIQRLF
BAB79770	KGIVNGIDYD	EFNPSKDSL	A.....KNFS	VKTIED.KVL	NKLALQKELG
BAB54020	YGIVNGIDTA	IWDPETDKHL	V.....SNYT	ATTLKA.RAP	NRAAVEERFG
BAA99156	SGIINGIDED	VWNPKTDPAL	AVQYDASLLS	EPDVLFTKKE	ENRAVLYEKL
BAA82346	AGIVNGMDIR	EWSPKTDKFI	D.....IHFD	TTSVKEAKFL	LKEALQAEVG
aq_721	RGILNGIDYE	VWNPEKDKYI	YQNYSLRNYS	KKFK.....	NKEFLSKELG
AF433156_1	EGIVNGMDIE	EWNPKTDKFL	S.....VPYD	QNSVYAGKAA	AKEALQAEVG
AF432915_1	HGIRNGIDPD	IWDPYSDNFI	PVHYTSENVV	E.....GKS	AAKKALQORL
AF395537_1	QGIVNGIDMA	EWNPVEDEHL	Q.SDGYANYT	FETLDTGKKQ	CKEALQRQLG
AF383878_1	QGIVNGIDTT	DWNPRCDIHL	K.SDGYTNYS	LETVQAGKQQ	CKAALQKELG
AF234163_1	NGIVNGIDIN	DWNPTTDKCL	P.....HHYS	VDDLSG.KAK	CKAALQKELG
AF210699_1	TGIVNGMDTQ	EWNPATDKYI	D.....NHYD	ITTVMDGKPL	LKEALQAEVG
AF173900_1	QGIVNGIDAK	EWNPQFDIQL	T.SDGYTNYS	LETLDTGKPK	CKTALQNELR
AE004643_6	SGIVNGIDDS	WQPHCDPHLV	A.....CF	SARQWAGKRA	NTRYVEERFG
AAL64907	CVIYNSTDWS	ITDVEGVTEA	D.....	...TWRLVE	EVERLGVDGG
AAK28335	HDFVRGHFYG	HLNFDLDKTI	YMFTAGRYEF	TNKGDDFFIE	SLARLNHMLK
AAF39055	KGILNGIDYT	ILDPEKTDPHL	AKNYSKVLFE	DPKAFFEAKA	ENKKALYETL
AAD45815	NGIVNGIDIN	DWNPATDKCI	P.....CHYS	VDDLSG.KAK	CKSALQKELG
AAC70779	TGIVNGMDNR	EWSPQTDRIY	D.....VHYD	ASTVTEAKAI	LKEALQAEVG

1601

1650

VC1726	LPVT.D....VPL	FGMVCRLTHQ	KGFHYLLPIL	E....QFLRN
UGST_WHEAT	LPVDRK....VPL	VAFIGRLEEQ	KGPDVMIAAI	P.E..IVKEE
UGST_SORBI	LPVDRK....IPL	VAFIGRLEEQ	KGPDVMAAAI	P....LLMEE
UGST_ORYGL	LPVDRK....IPL	IAFIGRLEEQ	KGPDVMAAAI	P....ELMQE
UGST_MANES	LPVDRN....VPL	IGFIGRLEEQ	KGSDIFVAAI	S....QLVEH
UGST_MAIZE	LPVDRN....IPL	VAFIGRLEEQ	KGPDVMAAAI	PQL..MEMVE
UGST_ANTMA	LPVDRN....IPV	VAFIGRLEEQ	KGSDILVAAI	S....KRVGL
UGS4_SOLTU	GLKQAD....LPL	VGIITRLTHQ	KGIHLIKHAI	WRT..LERNG
UGS3_SOLTU	LPVRDD....VPL	IGFIGRLDPQ	KGVDLIAEAV	P....WMMGQ
UGS2_WHEAT	LPVRED....VPL	IGFIGRLDYQ	KGIDLIKMAI	P....ELMRE
UGS2_SOLTU	LPIRPD....CPL	IGFIGRLDYQ	KGVDIILSAI	P....ELMQN
TM0895	LPVNKE....TAV	AGLISRLVPQ	KGLDLLVDVM	D.Y..LTLFD
s111393	LETDDK....KPM	LCFIGRLDGQ	KGVHLVHHSI	YYA..LSQGA
s110945	LEINRN....AMV	VGIVARLVEQ	KGIDLVIQIL	DR...FMSYT
Q9SEI7	LPIRPE....CPM	IGFIGRLDYQ	KGIDLITAG	P....DLMVD
Q43012	LPVDRK....VPL	IAFIGRLEEQ	KGPDVMAAAI	P....ELMQE
PM0544	LPQDPD....ALL	FVMVTRLTEQ	KGVDLLIDSA	E.E..IVKQG
PH0069	MSDGIT....FMF	IGRFDRR..Q	KGVDTLRLAI	ELLSERPEFK
PAB2292	MDEGVT....FMF	IGRFDRG..Q	KGVDVLLKAI	EILSSKKEFQ
O65365	LPVRDD....VPL	IGFIGRLDHQ	KGVDLIAEAI	P....WMMGQ
O64927	LEVDPD....KPL	VAVVSRLVPQ	KGIHLIKAAL	FR...TVEK
O64926	LPVDPD....APM	LGFIGRLDYQ	KGVDLIRDNY	D....YIMGE
O64923	GLQQID....VPV	VGIVTRLTAQ	KGIHLIKHAI	HRT..LERNG
O49064	LPIRPD....VPL	IGFIGRLDYQ	KGIDLILQII	P....DLMRE
O48900	LQVRDD....VPL	IGFIGRLDHQ	KGVDIIADAI	H....WIAGQ

O48899	LEVRDD....VPL	LGFIGRLDGQ	KGVDIIGDAM	P....WIAGQ
O24206	LPIRPD....VPL	IGFIGRLDYQ	KGIDLIKLAI	P....DLMRD
NP_484075	LQAADK....PI	IAYIGRLDNQ	KGVHLVHHAI	YHA..LNKGA
MJ1606	VDGDIET...PL	IGFVGRATHQ	KGFNMTFEAI	P...ELLEKH
L98347	LPLNPN....VPL	IGMVSRLTNQ	KGFDLVLSQL	E.K..VLEEN
HI1360	LPQDES....ALA	FVMVTRLTEQ	KGVDLLIESA	D.E..IVKQG
GYS_NEUCR	TAGS....KT	TVVAFIIMPA	QTTSLTVEAL	KGQAVIKSLR	DTVVDIERGI
GYS_DROME	HEKP....DT	TVVAFILIFPT	KTNNFNVDLSL	RGHAVIKQLR	DTINNVQQAV
GYS_CAEEL	TTSDPRHMGV	TVVAFLIYPA	PANSFNVESL	KGQAVTKQLK	EAVDRIKEKV
GYS2_YEAST	VSGS...KK	TVVAFIVMPA	KNNSFTVEAL	KGQAEVRALE	NTVHEVTTSI
GYS2_RAT	MHKS...NV	TVVVFVIMPA	KTNNFNVETL	KGQAVRKQLW	DTVHCMKEKF
GYS2_HUMAN	MHKS...DI	TVVVFVIMPA	KTNNFNVETL	KGQAVRKQLW	DVAHSVKEKF
GYS1_YEAST	VSGS...KK	TVVAFIIMPA	KTNSFTVEAL	KSQAIVKSLE	NTVNEVTASI
GYS1_RABIT	VNGS...EQ	TVVAFFIMPA	RTNNFNVETL	KGQAVRKQLW	DTANTVKEKF
GYS1_MOUSE	VNGS...EQ	TVVAFFIMPA	RTNNFNVETL	KGQAVRKQLW	DTANTVKEKF
GYS1_HUMAN	VNGS...EQ	TVVAFFIMPA	RTNNFNVETL	KGQAVRKQLW	DTANTVKEKF
GLGA_RHITR	LEEDD.....GPI	FCVVSRLTWQ	KGMDILAEVA	S.E..VVHMG
GLGA_AGRTU	IDDDG.....SPL	FCVISRLTWQ	KGIDLMAEAV	D.E..IVSLG
glgA	LKVDDK....VPL	FAVVSRLTSQ	KGLDLVLEAL	P.G..LLEQG
DR0594	LDDA.....PI	LATVSRLADQ	KGMDLLITAL	P....ELVR
CT798	GLSLEH....SPC	VCIISRIAEQ	KGPHFMKQAI	LHA..LENAY
CAD17393	LPKDAH....APL	LALGSRLTHQ	KMADVALQAL	P..QMLEAHP
CAC69955	LPVDKN....VPL	IAFIGRLEEQ	KGSDILVEAI	P....QFIKE
CAC49811	LPDTC.....GPI	FASVNRLTWQ	KGMDLLAATA	G.E..IVKNG
CAC47425	LEKGP.....GPI	FCVISRLTWQ	KGMDLVAEAA	D.D..IVALG
CAC08537	IGIKDDWTYS	RLEN...GPL	ILFAGRMVYQ	KGIDSLLI AF	D..EVLK TIN
BS_glgA	LPEKND....IPL	ISMVTRLTKQ	KGLDLVRRIM	H.E..LLEEQ
BH1085	LPERKD....IPL	IAMVSRLVEE	KGVPLLTQIA	G.E..LVTTE
BAB79770	LPINPD....IPM	ISIVSRLTNQ	KGCDLIVNIA	N.R..LLQRN
BAB54020	LDRDD....SPI	VCVISRLTWQ	KGMDILATVI	D.G..IVATG
BAA99156	GISSDY....FPL	ICVISRIVEE	KGPEFMKEII	LHA..MEHSY
BAA82346	LPVNRD....IPL	IGFIGRLEEQ	KGSDILVEAI	P....KFIDQ
aq_721	IEAEK.....PL	ISFINRFTHQ	KGVELILNCA	E....EMSKL
AF433156_1	LPVDPT....APL	FAFIGRLEEQ	KGVDIILAAL	P.K..ILATP
AF432915_1	GLQQT.....TPV	VGIISRLTVQ	KGIHLIKHAI	YRT..LERNG
AF395537_1	LQVRDD....VPL	IGFIGRLDHQ	KGVDIIGDAM	P....WIAGQ
AF383878_1	LPVRGD....VPV	IAFIGRLDHQ	KGVDLIAEAM	P....WIAGQ
AF234163_1	LPVRED....VPL	IGFIGRLDYQ	KGIDLIKMAI	P....DLMRE
AF210699_1	LPVDRN....VPL	VGFIGRLEEQ	KGSDILVAAL	H....KFIEM
AF173900_1	FAIPPD....VPV	IGFIGRLDYQ	KGVDLIAEAI	P....WMVGQ
AE004643_6	LEPGKG....PL	FAVVSRLVQ	KGIDLTLEIS	D....ALLQA
AAL64907	LDKNG.....AL	FLAVGRVASQ	KGFDIAIKAL	D.....YAP
AAK28335	TSTDPRCKDV	TVIAFIIYPA	AANSFNVESL	KGQAVCKQLK	DTISKIQENV
AAF39055	GLSLDK....SPC	MCIISRIAEQ	KGPEFMKQAI	LHA..LENAY
AAD45815	LPIRPE....VPL	IGFIGRLDYQ	KGIDLIQLII	P....HLMRD
AAC70779	LPVDRN....IPV	IGFIGRLEEQ	KGSDILVESI	P....KFIDQ

1651

1700

VC1726	NVQVVIVGTGEPEVAARL	NKIAH.....
UGST_WHEAT	DVQIVLLGTGKKKFERLL	KSVEE.....
UGST_SORBI	DIQIVLLGTGKKKFERML	MSAEE.....
UGST_ORYGL	DVQIVLLGTGKKKFEKLL	KSMEE.....
UGST_MANES	NVQIVILGTGKKKFEKQI	EHLEV.....
UGST_MAIZE	DVQIVLLGTGKKKFERML	MSAEE.....
UGST_ANTMA	DVQIIILGTGKKKFEQQI	QELEV.....
UGS4_SOLTU	..QVVLLGSA	P.....DP	RVQNNFVNLA	NQLHS.....
UGS3_SOLTU	DVQLVMLGTGRRDLEQML	RQFEC.....
UGS2_WHEAT	DVQFVMLGSGDPIFEGWM	RSTES.....
UGS2_SOLTU	DVQVVMLGSGEKQYEDWM	RHTEN.....
TM0895	..LQIVVLGTGDEQYENAF	RKFQE.....
s111393	..QFVLLGSA	T.....EP	NLSKWFWHEK	QHLN.....

s110945	DSQLIILGTGDRHYETQL	WQMAS.....
Q9SEI7	DIQFVMLGSGDPKYESWM	RSMEE.....
Q43012	NVQIVLLGTGKKKFEKLL	KSMEE.....
PM0544	.GQLTILGSGSPHLEAGI	LHLAQ.....
PH0069	EMRFIIIGMGDPELENWA	RELEK.....
PAB2292	EMRFIIIGKGDPELEGWA	RSLEE.....
O65365	DVQLVMLGTGRPDLEQML	KQIEG.....
O64927	GGQFVLLGSGHSDPAFR	QLADG.....
O64926	KCQLVMLGSGRQDLEDAL	RDMEN.....
O64923	..QVVLLGSA	P.....DS	RIQADFNLA	NTLHG.....
O49064	DVQFVMLGSGDPELEDWM	RSTES.....
O48900	DVQLVMLGTGRADLEDML	RRFES.....
O48899	DVQLVMLGTGRADLERML	QHLEK.....
O24206	NIQFVMLGSGDPGFEGWM	RSTES.....
NP_484075	..QFVLLGSA	T.....EA	GINAHFRHEK	QFLN.....
MJ1606	DIRFVFLTKGDRDIEERL	KNLAN.....
L98347	.VQIVLLGTGFPEIEEGF	RYFSQ.....
HI1360	.GQLMILGSGAPHLEQGI	RELAE.....
GYS_NEUCR	GRRIFERSVK	WHEGDPLPEE	...KELITS	QDRVLLRRRL	FAMKR...HTL
GYS_DROME	GKRMFDTCLO	G.....NI	P.NADDLLQK	DDLVKIKRCM	FAMQR...DSM
GYS_CAEEL	GQRIFDICLO	G.....HL	P.EPEELMSP	ADNILLKRCI	MSLHN...SSL
GYS2_YEAST	GKRIFDHAIK	YPHNGLTTEL	PTDLGELLKS	SDKVMLKRRR	LALRRPEGQL
GYS2_RAT	GKKLYDGLLR	G.....EI	P.DMNSILDR	DDLTIMKRAI	FSTQR...HSL
GYS2_HUMAN	GKKLYDALLR	G.....EI	P.DLNDILDR	DDLTIMKRAI	FSTQR...QSL
GYS1_YEAST	GKRIFEHTMR	YPHNGLESEL	PTNLDELLKS	SEKVLLKKRV	LALRRPYGEL
GYS1_RABIT	GRKLYESLLV	G.....SL	P.DMNKMLDK	EDFTMMKRAI	FATQR...QSF
GYS1_MOUSE	GRKLYESLLV	G.....SL	P.DMNKMLDK	EDFTMMKRAI	FATQR...QSF
GYS1_HUMAN	GRKLYESLLV	G.....SL	P.DMNKMLDK	EDFTMMKRAI	FATQR...QSF
GLGA_RHITR	.GKLAILGAGDAALEGAL	FAAAG.....
GLGA_AGRTU	.GRLVVLGAGDVALEGAL	LAAAS.....
glgA	.GQLALLGAGDPVLQEGF	LAAAA.....
DR0594	DWNVVVLGGGDPLLEAAL	TGWAN.....
CT798	..TLIIIIGTC	Y.....GN	QLHEEFANLQ	ESLAN.....
CAD17393	DLQVAVLGCGERRYESAM	AALAER.....
CAC69955	NVQIVALGTGKKEMEKQL	QQLEI.....
CAC49811	.GTLIIHGQGEEKLEAAF	MDLMR.....
CAC47425	.GKLVVLGSGDPALESAL	MAAAS.....
CAC08537	NARLIILGLP	S.....	SDYGLLQNVV	SNISR.....
BS_glgA	DIQLVVLGTGEREFEDYF	RYAEF.....
BH1085	NVQLAILGTGDPSLEDQL	HHLAS.....
BAB79770	.VQLVILGTGDYNYENHF	KGLQE.....
BAB54020	.ARLAILGSGDAGLEGAL	LAAAA.....
BAA99156	..AFILIGTS	Q.....NE	VLLNEFRNLQ	DCLAS.....
BAA82346	NVQIIILGTGKKSMEKQI	EQLEE.....
aq_721	NANFVFLGTGEYENAFV	DVSK.....
AF433156_1	KVQIAILGTGKAAYEKLK	NAIGT.....
AF432915_1	..QVVLLGSA	P.....DH	RIQGDFTNLA	SKLHG.....
AF395537_1	DVQVVMLGTGRPDLEEML	RRFES.....
AF383878_1	DVQLIMLGTGRQDLEDTL	RRLES.....
AF234163_1	DVQFVMLGSGDPVFEGWM	RSTES.....
AF210699_1	DVQVVILGTGKKEFEKQI	EQLEE.....
AF173900_1	DVQLVMLGTGRQDLEEML	RQFEN.....
AE004643_6	GGRLVSIKRGEPNLEKAM	LELAR.....
AAL64907	HARLLILGMP	AG.....ERGYEYI	RGLVWE.....
AAK28335	ASRMFESCVR	G.....QI	P.ERDDLHP	AEMVQLKRCI	LAARR...DGL
AAF39055	..TLIIIIGTC	Y.....GG	QIHKEFSNLQ	ESLAD.....
AAD45815	DVQFVMLGSGDPELEDWM	RSTES.....
AAC70779	NVQIIIVLGTGKKIMEKQI	EQLEV.....
	1701				1750
VC1726YHRA	KFAFVETYS

UGST_WHEATKFPT	KVRAVVRFNA
UGST_SORBIKYPD	KVRAVVKFNA
UGST_ORYGLKYPG	KVRAVVKFNA
UGST_MANESLYPD	KARGVAKFNV
UGST_MAIZEKFPG	KVRAVVKFNA
UGST_ANTMALYPD	KARGVAKFNV
UGS4_SOLTUKYND	RARLCLTYDE
UGS3_SOLTUQHND	KIRGWVGFVS
UGS2_WHEATSYKD	KFRGWVGFVS
UGS2_SOLTULFKD	KFRAWVGFNV
TM0895RYPD	KVSANIKFDV
s111393DNP	NVHLELGFDE
s110945RFPG	RMAVQLLHND
Q9SEI7TYRD	KFRGWVGFNV
Q43012KYPG	KVRAVVKFNA
PM0544QYPH	QIAVKIGYDE
PH0069RYDN	VRVLTEMLSR
PAB2292KHGN	VKVITEMLSR
O65365QYGD	KVRGWVGFVS
O64927QFKDHP	NCRLKIMYSE
O64926RNKN	QCRGWVGFNS
O64923VNHG	QVRLSLTYDE
O49064IFKD	KFRGWVGFVS
O48900EHSD	KVRAWVGFVS
O48899EHPN	KVRGWVGFVS
O24206GYRD	KFRGWVGFVS
NP_484075SNP	DVHLELGFNE
MJ1606EHDG	RILALIGYSL
L98347KYPD	KLSANIAFDI
HI1360RYPQ	NIAVKIGYDE
GYS_NEUCR	PPIVTHNMLN	DHEDPILNQI	RRVQLFNHPS	DRVKIVFHPE	FLSSANPVL	P
GYS_DROME	PPVTTHNVAD	DWNDPVLSSI	RRCHLFNSRH	DRVKMFVHPE	FLTSTNPLFG	
GYS_CAEEL	PPICHTNMIR	.ADDPVLES	RRTSLFNKPE	DRVKVVFHPE	FLSSVSPLIG	
GYS2_YEAST	PPIVTHNMVD	DANDLILNKI	RQVQLFNSSP	DRVKMIFHPE	FLNANNPILG	
GYS2_RAT	PPVTTHNMID	DSTDPIILSTI	RRIGLFNNRT	DRVKVILHPE	FLSSTSPLLP	
GYS2_HUMAN	PPVTTHNMID	DSTDPIILSTI	RRIGLFNNRT	DRVKVILHPE	FLSSTSPLLP	
GYS1_YEAST	PPVVTHNMCD	DANDPILNQI	RHVRLFNDSS	DRVKVIFHPE	FLNANNPILG	
GYS1_RABIT	PPVCTHNMLD	DSSDPILTTI	RRIGLFNSSA	DRVKVIFHPE	FLSSTSPLLP	
GYS1_MOUSE	PPVCTHNMLD	DSSDPILTTI	RRIGLFNSSA	DRVKVIFHPE	FLSSTSPLLP	
GYS1_HUMAN	PPVCTHNMLD	DSSDPILTTI	RRIGLFNSSA	DRVKVIFHPE	FLSSTSPLLP	
GLGA_RHITRRHRG	RVGVVGRHNE
GLGA_AGRTURHHG	RVGVAIGYNE
glgAEYPG	QVGVQIGYHE
DR0594HP	RVAFASGMNE
CT798SP	DVRILLTYSD
CAD17393HPR	RMAAVIGYTE
CAC69955SYPD	KARGVAKFNV
CAC49811RFPQ	NISVSIYDE
CAC47425RNRG	HIGMVTGYDE
CAC08537HGGN	IRIILGKMSK
BS_glgAAFHE	KCRAYIGFDE
BH1085LHPH	QISFKCVFAE
BAB79770LYPT	KVSANIKFDN
BAB54020RHRG	RIGVVIGYDE
BAA99156SP	NIRLILDFND
BAA82346IYPE	KARGIAKFDG
aq_721IYK	NFKVFAEFNE
AF433156_1KYKG	RAKGVVKFSA
AF432915_1EYHG	RVKLCLTYDE
AF395537_1EHND	KVRGWVGFVS
AF383878_1QHYD	RVRGWVGFSI

AF234163_1	SYKD	KFRGWVGFVS
AF210699_1	LYPG	KAVGVAKFNV
AF173900_1	QHRD	KVRGWVGFVS
AE004643_6	RHPG	QVGVHIGFDE
AAL64907	RRGK	AALSMAKIPP
AAK28335	PPICTHNMID	DASDPVLNAF	RKTNLINQHF	DRVKVI	FHPE	FLSSVS	PLIG
AAF39055	SP	NVRILLTYSD
AAD45815	DFKD	KFRGWVGFVS
AAC70779	TYPG	KAIGVAKFNS

1751

1800

VC1726	RLAHWVEAGS	DFFLMPSEFE	ACGLNQUIYSM	AYGTLPIVRE	VGGLKDTVND		
UGST_WHEAT	PLAHQMMAGA	DVLAVTSRFE	PCGLIQLQGM	RYGTPCACAS	TGGLVDTIVE		
UGST_SORBI	ALAHHIMAGA	DLLAVTSRFE	PCGLIQLQGM	RYGTPCACAS	TGGLVDTIE		
UGST_ORYGL	PLAHLIMAGA	DVLAVPSRFE	PCGLIQLQGM	RYGTPCACAS	TGGLVDTVIE		
UGST_MANES	PLAHMITAGA	DFMLVPSRFE	PCGLIQLHAM	RYGTVPIVAS	TGGLVDTVKE		
UGST_MAIZE	ALAHHIMAGA	DVLAVTSRFE	PCGLIQLQGM	RYGTPCACAS	TGGLVDTIE		
UGST_ANTMA	PLAHMITAGA	DFMLVPSRFE	PCGLIQLHAM	RYGTIPICAS	TGGLVDTVTE		
UGS4_SOLTU	PLSHLIYAGA	DFILVPSIFE	PCGLTQLTAM	RYGSIPVVRK	TGGLYDTVFD		
UGS3_SOLTU	KTSHRITAGA	DILLMPSRFE	PCALNQLYAM	KYGTIPVVHA	VGGLRDTVQP		
UGS2_WHEAT	PVSHRITAGC	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	QYGTVPVVHG	TGGLRDTVET		
UGS2_SOLTU	PVSHRITAGC	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	RYGTIPIVHS	TGGLRDTVKD		
TM0895	ELAQKIYAGA	DIFLMPSTRYE	PCGLGQMFMS	RYGTIPVVRY	TGGLADTVKE		
s111393	ELAHLIYAGAA	DIIVVPSNYE	PCGLTQMIGL	RYGAVPVVRG	VGGLVNTVFD		
s110945	ALSRRVYAGA	DVFLMPSRFE	PCGLSQLMAM	RYGCIPIVRR	TGGLVDTVSF		
Q9SEI7	PISHRITAGC	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	RYGTIPVVHG	TGGLRDTVEN		
Q43012	PLAHLIMAGA	DVLAVPSRFE	PCGLIQLQGM	RYGTPCACAS	TGGLVDTVIE		
PM0544	ALSHLMIAGG	DVILVPSRFE	PCGLTQLYGL	KYGTLPVRA	TGGLADTVVN		
PH0069	EFVRELYGSV	DFVIIPSYFE	PFGLVSLEAM	CLGAUPIASS	VGGLRDVIVS		
PAB2292	EFVRELYGSV	DFVIIPSYFE	PFGLVALEAM	CLGAUPIASA	VGGLRDIIT.		
O65365	KTAHRITAGA	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	SYGTVPVVHA	VGGLRDTVQP		
O64927	RLAHMIYAAA	DVVVPSMFEE	PCGLTQMIAL	RYGAVPLVRR	TGGLADTVFD		
O64926	KMAHRITAAA	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	AYGTVPIVHS	VGGLRDTVKQ		
O64923	PLSHLIYAGS	DFILVPSIFE	PCGLTQLVAM	RYGTIPIVRK	TGGLFDTVFD		
O49064	PVSHRITAGC	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	QYGTVPVVHA	TGGLRDTVEN		
O48900	PLAHRITAGA	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	AYGTVPVVHA	VGGLRDTVAP		
O48899	PMHRITAGA	DVLVMPSTRFE	PCGLNQLYAM	AYGTVPVVHA	VGGLRDTVAP		
O24206	PVSHRITAGC	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	QYGTVPVVHG	TGGLRDTVEN		
NP_484075	ELSHLIYAGA	DMIVVPSNYE	PCGLTQMIGL	KYGTVPVIRG	VGGLVNTVFD		
MJ1606	PLSSLVFAGS	DWIIMPSYWE	PCGLVQMEAM	AYCTPVIATE	TGGLKDTIIP		
L98347	QFAQEIYAGS	DFFLMPSAFE	PCGLSQMIAM	RYGTLPIVHE	IGGLKDTVIP		
HI1360	ALSHLMVAGG	DVILVPSRFE	PCGLTQLYGL	QYGTLPVVRK	TGGLADTVVD		
GYS_NEUCR	LDYDEFVRCG	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGVPSITTN	LSGFGCMEEE		
GYS_DROME	IDYEEFVRGC	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGIPSVTTN	LSGFGCMEEE		
GYS_CAEEEL	LDYDEFVRCG	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGIPSVSTN	LSGFGCMEQE		
GYS2_YEAST	LDYDEFVRCG	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGVPISITTN	VSGFGAYMED		
GYS2_RAT	MDYEEFVRGC	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGIPSVTTN	LSGFGCMEQE		
GYS2_HUMAN	MDYEEFVRGC	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGIPSVTTN	LSGFGCMEQE		
GYS1_YEAST	LDYDEFVRCG	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGVPISITTN	VSGFGAYMED		
GYS1_RABIT	VDYEEFVRGC	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGIPSISTN	LSGFGCMEEE		
GYS1_MOUSE	VDYEEFVRGC	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGIPSISTN	LSGFGCMEEE		
GYS1_HUMAN	VDYEEFVRGC	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGIPSISTN	LSGFGCMEEE		
GLGA_RHITR	PMSHLMQAGC	DAIIPSRFE	PCGLTQLYGL	RSGCLPIVAR	TGGLNDTIID		
GLGA_AGRTU	PLSHLMQAGC	DAIIPSRFE	PCGLTQLYAL	RYGCIPVVAR	TGGLADTVID		
glgA	AFSHRIMGGA	DVILVPSRFE	PCGLTQLYGL	KYGTLPVRR	TGGLADTVSD		
DR0594	PLAHRITYAGA	HAFAMPSTRFE	PCGLSQLIAM	RYGTLPIVRE	TGGLADTVPP		
CT798	VLARQIFAAA	DMICIPSMFE	PCGLTQMIGM	RYGTVPLVRA	TGGLADTVAN		
CAD17393	RNAHMLHAGA	DLLLHGSRFE	PCGLTPLYAM	RYGTVPVASR	VGGLVDTIAD		
CAC69955	PLAHMMIAGA	DFILIPSRFE	PCGLIQLQAM	RYGTVPIVAS	TGGLVDTVKE		
CAC49811	HLAHRIHAGA	DAMLVPSRFE	PCGLTQLYAL	RYGCVPVVAR	TGGLSETIID		
CAC47425	PLSHLMQAGA	DAIIPSRFE	PCGLTQLYGL	RYGCVPVVAR	TGGLTDTIID		

CAC08537	ELYRLFYISA	SVFVIPSWE	PFGLVAVESM	AVGTPVVAYS	VGGLRESIVD
BS_g1gA	PLAHQIYAGS	DMFLMPSKFE	PCGLGQLIAL	QYGAIPIVRE	TGGLYDTVRA
BH1085	PLARKLYAGA	DLFIMPSTRFE	PCGLSQMISL	RYETVPIVRE	TGGLYDTIQS
BAB79770	GLAHRIYASS	DIFLMPSLFE	PCGLGQLIAL	RYGAIPIVRE	TGGLKDTIHS
BAB54020	GLSHTMQGGC	DAIIPSRFE	PCGLTQLYGL	RYGCVPVVAR	TGGLADTIID
BAA99156	PLARLTYAAA	DMICIPSHRE	ACGLTQLIAM	RYGTVPLVRK	TGGLADTVIP
BAA82346	PLAHKIIAGS	DFIMIPSRFE	PCGLVQLHSM	PYGTVPIVSS	TGGLVDTVQE
aq_721	GFARKLYASS	DFILMPSYFE	PCGLTQMIGM	RYGCVPIVRK	TGGLRDTVKD
AF433156_1	PLAHMLTAGA	DFMLVPSRFE	PCGLIQLHAM	HYGTVPVVAS	TGGLVDTVKE
AF432915_1	PLSHLIYAGA	DFILVPSMFE	PCGLTQLTAM	RYGSIPIVRK	TGGLYDTVFD
AF395537_1	QLAHRITAGA	DVLLMPSRFE	PCGLNQLYAM	AYSTVPVVHA	VGGLRDTVAP
AF383878_1	RLAHRMTAGA	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	MYGTVPVVHA	VGGLRDTVEH
AF234163_1	PVSHRITAGC	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	QYGTVPVVHG	TGGLRDTVET
AF210699_1	PLAHKITAGA	DFMLVPSRFE	PCGLIQLHAM	RYGTIPICAS	TGGLVDTVKE
AF173900_1	KTAHRITAGA	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	MYGTIPVVHA	VGGLRDTVQP
AE004643_6	TEARRIYAGS	DFLLMPSRYE	PCGLSQLYAO	CFGSLPIARC	TGGLADTIVD
AAL64907	KLYKALHYVA	KALVMPSRWE	PFGISAIEAM	ALGTPVIATK	VGGLPEVIDG
AAK28335	LDYEDFVRGC	HLGVFPSYFE	PWGYTPAECT	VMGVPSVTTN	LSGFGCFIQD
AAF39055	VLARQIFAAA	DMICIPSMFE	PCGLTQMIGM	RYGTVPVVRA	TGGLADTVTD
AAD45815	PVSHRITAGC	DILLMPSRFE	PCGLNQLYAM	QYGTVPVVHA	TGGLRDTVEN
AAC70779	PLAHKIIAGA	DFIVIPSRFE	PCGLVQLHAM	PYGTVPIVSS	TGGLVDTVKE

1801

1850

VC1726	YDKFPER...	...ATGFGY	QEPTPEALLI	TMQRALLFYL	Q.QP.....
UGST_WHEAT	GKTGFHMGRL	...SVDCNVV	EPADVKKVVT	TLKRAVKVVG	...T.....
UGST_SORBI	GKTGFHMGRL	...SVDCNVV	EPADVKKVAT	TLKRAIKVVG	...T.....
UGST_ORYGL	GKTGFHMGRL	...SVNCKVV	EPSDVKKVAA	TLKRAIKVVG	...T.....
UGST_MANES	GYTGFQMGAL	...HVECDKI	DSADVAAIVK	TVARALGTYA	...T.....
UGST_MAIZE	GKTGFHMGRL	...SVDCNVV	EPADVKKVAT	TLQRAIKVVG	...T.....
UGST_ANTMA	GFTGFHMGAF	...NVECATV	DPADVQKIAT	TVERALAAYG	...S.....
UGS4_SOLTU	VDHDKERAQQ	CGLEPNGFSF	DGADAGVDY	ALNRALSAWY	D.GR.....
UGS3_SOLTU	FDPLMS....	...QDWGGPS	DRAEASQLIP	RIRNCLLTYR	E.YK.....
UGS2_WHEAT	FNPFQAKGE.	...EGTGWAF	SPLTVDKMLW	ALRTAMSTFR	E.HK.....
UGS2_SOLTU	FNPYAQEGIG	...EGTGWTF	SPLTSEKLLD	TLKLAIGTYT	E.HK.....
TM0895	YDPQ....SM	...EGTGFGF	KKYDSAHLK	AVSKALHFYI	R.EK.....
s111393	RDYDQNHPP	..KR.NGFVF	YQPDEYALET	ALSRAIALYK	D.DP.....
s110945	YDPIN.....	..EAGTGYCF	DRYEPLDCFT	AMVRAWEGFR	..FK.....
Q9SEI7	FNPYAEGGAG	...AGTGWVF	TPLSKDSMVS	ALRLAAATYR	E.YK.....
Q43012	GKTGFHMGRL	...SVDCKVV	EPSDVQKVAT	TLKRAIKIVG	...T.....
PM0544	ATVENIK.SR	...LATGFVF	EQANREALRQ	ALVNAFALW.	Q.KQ.....
PH0069	IDEDHV....	...DGTGLLV	KPGDPWDLAN	AILRMHSIAM	DNEF.....
PAB2292NETGILV	KAGDPGELAN	AILKALELSR	S..D.....
065365	FDPFNE....	...SGYGWTF	GRAEANQLID	ALGNCLLTYR	Q.YK.....
064927	VDGPAGGPAQ	...PRNGFVF	DGSDDGALHG	ALDRALTYLT	T.QP.....
064926	YSPFEN....	...VGTGWVF	ERAEANKLRE	SINNALYTYR	Q.FR.....
064923	VDNDKERARD	RGLEPNGFSF	DGADSNVDY	ALNRAISAWF	D.AR.....
049064	FNPFGENGE.	...QGTGWAF	APLTTENMFV	DIANCNIYIQ	G.TQ.....
048900	FDPFND....	...TGLGWTF	DRAEANRMID	ALSHCLTTYR	N.YK.....
048899	FDPFGD....	...AGLGWTF	DRAEANKLIE	ALRHCLDTYR	K.YG.....
024206	FNPFAEKGE.	...QGTGWAF	SPLTIEKNAV	GIADGNFDIQ	G.TQ.....
NP_484075	RDYDQNLPP	..KR.NGYVF	YQSDNQALES	AMNRAIDLWY	Q.SP.....
MJ1606	LHPNPEYHPN	.FDKATGVLF	KVPDKVGFWM	GVEHALNWF	YKLNEICMFM
L98347	FNPI....SK	...EGTGFGF	VDFEQILVE	TINRALEVY	K.EP.....
HI1360	STSESIK.AR	...TATGFVF	ESATPEALRH	CLQRAFALW.	Q.KP.....
GYS_NEUCR	LIEN..SSDY	GIYIVDRRSK	GVDDSVNQLT	QYMFEEFTQKS	R.RQ.....
GYS_DROME	HISDP..KSY	GIYIVDRRYI	GLENSVQQLS	SFMMEFSRLN	R.RQ.....
GYS_CAEEL	HVEDH..EQK	GIYIVDRRHK	AAEESVQELA	QVMYDFCGQS	R.RQ.....
GYS2_YEAST	LIETNQAKDY	GIYIVDRRFK	APDESVEQLV	DYMEEFVKKT	R.RQ.....
GYS2_RAT	HVADP..TAY	GIYIVDS.VR	SPDDSCNQLT	QFLYGFCKQS	R.RQ.....
GYS2_HUMAN	HVADP..TAY	GIYIVDRRFK	SPDDSCNQLT	KFLYGFCKQS	R.RQ.....
GYS1_YEAST	LIETDQAKDY	GIYIVDRRFK	SPDESVEQLA	DYMEEFVNKT	R.RQ.....

GYS1_RABIT	HIADP..SAY	GIYILDRFR	SLDDSCSQLT	SFLYSFCQQS	R.RQ.....
GYS1_MOUSE	HIADP..SAY	GIYILDRFR	SLDDSCSQLT	SFLYSFCQQS	R.RQ.....
GYS1_HUMAN	HIADP..SAY	GIYILDRFR	SLDDSCSQLT	SFLYSFCQQS	R.RQ.....
GLGA_RHITR	ANHAALQ.AK	...VATGIQF	SPVTAEGLLQ	AMRRAMHLF.	Q.DR.....
GLGA_AGRTU	ANHAALA.SK	...AATGVQF	SPVTLTGKQ	AIRRTVRY.	H.DP.....
glgA	CSLENLA.DG	...VASGFVF	EDSNAWLLR	AIRRAFVLW.	S.RP.....
DR0594EVGFRF	ADATAPAFLO	ACREAAAFQ	D..P.....
CT798	GINGFSFFNPHDFYEFRN	MLSEAVTTYR	T.NH.....
CAD17393	RGSPEAALRG	...ATGFLF	DGETPEAMAG	AVARALRVFV	Q..P.....
CAC69955	GFTGFHMGSF	...NVKCDV	DPVDVDAIPK	TVTKALGVY	...T.....
CAC49811	ANDAALH.AH	...VATGIQF	APIDEDGLRH	ALRRTFRLY.	R.LR.....
CAC47425	ANEAALS.AK	...CATGFHF	LPVTTDGLRL	AIRRVLRAY.	N.EP.....
CAC08537	IRVDQE....	...QGTGLLV	EPENVWELSK	ALISALSLSM	ASETNNGDFL
BS_glgA	YQEE....EG	...TGNGFTF	SAFNAHDLKF	TIERALSFY.	C.QQ.....
BH1085	YNEE....IG	...EGNGFSF	THYNAHDFLY	TIKRALRFY.	R.TE.....
BAB79770	YNKY....TG	...IGNGFSF	TNYNHNDLMH	VIELALETY.	D.DK.....
BAB54020	ANEAAMA.AG	...VATGLQF	APNNGGAMLH	AIRRLVDAY.	A.DP.....
BAA99156	GVNGFTFFDTNNFNFR	MLSNAVTTYR	Q.EP.....
BAA82346	GFTGFHMGAF	...NVDCEAI	DPADVEKIAT	TVRRALGTYG	...T.....
aq_721	ISEG.....	...GYGITF	EESKETFLC	SLKRAIELYE	N..A.....
AF433156_1	GVTGFHMGAL	...NP..DKL	DEADADALAA	TVRRASEVFA	...G.....
AF432915_1	VDDDKDRARE	QGLEPNGFSF	EGADSNVDY	ALDRAITTY	D.AR.....
AF395537_1	FDPFAD....	...TGLGWT	DRAEANRMID	ALGHCLNTYR	N.YK.....
AF383878_1	YNPYEE....	...SGLGWT	EKAEANRLID	ALGHCLNTYR	N.YR.....
AF234163_1	FNPFGAKGE.	...EGTGWAF	SPLTVEKMLW	ALRTAISTFR	E.HK.....
AF210699_1	GFTGFHMGAF	...NVECDV	DPADVLRKIVK	TVGRALEVY	...T.....
AF173900_1	FDPFNE....	...SGLGWT	DSAESHKLIH	ALGNCLLTYR	E.YK.....
AE004643_6	G.....	...VTGFLF	REETAQSYLD	AVMRAINVYH	C..P.....
AAL64907	YGVLVEPENP	...QELGRAM	EGMATGVVKA	PPRAHIVQYV	D.....
AAK28335	SVHEP..QTY	GIFVVDRRFK	AHSESIDQLA	QFLYDYSCLS	R.RQ.....
AAF39055	GVNGFSFSNPHDFHEFRN	MLSKAIATYR	D.DQ.....
AAD45815	FNPFGENGE.	...QGTGWAF	APLTTENMFV	DIANCNFDIQ	G.AQ.....
AAC70779	GYTGFHVGF	...SVECEAV	DPADVEKLAT	TVNRALKTYG	...T.....

1851

1900

VC1726EE	MLKVQQRAMQ	QNFSWEESA.	.QEYMKMYRL
UGST_WHEATPA	YHEMVKNMI	QDLSWKGPA.	.KNWEDVLL
UGST_SORBIPA	YEEMVKNMI	QDLSWKGPA.	.KNWENVLLS
UGST_ORYGLPA	YEEMVRNCMN	QDLSWKGPA.	.KNWENVLLG
UGST_MANESAA	LREMILNCMA	QDLSWKGPA.	.RMWEKMLLD
UGST_MAIZEPA	YEEMVRNCMI	QDLSWKGPA.	.KNWENVLLS
UGST_ANTMAVA	YKEMIQNCMA	QDLSWKGPA.	.KNWEKMLLS
UGS4_SOLTUDW	FNSLCKQVME	QDWSWNRPA.	.LDYLELYHA
UGS3_SOLTUKS	WEGIQTRCMT	QDLSWDNAA.	.LDYEEVLIA
UGS2_WHEATPS	WEGLMKRGMT	KDHTWDHAP.	.SSTSRSSSG
UGS2_SOLTUSS	WEGLMRRGMG	RDYSWENAA.	.IQYEQVFTW
TM0895DH	WRRIMTNAMN	TDLSWDRSA.	.KEYVDLYKK
s111393VA	FKTLALQGMA	YDYSWNKPG.	.LQYVEAYEY
s110945AD	WQKLQQRAMR	ADFSWYRSA.	.GEYIKVYKG
Q9SEI7QS	WEGLMRRGMT	RNYSWENAA.	.VQYEQVFQW
Q43012PA	YNEMVRNCMN	QDLSWKGPA.	.KNWENVLLG
PM0544RL	WFTVRSVAME	QDFSWQISA.	.TGYHALYQR
PH0069VE	KLRDNCKKRA	KSFSWENSA.	.KRYLRAYKG
PAB2292LS	KFRENCKKRA	MSFSWEKSA.	.ERYVKAYTG
O65365QS	WEGLQRRGMM	QDLSWDHAA.	.EKYEEVLVA
O64927ER	WAALQQDNMR	LDVSWGKSA.	.KSYVDVYRS
O64926DS	FRGIQRRGME	QDLTWDNAA.	.SIYEEVLVA
O64923SW	FHSLCKRVME	QDWSWNRPA.	.LDYIELYRS
O49064VL	LGRANEARHV	KRLHVGPCR.
O48900ES	WRACRARGMA	EDLSWDHAA.	.VLYEDVLVK
O48899ES	WKSLLQARGMS	QDLSWDHAA.	.ELYEDVLVK

O24206VL	LGGSNEARHV	KRLYMGPCR.	.LTV.....	
NP_484075EQ	FQQLAIQGMK	YDYSWNNPG.	.TEYLNIIYEW	
MJ1606	QYIRYKCPKH	PYDENSPLSM	MMKNCYYHVF	RNLSWQNSPS	IRKYKGLFGG
L98347EV	LNKMVLSAMS	KDFSWGTKA.	.QQYIELYQE	
HI1360RA	WAMVRTDAME	QDFSWRCAA.	.EQYRTLYER	
GYS_NEUCRRI	NQRNRTERLS	DLDDWKRMG.	.MEYVKARQL	
GYS_DROMERI	IQRNRTERLS	DLDDWRTLK.	.IYYRQARVK	
GYS_CAEELRI	ILRNSNEGLS	ALLDWQNLG.	.VFYRDCRRL	
GYS2_YEASTRI	NQRNRTERLS	DLDDWKRMG.	.LEYVKARQL	
GYS2_RATRI	IQRNRTERLS	DLDDWRYLG.	.RYYQHARHL	
GYS2_HUMANRI	IQRNRTERLS	DLDDWRYLG.	.RYYQHARHL	
GYS1_YEASTRI	NQRNRTERLS	DLDDWKRMG.	.LEYVKARQL	
GYS1_RABITRI	IQRNRTERLS	DLDDWKYLG.	.RYYMSARHM	
GYS1_MOUSERI	IQRNRTERLS	DLDDWKYLG.	.RYYMSARHM	
GYS1_HUMANRI	IQRNRTERLS	DLDDWKYLG.	.RYYMSARHM	
GLGA_RHITRKV	WTQMOKQGMK	SDVSWGRSA.	.ERYAALYSS	
GLGA_AGRTUKL	WTQMOKLGMK	SDVSWEKSA.	.GLYAALYSQ	
glgASL	WRFVQRQAMA	MDFSWQVAA.	.KSYRELYYR	
DR0594AQ	WQTRATRAMS	LDFSWDGA.	.RQYLELYRG	
CT798DK	WQHIVRACLD	FSSDLETAA.	.NKYLEIYKQ	
CAD17393RA	WRVLQYNGMT	TDFGWSQPA.	.SEYLALYAT	
CAC69955SA	FAEMIKNCMA	QELSWKGA.	.KKWEEVLLN	
CAC49811RV	WEGLRRQGMK	TDCSWHRSA.	.ARYADLYSE	
CAC47425KL	WARLQYQGMK	SDVSWAKSA.	.ERYVSLYSA	
CAC08537	KYTEVKTNDV	KLW.....DK	IRQNCVRRVN	ENFRWSASA.	.KQLQECYSK
BS_glgADV	WKSIVKTAMN	ADYSWGKSA.	.KEYQALIFEQ	
BH1085KE	WENLLLNIYS	SEVGWDVSA.	.KQYRALYEE	
BAB79770EI	WRSLIIQAMD	SDNSWNKSA.	.EKYKELYEE	
BAB54020AA	FETIQRQGMK	ADVSWDKSA.	.EKYLELYRL	
BAA99156DV	WLNLIESGML	RASGLDAMA.	.KHVYNLYQS	
BAA82346VA	MEKIIQNCMA	QDFSWKGA.	.KQWEKVLFS	
aq_721KK	FRNSVKIVMS	LDFSCDRMT.	.KEYIECYEE	
AF433156_1GR	YPEMVANCIS	QDLSWSKPA.	.QKWEGLLEE	
AF432915_1DW	FHSLCKRVME	QDWTWNRPA.	.LDYMELYHS	
AF395537_1ES	WRGLQARGMA	QDLSWDHAA.	.ELYEDVLVK	
AF383878_1TS	WEGLQKRGMM	QDLSWDNAA.	.KLYEEVLLA	
AF234163_1PS	WEGLMKRGMT	KDHTWDHAA.	.EQYEQIFEW	
AF210699_1PA	FREMINNCMS	LDLSWKGA.	.KNWETVLLS	
AF173900_1KS	WEGLQRRGMT	PNLSWDHAA.	.EKYEETLVA	
AE004643_6SL	LNAMRCKAMA	APMFWSDSV.	.EPYNRLYRR	
AAL64907NK	FRLRNTV	EMLEYCYEK.	.ARQFAYFRA	
AAK28335RV	ILRNRSERLS	ELLDWKNLG.	.CFYREARRM	
AAF39055DK	WQQIVRSCLE	FSSDLETAA.	.NKYLEIYQQ	
AAD45815IF	LGRAHEEGHV	KRLHVGPCR.	
AAC70779QA	LKEMILNCMA	QDFSWKGA.	.KQWEQALLS	

1901

1950

VC1726	ARFG.....
UGST_WHEAT	LGVE.GSEPG	IVGEEIAP..LALENVAA P.....
UGST_SORBI	LGVA.GGEPG	IEGEEIAP..LAKENVAA P.....
UGST_ORYGL	LGVA.GSAPG	IEGDEIAP..LAKENVAA P.....
UGST_MANES	LEVT.GSEPG	TEGEEIAP..LAKENVPT P.....
UGST_MAIZE	LGVA.GGEPG	VEGEEIAP..LAKENVAA P.....
UGST_ANTMA	LGVS.GSEPG	VDGEEIAP..LAKENVAT P.....
UGS4_SOLTU	ARKLE.....
UGS3_SOLTU	AKYQW.....
UGS2_WHEAT	PSWTNPTSCR	RGLGRSKC..ESPSALKT SSSSFRGPEG
UGS2_SOLTU	AFIDPPYVR.
TM0895	ALAKVGR...
s111393	IRA.....
s110945	VVGKPEELSP	MEEEEKIAELT	ASYR.....

Q9SEI7	VFMDPPYVS.
Q43012	LGVA.GSEPG	VEGEEIAP..LAKENVAA	P.....
PM0544	LLSFN.....
PH0069	NIDRIFDFAM
PAB2292	SIDRAFDL
O65365	AKYQW.....
O64927	ISA.....
O64926	AKYQW.....
O64923	ASKL.....
O49064
O48900	AKYQW.....
O48899	AKYQW.....
O24206
NP_484075	IKYKW.....
MJ1606	AIYNHYLQP.
L98347	L.....
HI1360	L.....
GYS_NEUCR	ALRRAYPTSF	N...GEE..	E..EDFIPGV	EQKISRPFVS	PGSP...R.D
GYS_DROME	ALQAVYPDYV	DELSLYGS..KNN	.LIFSRPHSE	PPSPTSSRHT
GYS_CAEEL	ALERLHPDVD	KIMRDN....	EGKVPSAATS	RRP.....
GYS2_YEAST	ALRRGYPDQF	RELVGEEELND	SNMDALAGGK	KLKVARPLSV	PGSPRDLRSN
GYS2_RAT	TLSRAFPDKF	YLEPTSPP..TTD	GFKYPRPSSV	PPSPSGSQTS
GYS2_HUMAN	TLSRAFPDKF	HVELTSPP..TTE	GFKYPRPSSV	PPSPSGSQAS
GYS1_YEAST	GLRRAYPEQF	KQLVGETISD	ANMNTLAGGK	KFKIARPLSV	PGSP.KVRSN
GYS1_RABIT	ALAKAFPDHF	TYEPHEAD..ATQ	GYRYPRPASV	PPSPSLSRHS
GYS1_MOUSE	ALAKAFPDHF	TYEPHEVD..ATQ	GYRYPRPVS	PPSPSLSRHS
GYS1_HUMAN	ALSKAFPEHF	TYEPNEAD..AAQ	GYRYPRPASV	PPSPSLSRHS
GLGA_RHITR	LVSARGA....
GLGA_AGRTU	LISKGH....
glgA	LK.....
DR0594	L.....
CT798
CAD17393	LAPRATPMPH	LQHWPMTLA	RPASPPDTAP	VGKPARRRRT	TALSTTARAH
CAC69955	LGVP.DSEPG	IDGQEIAP..QAKENVAT	P.....
CAC49811	LLNPDMRLVG	SA.....
CAC47425	LLAKG.....
CAC08537	AQTMAYRLL	ASF.....
BS_glgA	VTRSGRDVLE
BH1085	ILGKRKVEA.
BAB79770	LIK.....
BAB54020	LLSKRVA...
BAA99156	LLS.....
BAA82346	LDVG.RSEAG	IEGDEIAP..LAKENVAT	P.....
aq_721	VQSHQ.....
AF433156_1	VVYGKGGVAT	AKKEEIKV..PVAEKIPG	DLPAVSYAPN
AF432915_1	ARKN.....
AF395537_1	AKYQW.....
AF383878_1	AKYQW.....
AF234163_1	AFVDQPYVM.
AF210699_1	LGVA.GSEPG	VEGDEIAP..LAKENVAT	P.....
AF173900_1	AKYQW.....
AE004643_6	LLRNTAPALR	GVRQ.....
AAL64907	ITP.....
AAK28335	ALKKTHPDLE	MKISSET....	IKRVPRATSA	PSTPSPSTPG
AAF39055
AAD45815
AAC70779	LEVA.GSEPG	IDGEEVAP..LAKENVAT	P.....
	1951				2000
VC1726
UGST_WHEAT

UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT	YPCTLRCPAT	VESQCACLLW	FAGSRTYDGC	AAAAVTASGG	RQLQFWGIRK
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR	RTGMMTPGDF	ASLQESHEGL	STEDYVAWKL	PEEEDPEEYP	FPLTLKQRTG
GYS_DROME	TPAPSVHGSDDED	S..V.DEETE	LKELGIK...
GYS_CAEEL	SIHSSDGEDDE..
GYS2_YEAST	STVYMTPGDL	GTLQEVNNAD	DYFSLGVNPA	ADDDDDG...	.PYADDS...
GYS2_RAT	SPQSSDVENE	G.....DED	ERYDEEEAE	RDRLNIKSPF	SLNHIPK...
GYS2_HUMAN	SPQSSDVEDEVED	ERYDEEEAE	RDRLNIKSPF	SLSHVPH...
GYS1_YEAST	STVYMTPGDL	GTLQDANNAD	DYFNLSTNGA	IDNDDDDNDT	SAYYEDN...
GYS1_RABIT	SPHQSEDEEE	PRDGLPEEDG	ERYDEDEEAA	KDRRNIRAPE	WPRRASCTSS
GYS1_MOUSE	SPHQSEDEEE	PRDGPLGEDS	ERYDEEEAA	KDRRNIRAPE	WPRRASCSSS
GYS1_HUMAN	SPHQSEDEED	PRNGPLEEDG	ERYDEDEEAA	KDRRNIRAPE	WPRRASCTSS
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393	PVARAAGREK	IRA.....
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537
BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1	TLKPVSASVE	GNGAAAPKVG	TTAPAMGAWR	ATTPSGPSPA	AATPKVTTYK
AF432915_1
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1

AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335	SPHSSDAEDSDTA	EQVEHENKAW	QE.....
AAF39055
AAD45815
AAC70779
	2001				2050
VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT	GCAAGWLTAK	HHSDGSLSVR	VTAEIRNQLV	TL.....
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR	PGSPLDSIQG	LQLNGTR...
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT	.G..KKK...L	HGEYKN...
GYS2_HUMAN	.G..KKK...L	HGEYKN...
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT	SGGSKRS...	NSVDTSSLST	PSEPLSPASS	LGEERN...
GYS1_MOUSE	TGGSKRSNSV	DTGPSSSLST	PTEPLSPTSS	LGEERN...
GYS1_HUMAN	TSGSKRNS.V	DTATSSSLST	PSEPLSPTSS	LGEERN...
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
glgA
DR0594
CT798
CAD17393
CAC69955
CAC49811
CAC47425
CAC08537

BS_glgA
BH1085
BAB79770
BAB54020
BAA99156
BAA82346
aq_721
AF433156_1	PALPATAKPK	TAGLKLAGEA	STTSTSENGA	ASNGNGNGAS	ASKTSAAKPL
AF432915_1
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
AAL64907
AAK28335
AAF39055
AAD45815
AAC70779

2051

VC1726
UGST_WHEAT
UGST_SORBI
UGST_ORYGL
UGST_MANES
UGST_MAIZE
UGST_ANTMA
UGS4_SOLTU
UGS3_SOLTU
UGS2_WHEAT
UGS2_SOLTU
TM0895
s111393
s110945
Q9SEI7
Q43012
PM0544
PH0069
PAB2292
O65365
O64927
O64926
O64923
O49064
O48900
O48899
O24206
NP_484075
MJ1606
L98347
HI1360
GYS_NEUCR
GYS_DROME
GYS_CAEEL
GYS2_YEAST
GYS2_RAT
GYS2_HUMAN
GYS1_YEAST
GYS1_RABIT

GYS1_MOUSE
GYS1_HUMAN
GLGA_RHITR
GLGA_AGRTU
 glgA
 DR0594
 CT798
 CAD17393
 CAC69955
 CAC49811
 CAC47425
 CAC08537
 BS_glgA
 BH1085
 BAB79770
 BAB54020
 BAA99156
 BAA82346
 aq_721
AF433156_1 VSAATTRKSA
AF432915_1
AF395537_1
AF383878_1
AF234163_1
AF210699_1
AF173900_1
AE004643_6
 AAL64907
 AAK28335
 AAF39055
 AAD45815
 AAC70779

Identification of Two Essential Glutamic Acid Residues in Glycogen Synthase*

Received for publication, June 20, 2000, and in revised form, August 1, 2000
Published, JBC Papers in Press, August 2, 2000, DOI 10.1074/jbc.M005358200

Emili Cid^{‡§}, Roger R. Gomis^{‡¶}, Roberto A. Geremia^{||}, Joan J. Guinovart[‡], and Juan C. Ferrer^{‡**}

From the [‡]Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Barcelona E-08028, Spain and the ^{||}Centre des Recherches sur les Macromolécules Végétales, CNRS, affiliated with the Joseph Fourier University, Grenoble F-38041, France

The detailed catalytic mechanism by which glycosyltransferases catalyze the transfer of a glycosyl residue from a donor sugar to an acceptor is not known. Through the multiple alignment of all known eukaryotic glycogen synthases we have found an invariant 17-amino acid stretch enclosed within the most conserved region of the members of this family. This peptide includes an E-X₇-E motif, which is highly conserved in four families of retaining glycosyltransferases. Site-directed mutagenesis was performed in human muscle glycogen synthase to analyze the roles of the two conserved Glu residues (Glu-510 and Glu-518) of the motif. Proteins were transiently expressed in COS-1 cells as fusions to green fluorescence protein. The E510A and E518A mutant proteins retained the ability to translocate from the nucleus to the cytosol in response to glucose and to bind to intracellular glycogen. Although the E518A variant had approximately 6% of the catalytic activity shown by the green fluorescence protein-human muscle glycogen synthase fusion protein, the E510A mutation inactivated the enzyme. These results led us to conclude that the E-X₇-E motif is part of the active site of eukaryotic glycogen synthases and that both conserved Glu residues are involved in catalysis. We propose that Glu-510 may function as the nucleophile and Glu-518 as the general acid/base catalyst.

the glycosyl donor. In all cases, the reaction catalyzed is a substitution at the anomeric carbon of a sugar moiety and may occur with retention or inversion of the configuration at this center. Accordingly, enzymes that catalyze glycosyltransfer can be divided into retaining or inverting enzymes.

Glycogen synthase (GS)¹ catalyzes the key step of glycogen formation. In mammals, two major isoforms of the enzyme have been described, the muscle isoenzyme (2), which is expressed in several tissues (3), and the liver form (4), which appears to be tissue-specific (5). GS plays a crucial role in glucose metabolism and homeostasis, and its malfunction has been associated with several metabolic diseases such as diabetes mellitus (6, 7) and glycogen storage disease 0 (8). Mammalian GSs catalyze the transfer of a glucosyl moiety from UDP- α -glucose to a nascent chain of glycogen through an α 1 \rightarrow 4 linkage. The stereochemistry of the resulting glycosidic bond is the same as that of the donor sugar nucleotide, thus GS is classified as a retaining Leloir-type glycosyltransferase. The stereochemical course of the reaction, analogously to what has been found for retaining glycosidases (9), determines the presence of two catalytic amino acids, which allow a double displacement mechanism. According to this model, these two essential residues must be close within the active center of the enzyme (10, 11).

Although many genes encoding glycosyltransferases have been sequenced and expressed, no structural information from x-ray crystallography or high resolution NMR spectroscopy is available for a retaining glycosyltransferase. The only structures known to date are those of the β -glucosyltransferase of T4 bacteriophage (12), the hypothetical nucleotide-diphospho-sugar transferase SpsA from *Bacillus subtilis* (13), and the catalytic domain of the bovine β 1,4-galactosyltransferase T1 (14). However, all these enzymes operate with inversion of configuration at the anomeric carbon and presumably have different active site geometry.

Almost all the studies of muscle and liver GS have focused on the covalent and allosteric regulation by hormonal and metabolic stimuli (15–17), and few attempts have been made to elucidate the catalytic mechanism (18). The aim of this study was to identify conserved regions and putative catalytic residues through the comparison of the amino acid sequences of mammalian GSs with those of other known retaining glycosyltransferases. Moreover, using site-directed mutagenesis and human muscle glycogen synthase (HMGS) as a model, we have

Glycosyltransferases and glycosidases catalyze the transfer of glycosyl residues from a donor sugar to an acceptor. The acceptor in glycosidases is water, the end result being hydrolysis of the glycoconjugate. For transferases the acceptor molecule is in most cases a growing carbohydrate chain, but it can also be a protein, a lipid, or a range of other compounds such as steroids, bilirubin, flavonones, carotenoids, etc., that are modified by glycosylation (1). Glycosyltransferases can be further divided into two groups depending on whether they use a nucleotide phosphosugar (Leloir-type) or an oligosaccharide as

* This work was supported in part by Grant PM98-0185 from Dirección General de Enseñanza Superior (Ministerio de Educación y Cultura, Spain), by Grant ACI 99-16 from the Generalitat de Catalunya, and by the Juvenile Diabetes Foundation International. The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

§ Recipient of a doctoral fellowship from the Generalitat de Catalunya (Comissió Interdepartamental de Recerca i Innovació Tecnològica).

¶ Recipient of a doctoral fellowship (Formación Personal Investigador) from the Spanish Government (Ministerio de Educación y Cultura).

** To whom correspondence should be addressed: Dept. de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de Barcelona, Martí i Franquès, 1, Barcelona E-08028, Spain. Tel.: 34-93-402-1209; Fax: 34-93-402-1219; E-mail: ferrer@sun.bq.ub.es.

¹ The abbreviations used are: GS, glycogen synthase; HMGS, human muscle glycogen synthase; GFP, green fluorescence protein; HCA, hydrophobic cluster analysis; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; FBS, fetal bovine serum; PBS, phosphate-buffered saline; BSA, bovine serum albumin; Glu 6-P, glucose 6-phosphate; TRITC, tetramethylrhodamine isothiocyanate; NRD1 α , nucleotide recognition domain 1 α ; ORF, open reading frame.

probed the function of two conserved Glu residues in catalysis by this family of enzymes.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Sequence Retrieval and Analysis—Sequences were retrieved from the ExPASy or PubMed servers on the Web. The accession numbers (SWISS-PROT, TrEMBL, or Entrez) of the proteins studied are included in the figures below. BLAST and ψ -BLAST (19, 20) were performed at the NCBI. Linear alignments were performed locally using ClustalW (21). Hydrophobic cluster analysis (HCA) (22) plots were obtained at the DrawHCA server. The secondary structure predictions were performed at the Jpred server (23). The classification of glycosyltransferases by Campbell *et al.* (24, 25) is accessible on the Web also.

Site-directed Mutagenesis—The plasmid pEGFP-HMGS (26), which encodes the fusion protein GFP-HMGS, was used as a template. The mutations in the coding sequence of HMGS were created using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene). The E510A mutation was generated with the oligonucleotide CCTCTACTATGcGCCaTGGGGCTACAC (the changed positions are in *lowercase*) and its inverse complementary oligonucleotide, which introduced an *Nco*I restriction site (shown *underlined*) for diagnostic purposes. Similarly, the pEGFP-HMGS (E518A) plasmid was built with the oligonucleotide CACACCGGCTGcaTGCACGGTTATG and its exact complement, which introduced an *Sph*I restriction site. The mutant plasmids were purified by anion-exchange chromatography (Plasmid Maxi Kit, Qiagen), and the regions encoding the fusion proteins were sequenced in their entirety, using the ABI-PRISM DNA sequencing kit and the ABI-PRISM 377 automatic DNA sequencer (PE Applied Biosystems), to rule out spurious mutations.

Cell Culture and Transfection—COS-1 cells (ATCC no. CRL-1650) were grown on 60-mm dishes (for biochemical assays and immunoblots) or on glass coverslips inside 35-mm dishes (for confocal microscopy analysis) in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Whittaker), supplemented with 25 mM glucose, 10% fetal bovine serum (FBS; Biological Industries), and penicillin/streptomycin (Roche Molecular Biochemicals). Cells cultured onto 60-mm dishes were transfected using 625 μ g of DEAE-dextran (Sigma), 0.5 μ mol of cloroquine (Sigma), and 10 μ g of plasmid DNA per dish in DMEM. After a 4-h incubation, cells were treated for 2 min in DMEM containing 10% dimethyl sulfoxide (Sigma) and 10% FBS. They were then washed with DMEM plus 10% FBS and maintained in this medium. Cells grown on coverslips were transfected at 70–80% of confluence using 4 μ g of liposome suspension Clonfectin (CLONTECH) and 4 μ g of plasmid DNA per 35-mm dish following the manufacturer's instructions. After transfection (4–5 h) at 37 °C in humidified 5% CO₂/95% air, cells were washed in phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in DMEM supplemented with 25 mM glucose and 10% FBS. Experiments were performed 48–52 h after transfection. Cells were preincubated overnight in DMEM without glucose, and on the day of the experiment they were incubated in DMEM with or without 30 mM glucose for 4 h. At the end of the incubation, cells grown on 60-mm dishes were rinsed twice with PBS and frozen in liquid nitrogen. Cells grown on coverslips were fixed for 20 min at room temperature in PBS containing 4% paraformaldehyde (Fluka) and washed several times with PBS. Alternatively, cells were permeabilized with digitonin (5 μ g/ml) in a buffer containing 300 mM saccharose, 3 mM Hepes, 5 mM MgCl₂ (Merck), 2 mM dithiothreitol (Sigma) for 8 min and were treated or not at 37 °C with α -amylase (22 units/ml, Sigma) and 1 mM CaCl₂ in PBS for 30 min. Finally, cells were fixed with paraformaldehyde as described.

Immunocytochemistry—Coverslips were rinsed three times with PBS, and cells that had not been treated with digitonin were permeabilized for 20 min with PBS containing 0.2% Triton X-100 (Sigma) and blocked for 10 min with PBS containing 0.2% Triton X-100 and 3% bovine serum albumin (BSA; Sigma). Alternatively, before blocking, cells were treated for 30 min at 37 °C with α -amylase (22 units/ml, Sigma) and 1 mM CaCl₂ in PBS. A monoclonal IgM antibody against glycogen, a generous gift from Dr. Otto Baba (27), was diluted in PBS containing 3% BSA and applied to the cells for 45 min at room temperature. Coverslips were then washed several times with PBS and subjected to incubation with a tetramethylrhodamine (TRITC)-conjugated goat anti-mouse IgM secondary antibody (Chemicon) for 30 min. Finally, coverslips were washed, air-dried, and mounted onto glass slides using the Immuno Fluore mounting medium (ICN Biomedicals, Inc.).

Confocal Microscopy—Fluorescence images were obtained with a Leica TCS 4D (Leica Lasertechnik, Heidelberg, Germany) confocal scanning laser microscope adapted to an inverted Leitz DMIRBE microscope and 63 \times (numerical aperture 1.4 oil) Leitz Plan-Apo objective.

The light source was an argon/krypton laser (75 milliwatts). Green fluorescence from GFP and GFP recombinants was excited with the laser at 488 nm; red fluorescence of the TRITC secondary antibody was excited at 550 nm. Optical sections (0.1 μ m) were obtained.

Glycogen Synthase Activity Assays and Glycogen Content—For the measurement of glycogen content, cell monolayers were scraped into 30% KOH, and the extract was then boiled for 15 min and centrifuged at 5000 \times g for 15 min. Glycogen was measured in the cleared supernatants as described (28). To determine GS activity, frozen cell monolayers from the 60-mm diameter plates were scraped using a homogenization buffer that consisted of 10 mM Tris-HCl (pH 7.0), 150 mM KF, 15 mM EDTA, 15 mM 2-mercaptoethanol, 10 μ g/ml leupeptin, 1 mM benzamide, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. Cell bursting was caused by sonication. Protein concentration was measured as described by Bradford (29) using the Bio-Rad protein assay reagent. GS activity was measured in the presence or absence of 6.6 mM Glu 6-P as described (30). The activity measured in the absence of Glu 6-P represents the active form of the enzyme (I or a form), whereas the activity tested in the presence of 6.6 mM Glu 6-P is a measure of total activity. The ratio of these two activities is an estimate of the activation state of the enzyme.

Electrophoresis and Immunoblotting—Samples from activity assays were boiled for 2 min with gel loading buffer 5 \times containing 250 mM Tris-HCl (pH 6.8), 1 mM dithiothreitol, 10% SDS, 0.5% bromophenol blue, and 50% glycerol. Electrophoresis was performed in a 10% SDS-polyacrylamide gel as described by Laemmli (31) in a Mini-Protein II cell (Bio-Rad) at 200 V, until the bromophenol blue dye front reached the end of the gel. Electrotransfer of proteins from the gel to nitrocellulose (Protran; Schleicher & Schuell) was performed at room temperature for 1 h at 100 V (constant) in a Bio-Rad miniature transfer apparatus, as described by Towbin *et al.* (32). Nitrocellulose blots were incubated at room temperature in blocking buffer (3% BSA, 0.05% Tween 20 (Sigma) in PBS) for 1 h, then with a rabbit antibody against GFP (CLONTECH) for 1 h, and finally with a secondary goat anti-rabbit horseradish peroxidase antibody for 45 min. Immunoreactive bands were visualized on Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech) films exposed to the membrane after incubation with ECL reagent (Amersham Pharmacia Biotech).

RESULTS

Sequence Analysis—A linear multiple alignment of all known eukaryotic GSs (human muscle (2) and liver (33), rabbit muscle (34), rat liver (4), mouse muscle² and brain (36), *Drosophila melanogaster*³ and *Caenorhabditis elegans* (38) open reading frames, *Neurospora crassa*⁴, and *Saccharomyces cerevisiae* isoforms 1 (40) and 2 (41); not shown) revealed a 17-amino acid stretch with the sequence ⁵⁰⁷SY⁵⁰⁷YEPWGYTPAE-CTVMG⁵²³ (the numbering corresponds to the HMGS sequence), which is strictly conserved and is enclosed within the region where homology among the members of this family is greatest. ψ -BLAST searches using this 17-amino acid peptide showed that an E-X₇-E motif (two Glu residues separated by seven amino acids) is conserved among other glycosyltransferases that act with retention of the configuration at the reaction center. A similar E-X₇-E motif was described previously in a family of retaining bacterial α -mannosyltransferases (42). Through the multiple alignment of related glycosyltransferases different to eukaryotic GSs, Kapitonov and Yu (43) identified a conserved fragment, arbitrarily named nucleotide recognition domain 1 α (NRD1 α), which was characterized by the presence of two conserved Glu residues separated by seven amino acids.

Campbell *et al.* (24, 25) have classified glycosyltransferases in terms of sequence similarity and the retention or inversion of the configuration at the anomeric carbon of the transferred sugar. Among the 43 families described, only 10 are known to

² M. F. Seldin, Z. Xue, J. M. Rochelle, R. Debry, and R. Surwit, direct submission to the GenBank[®], Accession number AAD09457.

³ Automatic genome annotation at the Celera Jamboree (FBrf0126705). FlyBase (1999).

⁴ R. de Paula, H. F. Terenzi, and M. C. Bertolini, direct submission to the EMBL/GenBank[®]/DDBJ, Accession number O93869.

Family	Name		1	20	Accessionnumber
3	ORF Y46G5A.31	(526)	FPSYVE	EWGYTBAECTVMGI	CAB60373 ¹
3	ORF CG6904	(516)	FPSYVE	EWGYTBAECTVMGI	AAF55132 ¹
3	UGS1_HUMAN	(505)	FPSYVE	EWGYTBAECTVMGI	P13807 ²
3	O93869	(495)	FASYVE	EWGYTBAECTVMGV	O93869 ²
3	UGS1_YEAST	(504)	FPSYVE	EWGYTBAECTVMGV	P23337 ²
4	VIPC_SALTI	(477)	LFSEVE	EGLPNVLEAQMVEV	Q04975 ²
4	ORF AF0045	(302)	HSLSHE	GFGLPVVEAMACGA	AAB91182 ¹
4	GPI3_YEAST	(284)	HASLTV	AEFGTILVEAASCNI	P32363 ²
4	SPS_MAIZE	(586)	NPALVE	EFGLTLIEAAHGL	P31927 ²
4	SUS1_MAIZE	(665)	QPAFVE	EAEGTLVIEEMTCGL	YUZMS ²
5	P78852	(1521)	IPSRDE	EFGLVAVEFGRKGA	P78852 ²
5	ORF PAB2292	(334)	IPSYVE	EFGLVALEAMCLEA	CAB49000 ¹
5	GLGA_ECOLI	(372)	VPSRVE	ECGLTQLYGLKYET	P08323 ²
5	O48899	(628)	MPSRVE	ECGLNQIYAMAYET	O48899 ²
5	BAA82346	(477)	IPSRVE	ECGLVQLHSMPEYET	BAA82346 ¹
15	KRE2_CANAL	(341)	GGFFYE	ERWGDAFVHSTAAAL	Q00310 ²
15	KRE2_YEAST	(352)	GGFFYE	ERWGDAFVHSTAAAL	P27809 ²
15	YUR1_YEAST	(336)	GGFFYE	ERWGDAFVHSTGVST	P26725 ²
15	KTR3_YEAST	(318)	GGFFYE	ERWGDAFVHSTAAAL	P38130 ²
15	O60160	(302)	GNFFYE	ERWGDAFVHSTAVST	O60160 ¹
Consensus			XPSYYEFPWGXXPVESIXXGL		

FIG. 1. Multiple sequence alignment of deduced amino acid sequences of selected glycosyltransferases. The alignment was performed using ClustalW and a blosum62mt matrix. Sequences were retrieved from the Entrez-protein server (NCBI) (*superscript 1*) or Swiss Protein/TrEMBL (*superscript 2*) data bases. The glycosyltransferase families, according to the classification of Campbell *et al.* (24, 25), are indicated on the left and the accession numbers are shown on the right. The first aligned amino acid of each protein is indicated between brackets. The invariant Glu residue is shown on a black background and the conserved homologous residues on a gray background. ORF Y46G5A.31: putative glycogen synthase from *C. elegans*; ORF CG6904: putative glycogen synthase from *D. melanogaster*; UGS1_HUMAN: human muscle glycogen synthase; O93869: glycogen synthase from *N. crassa*; UGS1_YEAST: glycogen synthase isoform 1 from *S. cerevisiae*; VIPC_SALTI: VI polysaccharide biosynthesis protein VIPC/TVIE from *Salmonella typhi*; ORF AF0045: putative mannosyltransferase A from *Archaeoglobus fulgidus*; GPI3 YEAST: N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol biosynthetic protein from *S. cerevisiae*; SPS_MAIZE: maize sucrose-phosphate synthase; SUS1_MAIZE: maize sucrose synthase 1; P78852: putative cell wall α -glucan synthase Ags1 from *Schizosaccharomyces pombe*; ORF PAB2292: putative glycogen synthase from *Pyrococcus abyssi*; GLGA_ECOLI: glycogen synthase from *E. coli*; O48899: maize starch synthase isoform zSTSII-1; BAA82346: granule-bound starch synthase I from *Phaseolus vulgaris*; KRE2_CANAL: glycolipid 2- α -mannosyltransferase MNT1 or KRE2 from *Candida albicans*; KRE2_YEAST: glycolipid 2- α -mannosyltransferase MNT1 or KRE2 from *S. cerevisiae*; YUR1_YEAST: probable mannosyltransferase YUR1 from *S. cerevisiae*; KTR3_YEAST: probable mannosyltransferase KTR3 from *S. cerevisiae*; O60160: putative 2- α -mannosyltransferase (locus SPBC19C7) from *S. pombe*.

operate via a retaining mechanism (families 3, 4, 5, 6, 8, 15, 20, 32, 34, and 35), 25 are inverting transferases, whereas for the remaining 8 families the stereochemical course of the reaction is unknown. All eukaryotic GSs fall into family 3, whereas the NRD1 α enzymes described by Kapitonov and Yu (43) and those analyzed by Geremia *et al.* (42) belong to family 4 of Campbell's classification. Here we have extended the analysis to all the glycosyltransferase families that operate with retaining or unknown stereochemistry.

First, six to ten arbitrarily chosen sequences of each family were retrieved from the NCBI or Swiss Protein/TrEMBL data bases and were aligned by families using the ClustalW algorithm. The most conserved regions were then screened for the presence of a stretch similar to the E-X₇-E motif, which was detected in four of the ten retaining families (3, 4, 5, and 15), whereas none of the families with unknown stereochemistry apparently possessed such a consensus sequence. The proposed multiple linear alignment of this fragment from representative members of families 3, 4, 5, and 15 is shown in Fig. 1. Although the overall identity among these sequences is very low, only the first Glu residue of the E-X₇-E motif (which corresponds to Glu-510 in the HMGS sequence) is invariant, similarity is much higher (~70%). Two characteristic features of this motif, which are highly conserved among all the proteins analyzed, are the presence of aromatic residues at positions -1 and +2 from the invariant Glu residue and two almost invariant Gly residues at positions +3 and +13. The second conserved Glu residue in family 3 (Glu-518 in HMGS) is also present in all the members of family 4, whereas all the enzymes analyzed from family 15 possess a His residue in this position. Finally, this site is more variable in the members of family 5, being occupied by Glu, Tyr, or His residues.

To further assess the significance of this similarity, we performed hydrophobic cluster analysis (HCA) and secondary structure prediction of a 60-amino acid peptide spanning the E-X₇-E motif on a set of representative proteins of the aforementioned families (Fig. 2). Again, a number of features are conserved among the proteins analyzed, thus supporting the hypothesis that these four families are related. Both the shape of the hydrophobic clusters in the HCA profiles and secondary structure prediction anticipated the presence of an α -helix 12–15 amino acids before the E-X₇-E stretch. Both methods predicted two β -sheets, located 5–7 amino acids and 20–30 amino acids after this motif, respectively. Additionally, the profiles of the hydrophobic clusters just before the first Glu residue are compatible with a β -sheet, which is found by secondary structure prediction in all cases but one. These observations indicate that these proteins presumably present similarities at the level of secondary structure in the region encompassing the E-X₇-E motif and further suggest that the invariant Glu residue plays an essential role in the enzymatic activity of this class of enzymes. Although the second Glu of the motif is not strictly conserved, it must be noted that in all cases the amino acid that occupies this position can hypothetically act as a proton donor/acceptor.

The GFP-HMGS Fusion Protein Is Catalytically Active—One way to show that a given amino acid residue of an enzyme is essential for catalysis consists of mutating this particular amino acid and verifying that the mutant enzyme has a greatly decreased or null activity. This approach requires the use of a recombinant expression system that permits the production of active enzyme. Owing to the difficulties in obtaining reasonable amounts of soluble and active muscle GS by overexpression of

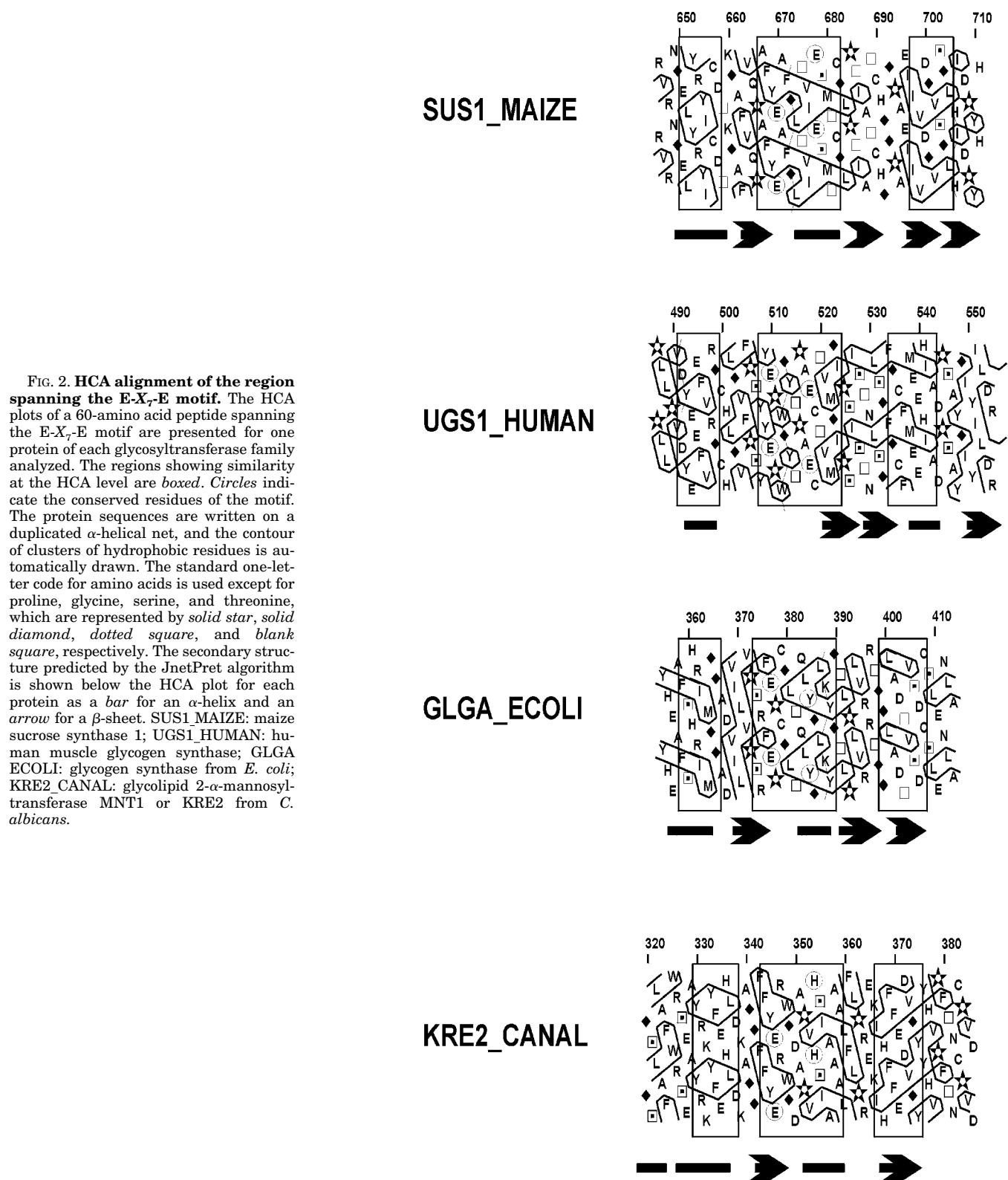


FIG. 2. HCA alignment of the region spanning the E-X₇-E motif. The HCA plots of a 60-amino acid peptide spanning the E-X₇-E motif are presented for one protein of each glycosyltransferase family analyzed. The regions showing similarity at the HCA level are boxed. Circles indicate the conserved residues of the motif. The protein sequences are written on a duplicated α -helical net, and the contour of clusters of hydrophobic residues is automatically drawn. The standard one-letter code for amino acids is used except for proline, glycine, serine, and threonine, which are represented by *solid star*, *solid diamond*, *dotted square*, and *blank square*, respectively. The secondary structure predicted by the JnetPret algorithm is shown below the HCA plot for each protein as a *bar* for an α -helix and an *arrow* for a β -sheet. SUS1_MAIZE: maize sucrose synthase 1; UGS1_HUMAN: human muscle glycogen synthase; GLGA_ECOLI: glycogen synthase from *E. coli*; KRE2_CANAL: glycolipid 2- α -mannosyltransferase MNT1 or KRE2 from *C. albicans*.

the protein in *Escherichia coli* (44),⁵ we decided to use eukaryotic cells to express the chimerical protein constructed by fusing the green fluorescent protein (GFP) at the N-terminal end of HMGS. This system enables the ready observation of the intracellular localization of the GFP-HMGS chimera and thus represents an adequate means to verify the overall structural integrity of inactive mutants.

To study whether the GFP-HMGS fusion protein was catalytically active, COS-1 cells were transiently transfected with the pEGFP-C1 and pEGFP-HMGS plasmids, and homogenates from these cultures were assayed for GS activity. GFP-expressing COS-1 cells displayed endogenous GS activity, but total GS activity of cells overexpressing GFP-HMGS was approximately 8-fold that of control cells (Table I). Roach and co-workers obtained similar results when rabbit muscle GS was transiently expressed in COS M9 cells (45). The activity ratio of

⁵ J. C. Ferrer and J. J. Guinovart, unpublished results.

TABLE I

Total GS activity in GFP and GFP-HMGS-expressing COS-1 cells

COS-1 cells were transfected following the DEAE-dextran method and were incubated for 42 h in DMEM supplemented with 25 mM glucose and 10% FBS to allow for protein expression. Cells overexpressing the indicated protein were then collected, and total GS activity was measured, as indicated under "Experimental Procedures." Data represent the mean \pm S.E. for five independent experiments.

	Total glycogen synthase activity	
	milliunits/mg of protein	
GFP	12.6 \pm 2.7	
GFP-HMGS	97.1 \pm 7.9	
GFP-HMGS (E510A)	11.8 \pm 4.2	
GFP-HMGS (E518A)	17.4 \pm 2.8	

GFP-HMGS expressed in COS-1 cells increased from 0.13 \pm 0.05, when determined in homogenates from cells incubated in a glucose-free medium, to 0.22 \pm 0.09 in cells kept in the presence of 30 mM glucose for 4 h. This result further suggests that the fusion of GFP at the N terminus of HMGS does not significantly interfere with the normal function of the enzyme.

The GFP-HMGS Fusion Protein Binds to Intracellular Glycogen—In previous studies we have shown that the intracellular distribution of GFP-HMGS is dependent on the presence of glucose in the incubation medium. Thus, in the absence of glucose GFP-HMGS was concentrated in the nucleus and translocated to the cytosol in response to the presence of the sugar. In both compartments, the fusion protein showed a particulate pattern, and the size and the apparent complexity of the particles in the cytosol increased as incubation with glucose was prolonged (26), suggesting that most of the GFP-HMGS fusion protein was bound to glycogen particles. To test this hypothesis, immunocytochemical experiments were performed using a monoclonal antibody that has been shown to specifically bind to glycogen from chondrocytes, hepatocytes, and muscle cells, as well as to purified glycogen (27). First, we checked the ability of this antibody to bind to glycogen particles produced by COS-1 endogenous GS. Cells were transfected with the pEGFP-C1 vector and were incubated in a glucose-free medium. In these conditions COS-1 cultures stored negligible amounts of glycogen, and no immunofluorescence arising from the anti-glycogen antibody could be detected (Fig. 3A). In contrast, cells incubated for 4 h in a medium containing 30 mM glucose accumulated 170 \pm 10 μ g of glycogen/mg of protein and showed a clear punctuate pattern in the confocal image, which was attributable to glycogen labeling (Fig. 3B). Furthermore, treatment of these cells with α -amylase after paraformaldehyde fixation and permeabilization completely abolished the fluorescence signal (not shown), thus confirming the specificity of the anti-glycogen antibody. This experiment also showed that the intracellular distribution of GFP was insensitive to the presence of glucose in the incubation medium and to the accumulation of glycogen (Fig. 3).

In another set of experiments, COS-1 cells were transfected with the pEGFP-HMGS plasmid and were also immunostained with the anti-glycogen antibody. In the absence of glucose, transfected cells did not accumulate measurable amounts of glycogen and no fluorescent signal arising from glycogen immunolabeling was detected (not shown). As previously reported (26), in these conditions green fluorescence from GFP-HMGS was mainly found in the nucleus (not shown). After a 4-h incubation with 30 mM glucose, GFP-HMGS was almost exclusively found in the cytosol, mostly as round-shaped aggregates (Fig. 4, A and D). Surprisingly, the number of specks that were immunolabeled with the glycogen antibody was much lower in cells overexpressing GFP-HMGS than in non-transfected cells of the same preparation (Fig. 4, B and E). The percentage of

transfection achieved in these experiments was always higher than 70%, and transfected and non-transfected COS-1 cultures, when incubated for 4 h with 30 mM glucose, reached similar levels of glycogen (170 \pm 10 μ g of glycogen/mg of protein). Therefore, the decreased glycogen immunolabeling could not be attributed to the accumulation of lower amounts of the polysaccharide in the GFP-HMGS-expressing cultures. Rather, this finding suggests that the overexpressed fusion protein blocked the access of the antibody to glycogen particles. This hypothesis was supported by the observation that some very large GFP-HMGS aggregates, which were occasionally produced (Fig. 4D), were also immunolabeled with the glycogen antibody (Fig. 4E). However, the red fluorescence attributable to glycogen staining was mainly found in the center of the large round-shaped aggregates, whereas the green fluorescence from GFP-HMGS was concentrated in the perimeter, and both labels appeared to be mutually exclusive over the same particle (Fig. 4F).

To further corroborate the association between the GFP-HMGS fusion protein and intracellular glycogen, COS-1 cells transiently expressing GFP or GFP-HMGS were incubated in the presence of 30 mM glucose for 4 h and were permeabilized with digitonin before fixation and observation in the confocal microscope. This treatment was effective in releasing soluble proteins, as shown by the removal of GFP. However, in GFP-HMGS-expressing cells the fusion protein was not completely released by this treatment and the removal of GFP-HMGS was only achieved when digitonin-permeabilized cells were incubated with α -amylase to degrade glycogen before fixation (not shown). We conclude that the particulate pattern shown by the GFP-HMGS chimera is due to its close association with the glycogen particles produced when COS-1 cells are incubated in the presence of glucose.

Characterization of the GFP-HMGS (E510A) and GFP-HMGS (E518A) Mutant Proteins—To test the roles of Glu-510 and Glu-518 in the catalytic activity of HMGS, these two residues were mutated to Ala in the plasmid pEGFP-HMGS and the resulting mutant proteins were transiently expressed in COS-1 cells. Homogenates from these cultures were analyzed by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and immunoblotting, using an anti-GFP antibody. The mutant proteins exhibited the expected molecular mass of \sim 110 kDa and were expressed at similar levels to the wild-type protein (Fig. 5). The integrity of the GFP-HMGS (E510A) and GFP-HMGS (E518A) proteins was further confirmed by confocal microscopy analysis of their intracellular distribution in transiently transfected COS-1, hepatocytes, and L6 myoblasts. In each cell type and in both the presence and absence of glucose in the incubation media, the two mutant enzymes exhibited an identical distribution to that of GFP-HMGS (not shown). The size and the shape of the aggregates produced by the mutant proteins in the presence of glucose were very similar to those of the wild-type fusion enzyme. Moreover, glycogen immunolabeling of COS-1 cells was also partially blocked by the overexpression of both GFP-HMGS (E510A) and GFP-HMGS (E518A). The observation that the mutant proteins retained the ability to change their intracellular localization in response to glucose and to bind to glycogen strongly suggested that the mutations did not affect the overall structural integrity of the enzyme. Thus, changes in the activity of the mutants can be directly attributed to local disturbances at the active site machinery.

Detailed kinetic studies of the recombinant enzymes were prevented by the presence of endogenous GS activity. However, homogenates from COS-1 cells transiently expressing the wild-type and the mutant chimerical proteins were assayed for total GS activity. GFP-HMGS (E518A)-expressing cultures showed a slightly higher total GS activity than GFP-expressing cells

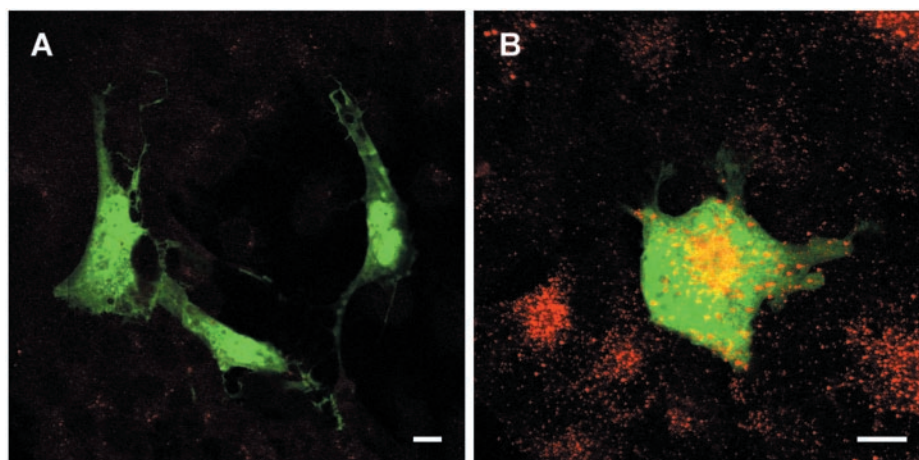


FIG. 3. Glycogen immunostaining of GFP-expressing COS-1 cells. Representative confocal images of COS-1 cells transiently transfected with the pEGFP-C1 vector. Cells were fixed in paraformaldehyde (48–52 h after transfection), permeabilized with Triton X-100, and incubated with a monoclonal IgM anti-glycogen antibody and a TRITC conjugated secondary antibody as described under “Experimental Procedures.” Both panels show the overlapped images of the GFP and TRITC fluorescence. In *A*, cells were incubated in DMEM without glucose and no immunofluorescence from glycogen particles can be detected. *B*, red fluorescence arising from glycogen granules in transfected COS-1 cells that were incubated for 4 h in DMEM containing 30 mM glucose. There is no redistribution of GFP from *A* to *B*, indicating that the subcellular localization of this protein is insensitive to the addition of glucose to the incubation medium or to the presence of glycogen particles in the interior of the cells. The scale bar indicates 10 μ m.

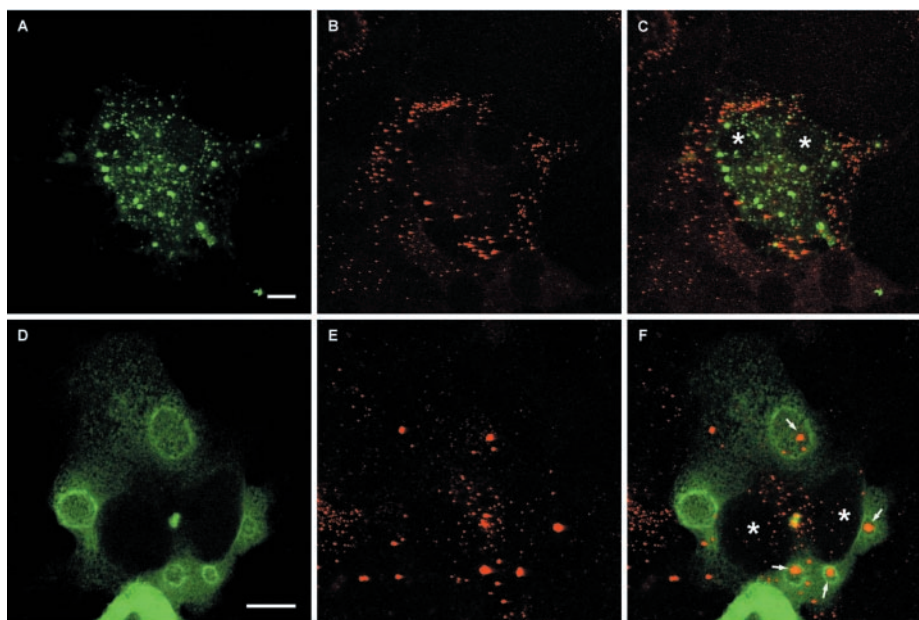


FIG. 4. Glycogen immunostaining of GFP-HMGS-expressing COS-1 cells. Representative confocal images of COS-1 cells transiently transfected with the pEGFP-HMGS vector. After transfection (48–52 h), cells were incubated for 4 h in DMEM containing 30 mM glucose, fixed in paraformaldehyde, permeabilized with Triton X-100, and incubated with a monoclonal IgM anti-glycogen antibody and a TRITC-conjugated secondary antibody as described under “Experimental Procedures.” *A* and *D* show the green fluorescence from GFP-HMGS, *B* and *E* show the red fluorescence from TRITC-labeled glycogen, and *C* and *F* show the overlapped images. Asterisks (*C* and *F*) indicate the position of the nuclei. Open arrows (*F*) point to the large crown-shaped GFP-HMGS aggregates, which are also labeled with the anti-glycogen antibody. The scale bar indicates 10 μ m.

(Table I), indicating that the E518A mutant retained approximately 6% of the activity shown by the wild-type GFP-HMGS enzyme in the conditions of the assay. This small increase in GS activity over the control was consistently observed in all the individual experiments performed. In contrast, homogenates from cells expressing the E510A variant of HMGS did not exhibit a significant difference in activity when compared with control cells. We conclude that both Glu residues are involved in catalysis: Glu-510 is a critical residue, whereas Glu-518 plays a more secondary role.

DISCUSSION

In this study we have combined bioinformatic and experimental techniques to identify two Glu residues at the active

site of eukaryotic GSs, using HMGS as a model. We have taken advantage of the classification of glycosyltransferases into 43 families proposed by Campbell *et al.* (24, 25), according to sequence similarity and the stereochemical course of the reaction. Through the use of BLAST searches and multiple alignments we have found an E-X₇-E motif that is highly conserved among the members of families 3, 4, 5, and 15 of glycosyltransferases, all of which operate with retention of configuration at the anomeric carbon. Hydrophobic cluster analysis and secondary structure prediction of this region supported the hypothesis that these four families are related. In eukaryotic GSs, all belonging to family 3, this motif is enclosed within an invariant 17-amino acid stretch found roughly in the last third of the

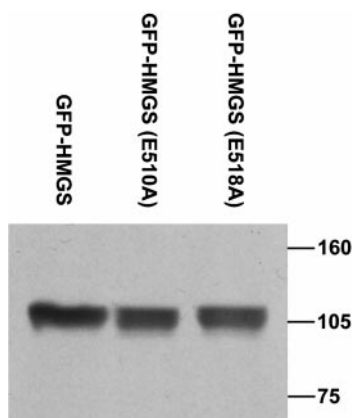


FIG. 5. Immunodetection of GFP-HMGS fusion proteins expressed in COS-1 cells. COS-1 cells were transiently transfected with the pEGFP-HMGS, pEGFP-HMGS (E510A), and pEGFP-HMGS (E518A) vectors. After transfection (48 h), aliquots from cell homogenates containing 10 μ g of total protein were subjected to SDS-polyacrylamide electrophoresis on a 10% gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunoblotting with a rabbit anti-GFP polyclonal antibody and a horseradish peroxidase-linked anti-rabbit antibody was performed as described under "Experimental Procedures." As shown, the mutant proteins were expressed in comparable amounts to the wild-type fusion enzyme and moved similarly in the gel, indicating no gross rearrangement due to the mutations.

corresponding coding sequences and in the region where these proteins exhibit the largest degree of similarity. This conserved core region has previously been assumed to contain the catalytic site, in contrast to the more variable N and C termini, which harbor the phosphorylation sites that regulate the enzyme activity (4).

The functional role of Glu-510 and Glu-518 in the E-X₇-E motif of HMGS was probed by site-directed mutagenesis. The wild-type enzyme and two single point mutants, in which the conserved Glu residues were replaced by Ala, were transiently expressed in COS-1 cells as fusions to GFP. The structural integrity of the chimerical mutant proteins was shown in several ways. They were expressed to similar levels and showed the same molecular mass as the wild-type. The variant proteins retained the ability to concentrate in the nuclear compartment in the absence of glucose and translocate to the cytosol when the monosaccharide was added (26). Finally, they were able to bind to intracellular glycogen, as the wild-type enzyme. However, the E518A mutant retained approximately 6% of the activity shown by the GFP-HMGS fusion protein, whereas the E510A had undetectable activity. This finding indicates that the catalytic mechanism of HMGS has been impaired by the mutations.

Assuming that highly conserved regions in enzymes contain crucial residues for catalytic activity, the E-X₇-E motif must be involved either in substrate recognition and binding or in catalysis. However, considering the large variety of glycosyl donors (GDP-mannose, ADP- and UDP-glucose, UDP-galactose, UDP-N-acetylglucosamine, etc.) and acceptors (mono- and polysaccharides, glycolipids, glycoproteins, etc.) used by the proteins of families 3, 4, 5, and 15, only the active site would be clearly conserved in all of them. The observation that both mutant forms of GFP-HMGS bound to glycogen was also an indication that the glycogen-binding site of the enzyme was not significantly disturbed by the single point mutations. Additionally, Lys-38 of the rabbit muscle GS has been implicated in UDP-glucose binding, suggesting that this substrate binds to the N-terminal half of the enzyme (18). It is therefore reasonable to assume that Glu-510 and Glu-518 are part of the HMGS active site machinery, and by analogy, the corresponding residues of other eukaryotic GSs play an identical role. The same

may be true for the glycosyltransferases from families 4, 5, and 15 of Campbell's classification, although in these cases, experimental confirmation would be required. This type of evidence has been obtained for Ace-A (35, 46), an α -mannosyltransferase that belongs to family 4. Geremia *et al.* (42) found an E-X₇-E motif similar to that described here in a group of prokaryotic α -mannosyltransferases and proposed that both conserved Glu residues were important for catalysis. The replacement by Ala residues of Glu-287 or Glu-295 in Ace-A (equivalent to Glu-510 and Glu-518 in HMGS, respectively) led to the same changes in enzymatic activity as those observed in HMGS. The E287A variant was inactive, whereas Ace-A (E295A) showed very little activity.⁶ Very recently, Nichols *et al.* (37) have shown that Glu-391 of maize starch synthase IIb-2, a glycosyltransferase from family 5, is essential for activity. According to our alignments, this residue corresponds to the indispensable Glu-510 in HMGS.

Enzymatic reactions that involve the substitution of a group at an asymmetric carbon atom and yield a product with the same configuration as the substrate generally operate by two successive displacements on the asymmetric carbon (10). In retaining glycosidases, the first step involves the formation of an inverted substrate-enzyme intermediate through the coordinated attack of a nucleophile at the sugar anomeric center and the protonation of the glycosidic oxygen by a residue acting as a general acid catalyst. In the second step, the latter provides general base catalytic assistance and deprotonates a water molecule, which in turn attacks the anomeric carbon once again, thus yielding the final product. Through site-directed mutagenesis and kinetic analysis of the mutants, the catalytic residues of several retaining glycosidases, always Asp or Glu residues, have been identified and their respective roles assigned (39). Mutant enzymes in which the nucleophile has been replaced by an Ala residue are essentially inactive. When the acid/base catalytic residue is eliminated, the resulting protein retains some activity with very good substrates, *i.e.* those bearing good leaving groups. In this situation, protonation of the leaving group is not crucial for catalysis (39).

Kapitonov and Yu described a domain (NRD1 α), present in several members of the glycosyltransferases of family 4 different from the α -mannosyltransferases analyzed by Geremia *et al.* (42), which also contained an E-X₇-E segment. The authors arbitrarily proposed, by analogy with the mechanism of retaining glycosidases, that the first conserved Glu residue was the general acid/base catalyst, while the second one acted as the nucleophile (43). However, these assumptions were not supported experimentally.

Our results argue against the roles assigned to the two conserved Glu residues by Kapitonov and Yu. First, the sequence comparisons with selected glycosyltransferases show that, although the first Glu residue of the motif is invariant, the second Glu is more variable and therefore better fits the secondary role of the acid/base catalyst. It has to be noted that, in all the enzymes analyzed in this study, the second residue is always an amino acid whose lateral chain can putatively act as a proton donor/acceptor. Second, the E510A mutation in HMGS completely inactivates the enzyme, whereas the E518A mutant maintains some residual activity. The glycosyl donor in the synthesis of glycogen is UDP-glucose. The chemical nature of UDP dictates that this moiety can act as a good leaving group even when it is not protonated and thus the glycosyl reaction might still proceed at a measurable rate in the absence of an acid catalyst. Our results are consistent with Glu-510 being the

⁶ P. Abdian, A. C. Lellouch, C. Gautier, D. U. Ferreiro, L. Ielpi, and R. A. Geremia, submitted for publication.

fundamental nucleophile and with Glu-518 providing important but not essential catalytic assistance, possibly as the general acid/base catalyst. Further experiments are in progress to determine the exact roles of both conserved Glu residues of the E-X₇-E motif in the catalysis by GS.

Acknowledgments—We thank Dr. Otto Baba for providing us with the monoclonal glycogen antibody, Susanna Castel for her skillful technical assistance with the confocal microscope, and Tanya Yates for assistance in preparing the English manuscript.

REFERENCES

- Davies, G., Sinnott, M. L., and Withers, S. G. (1998) in *Glycosyl Transfer* (Sinnott, M. L., ed) pp 119–208, Academic Press, New York
- Browner, M. F., Nakano, K., Bang, A. G., and Fletterick, R. J. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 1443–1447
- Kaslow, H. R., and Lesikar, D. D. (1984) *FEBS Lett.* **172**, 294–298
- Bai, G., Zhang, Z. J., Werner, R., Nuttall, F. Q., Tan, A. W., and Lee, E. Y. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 7843–7848
- Kaslow, H. R., Lesikar, D. D., Antwi, D., and Tan, A. W. (1985) *J. Biol. Chem.* **260**, 9953–9956
- Thorburn, A. W., Gumbiner, B., Bulacan, F., Brechtel, G., and Henry, R. R. (1991) *J. Clin. Invest.* **87**, 489–495
- Bak, J. F., Moller, N., Schmitz, O., Saaek, A., and Pedersen, O. (1992) *Diabetologia* **35**, 777–784
- Orho, M., Bosshard, N. U., Buist, N. R., Gitzelmann, R., Aynsley-Green, A., Blumel, P., Gannon, M. C., Nuttall, F. Q., and Groop, L. C. (1998) *J. Clin. Invest.* **102**, 507–515
- Sinnott, M. L. (1990) *Chem. Rev.* **90**, 1171–1202
- Koshland, D. E., Jr. (1953) *Biol. Rev.* **28**, 416–436
- Saxena, I. M., Brown, R. M., Jr., Fevre, M., Geremia, R. A., and Henrissat, B. (1995) *J. Bacteriol.* **177**, 1419–1424
- Vrieland, A., Ruger, W., Driessen, H. P., and Freemont, P. S. (1994) *EMBO J.* **13**, 3413–3422
- Charnock, S. J., and Davies, G. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 6380–6385
- Gastinel, L. N., Cambillau, C., and Bourne, Y. (1999) *EMBO J.* **18**, 3546–3557
- Roach, P. J. (1990) *FASEB J.* **4**, 2961–2968
- Roach, P. J., Cao, Y., Corbett, C. A., DePaoli-Roach, A. A., Farkas, I., Fiol, C. J., Flotow, H., Graves, P. R., Hardy, T. A., and Hrubey, T. W. (1991) *Adv. Enzyme Regul.* **31**, 101–120
- Bollen, M., Keppens, S., and Stalmans, W. (1998) *Biochem. J.* **336**, 19–31
- Mahrenholz, A. M., Wang, Y. H., and Roach, P. J. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 10561–10567
- Altschul, S. F., Gish, W., Miller, W., Myers, E. W., and Lipman, D. J. (1990) *J. Mol. Biol.* **215**, 403–410
- Altschul, S. F., Madden, T. L., Schaffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., and Lipman, D. J. (1997) *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389–3402
- Thompson, J. D., Higgins, D. G., and Gibson, T. J. (1994) *Nucleic Acids Res.* **22**, 4673–4680
- Lemesle-Varloot, L., Henrissat, B., Gaboriaud, C., Bissery, V., Morgat, A., and Mornon, J. P. (1990) *Biochimie (Paris)* **72**, 555–574
- Cuff, J. A., and Barton, G. J. (1999) *Proteins* **34**, 508–519
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1997) *Biochem. J.* **326**, 929–939
- Campbell, J. A., Davies, G. J., Bulone, V., and Henrissat, B. (1998) *Biochem. J.* **329**, 719
- Ferrer, J. C., Baque, S., and Guinovart, J. J. (1997) *FEBS Lett.* **415**, 249–252
- Baba, O. (1993) *Kokubyo Gakkai Zasshi* **60**, 264–287
- Chan, T. M., and Exton, J. H. (1976) *Anal. Biochem.* **71**, 96–105
- Bradford, M. M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248–254
- Thomas, J. A., Schlender, K. K., and Lerner, J. (1968) *Anal. Biochem.* **25**, 486–499
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Towbin, H., Staehelin, T., and Gordon, J. (1979) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **76**, 4350–4354
- Nuttall, F. Q., Gannon, M. C., Bai, G., and Lee, E. Y. (1994) *Arch. Biochem. Biophys.* **311**, 443–449
- Zhang, W. M., Browner, M. F., Fletterick, R. J., DePaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (1989) *FASEB J.* **3**, 2532–2536
- Geremia, R. A., Roux, M., Ferreira, D. U., Dauphin-Dubois, R., Lellouch, A. C., and Ielpi, L. (1999) *Mol. Gen. Genet.* **261**, 933–940
- Pellegri, G., Rossier, C., Magistretti, P. J., and Martin, J. L. (1996) *Brain Res. Mol. Brain Res.* **38**, 191–199
- Nichols, D. J., Keeling, P. L., Spalding, M., and Guan, H. (2000) *Biochemistry* **39**, 7820–7825
- Ainscough, R., Bardill, S., Barlow, K., Basham, V., Baynes, C., Beard, L., Beasley, A., Berks, M., Bonfield, J., Brown, J., et al. (1998) *Science* **282**, 2012–2018
- Ly, H. D., and Withers, S. G. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* **68**, 487–522
- Farkas, I., Hardy, T. A., DePaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20879–20886
- Farkas, I., Hardy, T. A., Goebel, M. G., and Roach, P. J. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 15602–15607
- Geremia, R. A., Petroni, E. A., Ielpi, L., and Henrissat, B. (1996) *Biochem. J.* **318**, 133–138
- Kapitonov, D., and Yu, R. K. (1999) *Glycobiology* **9**, 961–978
- Zhang, W., DePaoli-Roach, A. A., and Roach, P. J. (1993) *Arch. Biochem. Biophys.* **304**, 219–225
- Skurat, A. V., Wang, Y., and Roach, P. J. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 25534–25542
- Petroni, E. A., and Ielpi, L. (1996) *J. Bacteriol.* **178**, 4814–4821