



Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” – UNESP
INSTITUTO DE QUÍMICA



METABOLISMO DO GLICOGÊNIO EM *Neurospora crassa*. UM ESTUDO MOLECULAR E BIOQUÍMICO E ANÁLISE DE INTERAÇÃO PROTEÍNA-PROTEÍNA

Renato Magalhães de Paula

Orientadora: Profa. Dr. Maria Célia Bertolini

Tese de Doutorado apresentada ao Instituto de Química, UNESP, Araraquara, como requisito para a obtenção do Título de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de Concentração Biotecnologia.

Araraquara

2004

DADOS CURRICULARES

Renato Magalhães de Paula

1. Dados Pessoais

- 1.1- Nascimento: 02 de outubro de 1974
- 1.2- Nacionalidade: brasileiro
- 1.3- Naturalidade: Paraguaçu Paulista – SP
- 1.4- Estado civil: solteiro
- 1.5- Filiação: Oswaldo de Paula
 Arlete Magalhães de Paula
- 1.6- Profissão: Químico
- 1.7- Documento de Identidade: 25.594.245-X
- 1.8- Cadastro de Pessoa Física: 253.266.398-74
- 1.9- Endereço: Rua Nilo Peçanha, 404
 Paraguaçu Paulista, SP – CEP 19700-000
- 1.10- Endereço Profissional: Depto de Bioquímica e Tecnologia Química
 Instituto de Química – UNESP
 Rua Prof. Francisco Degni s/n
 Araraquara, SP – CEP 14800-900

2. Formação Acadêmica

2.1- Doutorado em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia, concluído em 3 de setembro de 2004, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP

2.2- Mestre em Biotecnologia, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, área de concentração: Biotecnologia, concluído em 19 de novembro de 1999, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP.

2.3- Bacharel em Química, concluído em 17 de dezembro de 1996, Instituto de Química, UNESP, Araraquara, SP

3. Publicações

de Paula, R.; Terenzi, H. F. e Bertolini, M. C. (1999) Molecular cloning of *Neurospora crassa* glycogen synthase, *FASEB J.* **13**: A1451.

de Paula, R.; Azzariti de Pinho, C.; Terenzi, H. F. e Bertolini, M. C. (2002) Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA, *Mol. Genet. Genom.* **267**: 241-253.

de Paula, R. M.; Wilson, W. A.; Terenzi, H. F.; Roach, P. J. e Bertolini, M. C. (2004) GNN is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*, *Eukaryotic Cell* (submetido).

de Paula, R. M.; Wilson, W. A.; Terenzi, H. F.; Roach, P. J. e Bertolini, M. C. (2004) Biochemical characterization of the GNN, the protein involved in the initiation of glycogen synthesis in *Neurospora crassa* (a ser submetido).

Dedico...

À Deus, pela dádiva da vida e pela oportunidade de conhecer seus mistérios.

À memória de meu pai Oswaldo.

À minha mãe Arlete, pelo amor incondicional e inesgotável, por ser um exemplo a ser seguido e por ter me ensinado que um livro vale mais que mil moedas.

“Hoje nos encontramos numa fase nova na humanidade. Todos estamos regressando à Casa Comum, à Terra: os povos, as sociedades, as culturas e as religiões. Todos trocamos experiências e valores. Todos nos enriquecemos e nos completamos mutuamente. (...)”

(...) Vamos rir, chorar e aprender. Aprender especialmente como casar Céu e Terra, vale dizer, como combinar o cotidiano com o surpreendente, a imanência opaca dos dias com a transcendência radiosa do espírito, a vida na plena liberdade com a morte simbolizada como um unir-se com os ancestrais, a felicidade discreta nesse mundo com a grande promessa na eternidade. E, ao final, teremos descoberto mil razões para viver mais e melhor, todos juntos, como uma grande família, na mesma Aldeia Comum, generosa e bela, o planeta Terra.”

Leonardo Boff

Casamento entre o céu e a terra. Salamandra, Rio de Janeiro, 2001.pg09

AGRADECIMENTOS

A tese de doutorado é resultado de um longo processo de amadurecimento intelectual e científico e, via de regra, merece um balanço quando concluída. De um lado, alegria, alívio e cansaço; de outro, incertezas, expectativas e otimismo. Ou seja, um "mix" de sentimentos! Também constitui um momento de reconhecimento e, portanto, ficam aqui registrados alguns agradecimentos especiais a algumas pessoas (correndo o risco de ser injusto com tantas outras) que contribuíram de alguma forma para que este trabalho se concretizasse.

Agradeço especialmente à minha orientadora, Profa. Dra. Maria Célia Bertolini, pelos oito anos de trabalho conjunto, pela confiança, amizade, companheirismo, pela oportunidade de compartilhar seu conhecimento e pela sua preocupação em me ensinar Ciência de maneira ética, séria e honesta.

Ao Dr. Peter J. Roach, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA, pela acolhida calorosa, pela preocupação com meu bem estar e por todo o conhecimento que adquiri em seu laboratório. Também à sua esposa, Dra. Anna DePaoli-Roach, pelas sugestões e comentários sempre pertinentes.

Ao amigo Dr. Wayne A. Wilson, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA por acompanhar meu trabalho, pelo aprendizado, por todas as valiosas sugestões e discussões de resultados, assim como pela preciosa amizade.

Ao Dr. Hector Francisco Terenzi e Dr. João Atílio Jorge, Departamento de Biologia, Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, FFCL-RP, USP, Ribeirão Preto, pelas importantes informações com relação ao fungo *N. crassa*, pela ajuda nos experimentos de cruzamento e pelas linhagens cedidas.

À Profa. Dra. Maria José M. S. Giannini, Departamento de Análises Clínicas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, por permitir o uso do biotério para a produção dos anticorpos e do microscópio para as análises de microscopia. Às técnicas Rosângela e Elaine pela ajuda com as sangrias.

Ao amigo Dr. Eduardo Hilario, pela amizade, companheirismo, cumplicidade, paciência, pelos momentos de descontração e pelas boas risadas.

Às amigas Fernanda Zanolli e Elaine Teixeira (as "Bertoletes"), pelo longo período de convivência, pela oportunidade de crescermos juntos, por aturarem minhas incursões às suas bancadas e pelas soluções eventualmente furtadas. Também a Margareth Batistote pela amizade e pelo material preparado nos momentos de sufoco.

À minha excelente assessora e amiga Mônica Terrão, sempre disposta a me auxiliar (mesmo com o peso adicional da pequena Júlia na barriga), pelo desejo de aprender comigo e pela maneira sempre carinhosa e tranquila.

Aos colegas de laboratório que já se foram, Maria Teresa, Rosana, Patrícia Maida, Alessandra Jim, e aos novos que chegaram Evelyn, Alessandro, Patrícia, Marcelo e Juliana.

Aos docentes do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química pelos conhecimentos transmitidos ao longo dos cursos realizados. Ao Prof. Dr. Flavio Henrique da Silva (UFSCar) e à Profa. Dr. Maria de Lourdes T. M. Polizeli (FFCL-USP, Ribeirão Preto) pela participação no Exame Geral de Qualificação e pelas sugestões feitas.

Aos membros do "Peter's Lab", Bart, Zhong, Jill, Jing, Wei e Amy. Ao amigo Giuseppe (Beppe, "Anna's Lab") por todo auxílio prestado por ocasião da minha permanência em Indianapolis e pela valiosa amizade.

Aos companheiros do "Yeast and Pizza Meeting" e aos Drs. Ron Wek, Martin Bart e Mark Goebel.

Aos amigos conquistados em Indianapolis: Jeramy Townsley, Casey Vannorsdall, George Reavis, Shelly Shoe, Tom, Todd e especialmente ao amigo Chris por me ajudar a "segurar a barra" quando a saudade apertava.

Aos amigos conquistados ao longo destes anos em Araraquara: Luciano Apponi, Clelei Zanolli, Jonas Rodrigues, Leonardo Okumura, Marco Bianchi, Patricia Rodella, Karina Deviene, Marisa Fusco, Lilian, Juliana e Daniela Modé.

Aos colegas Luís Otávio, Hosana e Valdemar (Pancada) (Departamento de Química Orgânica) pela ajuda nos experimentos de cromatografia em camada delgada (TLC).

Aos funcionários do Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química: Fernando, Valdenir, Zilda, Sandra, Fátima e especialmente ao Tarcísio pelo imprescindível trabalho no laboratório.

Às funcionárias da Biblioteca Valéria, Cristiane, Cidinha e Priscila. Às funcionárias da Seção de Pós-Graduação Sandra e Patrícia e às "colegas" Célia Coelho, Neusinha, Vilma e Geni.

À FAPESP (Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de São Paulo) pela bolsa concedida.

Finalmente, não poderia deixar de agradecer a minha família, meus irmãos de lutas e vitórias Rosangela e Roberto, meu cunhado Elso e meus queridos sobrinhos Natália, Gabriel, Beatriz, Lara e Lívia, pela alegria com que me recebem sempre que volto para casa.

ÍNDICE

DADOS CURRICULARES	I
AGRADECIMENTOS	V
ABREVIATURAS	X
RESUMO	12
ABSTRACT	14
INTRODUÇÃO	16
O modelo de estudo: o fungo <i>Neurospora crassa</i>	17
O Glicogênio	22
1- A estrutura do glicogênio	22
2- Funções do glicogênio	23
3- O metabolismo de glicogênio – Uma visão geral	25
4- Biossíntese de glicogênio	26
4.1- Início da biossíntese. Auto-glicosilação da enzima glicogenina	26
4.2- Elongação e ramificação. As enzimas glicogênio sintase e ramificadora	31
5- Regulação da atividade glicogênio sintase	35
5.1- Proteínas quinases envolvidas no controle da atividade glicogênio sintase	35
5.2- Proteínas fosfatases envolvidas no controle da atividade glicogênio sintase	40
6- Glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3). Uma proteína com múltiplas facetas.	42
OBJETIVOS	44
MATERIAIS E MÉTODOS	46
1- Linhagens	47
2- Meios de cultura	47
<i>E. coli</i>	47
<i>Neurospora crassa</i>	48
3- Condições de cultivo	48
4- Bibliotecas de cDNA utilizadas	49
5- Extração de DNA genômico do fungo <i>Neurospora crassa</i>	49
6- Clonagem molecular do cDNA da glicogênio sintase quinase-3 de <i>N. crassa</i>	50
6.1- Amplificação de fragmentos do cDNA através de PCR	50
6.2- Rastreamento da biblioteca λAD5-NC	51
6.2.1- Infecção da bactéria hospedeira	51

6.2.2- Réplica das placas de lise	51
6.2.3- Hibridização do cDNA à sonda radioativa	51
6.2.4- Análise dos clones positivos	52
7- Inativação gênica mediada por RIP ("Repeat Induced Point Mutation")	52
7.1- Preparação do vetor para transformação de <i>N. crassa</i>	53
7.2- Transformação de DNA exógeno em <i>N. crassa</i> .	53
7.3- Análise do DNA genômico por "Southern blot"	54
7.3.1- Digestão das amostras e eletroforese	54
7.3.2- Tratamento do gel e transferência para membrana	54
7.3.3- Condições de hibridização e detecção.	54
7.4- Cruzamento das linhagens de <i>N. crassa</i> .	55
7.5- Seleção das linhagens mutantes.	55
8- Reversão fenotípica do mutante RP-1 (<i>gsn^{rip}</i>)	56
9- Dosagem do conteúdo de glicogênio e atividade glicogênio sintase	56
9.1- Preparo dos extratos celulares para as dosagens de glicogênio e atividade GS	56
9.2- Dosagem de glicogênio	57
9.3- Dosagem da atividade glicogênio sintase (GS)	57
10- Análises do mutante <i>gsk^{rip}</i>	58
10.1- Determinação da taxa de crescimento	58
10.2- Análises morfológicas	58
11- Produção de proteínas recombinantes em <i>E. coli</i>	58
11.1- Construção dos plasmídeos para a produção da proteína GSN recombinante	58
11.1.1- Amplificação dos insertos por PCR	58
11.1.2- Subclonagem dos produtos de PCR nos vetores de expressão	60
11.2- Construção do vetor para a produção da proteína GSK recombinante	60
11.2.1- Amplificação dos insertos por PCR	60
11.3- Produção das proteínas recombinantes	60
11.4- Purificação das proteínas recombinantes	61
11.4.1- Purificação de proteínas recombinantes fusionadas à GST	61
11.4.2.- Purificação de proteínas recombinantes fusionadas à poli-Histidinas (His6)	61
12- Produção de anticorpos	62
12.1- Imunização dos coelhos	62
12.2- Análise dos soros obtidos	63
13- Fosforilação <i>in vitro</i> da glicogênio sintase de <i>N. crassa</i>	64
14- Fosforilação <i>in vitro</i> do Inibidor-1 de <i>N. crassa</i> (INc-1) por NcGSK	64
15- Análise da expressão gênica	64
15.1- Preparação de RNA total	64
15.2- Análise da expressão gênica por "Northern blot"	65
RESULTADOS	66

PARTE 1	66
1- Inativação do gene <i>gsn</i>	67
2- Reversão fenotípica do mutante <i>gsn^{rip}</i>	72
3 - Produção e purificação da proteína GSN recombinante	76
4- Ensaio de fosforilação <i>in vitro</i> da GSN	76
5- Atividade glicogênio sintase e conteúdo de glicogênio em linhagens mutantes na via de cAMP	79
6- Análise da expressão do gene <i>gsn</i> em linhagens deficientes na via de AMP cíclico	82
PARTE 2	85
1- Clonagem molecular do cDNA da glicogênio sintase quinase-3 (NcGSK) de <i>N. crassa</i>	86
2- Inativação do gene <i>Ncgsk</i> por RIP	91
3- Análise do mutante <i>Ncgsk^{rip}</i>	95
3.1-Determinação da taxa de crescimento	95
3.2- Análise morfológica	97
4- Produção da proteína NcGSK recombinante em <i>E. coli</i>	97
5- Ensaio da funcionalidade da proteína GST-NcGSK. Fosforilação do Inibidor-1 de <i>N. crassa</i> (INc-1)	100
DISCUSSÃO	102
1- Caracterização dos mecanismos de controle da enzima glicogênio sintase em <i>N. crassa</i> .	103
2- Caracterização da enzima glicogênio sintase quinase-3 em <i>N. crassa</i> .	106
MANUSCRITOS	109
GNN is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in <i>Neurospora crassa</i> . de Paula <i>et al.</i>	110
Biochemical characterization of the GNN, the protein involved in the initiation of glycogen synthesis in <i>Neurospora crassa</i> . de Paula <i>et al.</i>	Erro! Indicador não definido.

ABREVIATURAS

5'- e 3'-UTR	5'- e 3'- "Untranslated Region"
ADP	adenosina difosfato
Ala ou A	alanina
AMP	adenosina monofosfato
AMPc	adenosina monofosfato cíclico
ATP	adenosina trifosfato
bp	"base pair" – pares de bases
BSA	soroalbumina bovina
cDNA	ácido desoxiribonucléico complementar
C-terminal	carboxi-terminal
D.O.	densidade ótica
dATP	desoxiadenosina trifosfato
DEPC	dietil pirocarbonato
DNA	ácido desoxiribonucléico
dNTPs	deoxiribonucleosídeos 5'-trifosfatados (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)
DTT	ditiotreitól
EDTA	Ácido etilenodaminotetracético
GN	glicogenina
GS	glicogênio sintase
GSK-3	glicogênio sintase quinase-3
G1P	glicose-1-fosfato
G6P	glicose-6-fosfato
His ou H	histidina
kb	kilobase
kDa	kilodalton
MOPS	ácido 3-(N-morfolino) propanosulfônico
mRNA	RNA mensageiro
MS	"Mass Spectrometry" – espectrometria de massas
MW	"Molecular Weight"
N-terminal	amino-terminal
ORF	"Open Reading Frame"
PCR	"Polymerase Chain Reaction"
PKA	proteína quinase dependente de AMPc
PM	peso molecular

PSMF	fluoreto de metilfenilsulfonil
RIP	“Repeat Induced Point Mutation”
RNA	ácido ribonucléico
RNAse A	ribonuclease pancreática A
rpm	rotações por minuto
Ser ou S	serina
TAE	tampão Tris-acetato-EDTA
Thr ou T	treonina
TLCK	N- <i>p</i> -tosil-L-lisina clorometilcetona
Tyr ou Y	tirosina
Tris	hidroximetilaminometano
UDP	uridina difosfato
UDPG	uridina difosfato glicose

RESUMO

Glicogênio representa um dos principais carboidratos de reserva em muitos organismos e seu metabolismo está sob o controle de um complexo mecanismo envolvendo o balanço de nutrientes e sinais ambientais. A proteína glicogenina constitui a molécula iniciadora do processo de síntese de glicogênio, sendo as etapas seguintes efetuadas pelas enzimas glicogênio sintase e enzima ramificadora. Glicogênio sintase é a enzima limitante no processo e é regulada alosterismo e fosforilação reversível. Neste trabalho foi realizada uma caracterização do metabolismo de glicogênio no fungo *N. crassa* enfocando as enzimas glicogenina, glicogênio sintase e glicogênio sintase quinase-3.

A proteína glicogenina (GNN) foi caracterizada do ponto de vista molecular, bioquímico e funcional. O cDNA codificando para esta proteína foi isolado e a seqüência polipeptídica deduzida mostrou uma proteína de 664 aminoácidos, uma das maiores proteínas glicogenina já isoladas. A inativação do gene *gnn* resultou em uma linhagem mutante incapaz de acumular glicogênio. A produção da proteína GNN em *E. coli* resultou em um polipeptídeo altamente susceptível à proteólise e formas truncadas da proteína mostraram ser mais estáveis e igualmente ativas nos processos de auto- e trans-glicosilação, além de servirem de substrato para ação da glicogênio sintase. Tais formas também foram capazes de complementar funcionalmente mutantes de *S. cerevisiae*. Além disso, a expressão do gene *gnn* foi mostrado ser regulado durante crescimento vegetativo e deprivação de carbono. Os resíduos Tyr196 e Tyr198 foram identificados como os sítios de glicosilação, os quais contribuem diferencialmente para este processo. Análise das interações entre GNN e a proteína glicogênio sintase de *N. crassa* (GSN) demonstrou que a região C-terminal da GNN é a mais importante para a interação. Entretanto, o estado de glicosilação da GNN não mostrou ser importante para esta interação.

Outro aspecto estudado foi o controle da atividade glicogênio sintase por fosforilação. Os resultados mostraram que a maior parte da fosforilação acontece em 80 resíduos de aminoácidos da região C-terminal e, aproximadamente 70% do processo de fosforilação foi mostrado ser dependente de AMP cíclico. Além disso, os níveis de expressão do gene *gsn*, o conteúdo de glicogênio e a taxa de fosforilação da glicogênio sintase foram alterados em linhagens mutantes na via de AMP cíclico.

A proteína glicogênio sintase quinase-3 (NcGSK) foi também estudada. O cDNA codificando para esta proteína foi isolado, e mutantes neste gene apresentaram diversas alterações morfológicas. Produção da proteína na forma recombinante resultou em uma proteína ativa, a qual foi capaz de fosforilar a proteína INc-1 (inibidor da proteína fosfatase do tipo 1), assim como se autofosforilar.

ABSTRACT

Glycogen represents one of the main reserve carbohydrates in many organisms and its metabolism is under control of a complex mechanism involving the balance of nutrients and environmental signals. The protein glycogenin is the initiator molecule in glycogen biogenesis and the subsequent steps are carried out by the enzymes glycogen synthase and branching enzyme. Glycogen synthase is the rate-limiting enzyme in the process and is regulated both by allostery and reversible phosphorylation. In this work we performed a characterization of the glycogen metabolism in the filamentous fungus *Neurospora crassa*, focusing on the enzymes glycogenin, glycogen synthase and glycogen synthase kinase-3.

The protein glycogenin (GNN) was characterized under the molecular, biochemical and functional aspects. The cDNA encoding for this protein was isolated and the deduced polypeptide sequence showed a protein with 664 residues, one of the largest glycogenins isolated so far. The inactivation of the *gnn* gene rendered a mutant strain that was no longer able to accumulate glycogen. The production of GNN protein in *E. coli* cells resulted in a polypeptide highly susceptible towards proteolysis and truncated forms were more stable and equally active, judged by their abilities to self- and trans-glucosylate, and to serve as substrate for glycogen synthase elongation. These proteins were also able to recover the glycogen deficiency phenotype in a *S. cerevisiae* mutant strain. Moreover, the *gnn* gene expression was shown to be regulated both during vegetative growth and under carbon deprivation. The residues Tyr196 and Tyr198 were identified as the glucosylation sites, each one contributing differently to the glucosylation process. Interaction analysis between GNN and the protein glycogen synthase of *N. crassa* (GSN) demonstrated that the C-terminal region of GNN is the most important for the interaction. In addition, the glucosylation status of GNN seemed not to be important for this interaction.

Another aspect studied in this work was the control of glycogen synthase activity by phosphorylation. The results indicated that the most phosphorylation events were targeted to the last 80 amino acids located at the C-terminal region and, around 70% of the phosphorylation was cAMP dependent. Furthermore, the *gsn* expression levels, the glycogen content as well as the glycogen synthase activity ratio were altered in cAMP pathway mutant strains.

The protein glycogen synthase kinase-3 (NcGSK) was also studied in *N. crassa*. The cDNA (*Ncgsk*) encoding the protein was isolated, and mutations in the gene led to morphological changes. The production of recombinant NcGSK in *E. coli* rendered an active protein that was capable to phosphorylate the protein INc-1 (phosphatase-1 inhibitor), as well as to autophosphorylate.

INTRODUÇÃO

O modelo de estudo: o fungo *Neurospora crassa*

Nas últimas décadas, os fungos filamentosos têm sido amplamente utilizados em pesquisas enfocando questões básicas de genética e bioquímica em organismos eucariotos. Devido à facilidade de cultivo e manipulação genética, tais organismos representam uma ferramenta de extrema importância nos estudos relacionados a diversos processos celulares tais como metabolismo, diferenciação, ciclo celular, reprodução sexual, etc.

O fungo *Neurospora crassa* ganhou uma questionável reputação como o bolor laranja dos pães e foi descrito em 1843 como um contaminante comum das padarias de Paris [1]. Este bolor, o qual produzia esporos alaranjados facilmente dispersos pelo ar, era comumente encontrado nos pães e outras substâncias ricas em carboidratos assim como em resíduos do processamento da cana de açúcar. Quase um século depois, o trabalho pioneiro de Shear e Dodge [2] em 1927, provou que este microrganismo poderia ser utilizado em estudos genéticos com certo sucesso. Estes autores isolaram os corpos de frutificação sexuais do fungo, identificaram dois “mating type” fisiológicos, promoveram cruzamentos e demonstraram que este organismo apresentava um modelo de segregação basicamente mendeliana. Estudos genéticos posteriores neste sistema resultaram dos estudos de segregação de tétrades no locus de “mating type” realizados por Lindegren [3] e, trabalhos subsequentes realizados por Beadle e Tatum [4] levaram ao estabelecimento da relação entre genes e proteínas através da hipótese “um gene, uma enzima”. Por tais estudos, os autores foram laureados, em 1957, com o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia. Juntos, os vários trabalhos contribuíram grandemente para o desenvolvimento de técnicas modernas em diversos campos de estudos tais como a Genética, a Bioquímica e a Biologia Molecular.

Basicamente, o fungo *N. crassa* tem sido usado como organismo modelo em pesquisas há mais de 60 anos e é um dos fungos filamentosos mais bem estudado. Durante esse período, *N. crassa* tem tido um papel fundamental como um sistema modelo, sendo particularmente útil nos estudos que visam à elucidação de processos celulares complexos tais como o sistema de defesa de genomas, metilação de DNA, ritmos circadianos, transporte de

[1] Payen, A. (1843) Extrait d'un rapport adressé à M. Le Marechal de Dalmatie, Ministre de la Guerre, Président du Conseil, sur une altération extraordinaire de pain de monition. *Am. Chim. Phys.* **9**: 5-21.

[2] Shear, C. L. and Dodge, B. O. (1927) Life histories and heterothalms of the red bread mold fungi of the *Monilia sitophila* group. *J. Agr. Res.* **34**: 1108-1124.

[3] Lindegren, C. C. (1939). Non-random crossing over in the second chromosome of *Neurospora crassa*. *Genetics* **24**: 1-7.

[4] Beadle, G. W. and Tatum, E. L. (1941) Genetic control of biochemical reactions in *Neurospora*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **27**: 499-506.

proteínas mitocondriais, reparo de DNA, processos de silenciamento gênico, entre outros [5]. Além disso, sendo um fungo filamentoso multicelular, este organismo constitui um valioso modelo para o estudo dos processos de diferenciação celular e desenvolvimento [6].

Neurospora é um fungo filamentoso, membro da classe dos *Eumicetos*, sub-classe *Ascomicetos* e nesta sub-classe destaca-se como *Euascomiceto*. Pertence à família *Sordariacea* e sub-família *Sphaeriales* [7]. Consiste em um fungo aeróbio restrito, não patogênico aos humanos, animais ou plantas [8], cresce em meios sólidos ou líquidos como um micélio constituído de hifas tubulares, ramificadas, com diâmetro de 5 µm ou menos, septadas e contendo múltiplos núcleos. Por convenção, o espaço delimitado pelos septos é chamado de célula, embora estas não sejam comparáveis às células de organismos superiores uma vez que são polinucleadas. Tais septos não constituem uma barreira física uma vez que possuem poros, com diâmetro aproximado de 0,5 µm, que permitem a passagem do conteúdo citoplasmático entre as células, incluindo a passagem de núcleos.

Os requisitos nutricionais do fungo *N. crassa* são particularmente simples. Tal organismo cresce vigorosamente em meios de cultura de composição definida, contendo apenas uma fonte de carbono, uma mistura de sais e alguns micronutrientes [9], e o único requisito essencial é a vitamina biotina. Sendo um organismo heterotrófico, pode usar diversas substâncias como fonte de carbono tais como glicose, acetato, succinato, glicerol, manose, frutose, maltose, celobiose, sacarose, oligo e polissacarídeos e aminoácidos. O nitrogênio é metabolizado sob forma de amônia, que pode ser obtido em forma direta ou através da transformação de nitrito, nitrato, aminoácidos ou degradação de proteínas e ácidos nucleicos. A faixa de crescimento situa-se entre pH 4,0 e 9,0, sendo o crescimento otimizado em pH ao redor de 5,4 [10].

Em geral, o crescimento ocorre através do desenvolvimento polarizado das hifas, o qual chega a atingir uma velocidade de 0,6 cm/h [11]. O tempo de duplicação celular é ao redor de 150 min. Enquanto a hifa cresce, ramificações laterais são formadas podendo, potencialmente,

[5] Davis, R. H. (2000) *Neurospora: Contributions of a Model Organism* (Oxford Univ. Press., New York).

[6] Davis, R. H and Perkins, D. D. (2002) *Neurospora: a model of model microbes*, *Nature Rev. Genet.* **3**: 397-403.

[7] Esser, K. and Kuenen, R. (1967) *Genetics of Fungi*, Springer-Verlag Press Heidelberg, 16-18.

[8] Metzzenberg, R. L. (1979) Implications of some genetic control mechanisms in *Neurospora*, *Microbiol. Rev.* **43**: 361-383.

[9] Davis, R. H. and Serres, F. J. (1970) Genetic and microbiological research techniques for *Neurospora crassa*. *Meth. Enzymol.* **17A**: 70-143.

[10] Thedei, Jr. G.; Doubowetz, T. H. and Rossi, A. (1994) Effect of carbon source and extracellular pH on the acidification of the culture médium and phosphate excretion in *Neurospora crassa*. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **27**: 1129-1134.

[11] Perkins, D. D.; Turner, B. C. and Barry, E. G. (1976) Strains of *Neurospora* collected from nature. *Evolution* **30**: 281-313.

crecerem como uma hifa primária. À medida que o crescimento progride, uma rede complexa e entrelaçada se forma, dando origem ao micélio. Quando crescido em condições adequadas de abundância de nitrogênio, esporos assexuais, ou conídios, são produzidos por duas vias: macroconidiação e microconidiação. Ambas as vias requerem uma interface ar-água e, portanto, são reprimidas em culturas submersas. A macroconidiação é iniciada pela produção de uma hifa aérea especializada acima da superfície do ágar. Os conidióforos são formados nas extremidades da hifa aérea e dão origem a cadeias de macroconídios multinucleados. A microconidiação difere da macroconidiação pelo fato de que esporos uninucleados se formam dentro da hifa basal e são expelidos a partir da parede da hifa quando o processo de maturação se completa. Ambos os tipos de conídios servem como estruturas de propagação do fungo.

Sendo um fungo heterotálico, *N. crassa* possui dois indivíduos com “mating type” distintos, designados **A** e **a**. Nenhuma diferença morfológica é observada em cepas de “mating type” diferentes. Duas linhagens de tipos sexuais opostos são competentes para o cruzamento e ambos podem se comportar como “macho” (doador) ou “fêmea” (receptor protoperitecical). Em resposta a condições de limitação de nitrogênio, o fungo entra no ciclo sexual através da formação de estruturas reprodutivas denominadas protoperitécios. Por convenção, esta estrutura é considerada o órgão de reprodução feminino. A fertilização ocorre quando o núcleo de uma célula de “mating type” oposto entra em contato com uma hifa especializada denominada tricógino, a qual emana a partir do protoperitécio. O núcleo masculino então “caminha” pelo tricógino até o protoperitécio dando origem ao peritécio. Os núcleos masculino e feminino, então, dividem-se sincronicamente, onde ocorre a síntese pré-meiótica de DNA. Estes eventos culminam com a fusão dos núcleos (cariogamia) dando origem aos núcleos diplóides. Este corresponde ao único momento no ciclo de vida de *N. crassa* onde se observa a presença de diplóides. Subseqüentemente, os núcleos diplóides sofrem duas divisões, sendo a primeira meiótica, seguida por uma divisão mitótica, dando origem a oito núcleos ao redor dos quais os ascósporos são delineados. Os ascósporos podem então ser induzidos à germinação por choque térmico ou químico, retornando à fase vegetativa do ciclo de vida [12]. A figura 1 representa o ciclo de vida do fungo *N. crassa*.

O recente sequenciamento do genoma de *N. crassa* trouxe importantes informações sobre as características genéticas e bioquímicas deste microrganismo e sinalizou para as potencialidades advindas dos estudos usando este organismo modelo [13]. O genoma de *N. crassa* contém aproximadamente 40 Mb sendo, portanto, muito maior que os genomas de *S. cerevisiae* e *S. pombe* (aproximadamente 12 Mb). O genoma é organizado em 7 cromossomos

[12] Metzenberg, R. L. and Glass, N. L. (1990) Mating type and mating strategies in *Neurospora*, *BioEssays* **12**: 53-59.

[13] Galagan, J. E.; Calvo, S. E.; Borkovitch, K. A. *et al.*, (2003) The genome sequence of the filamentous fungus *Neurospora crassa*, *Nature*, **422**: 859-868.

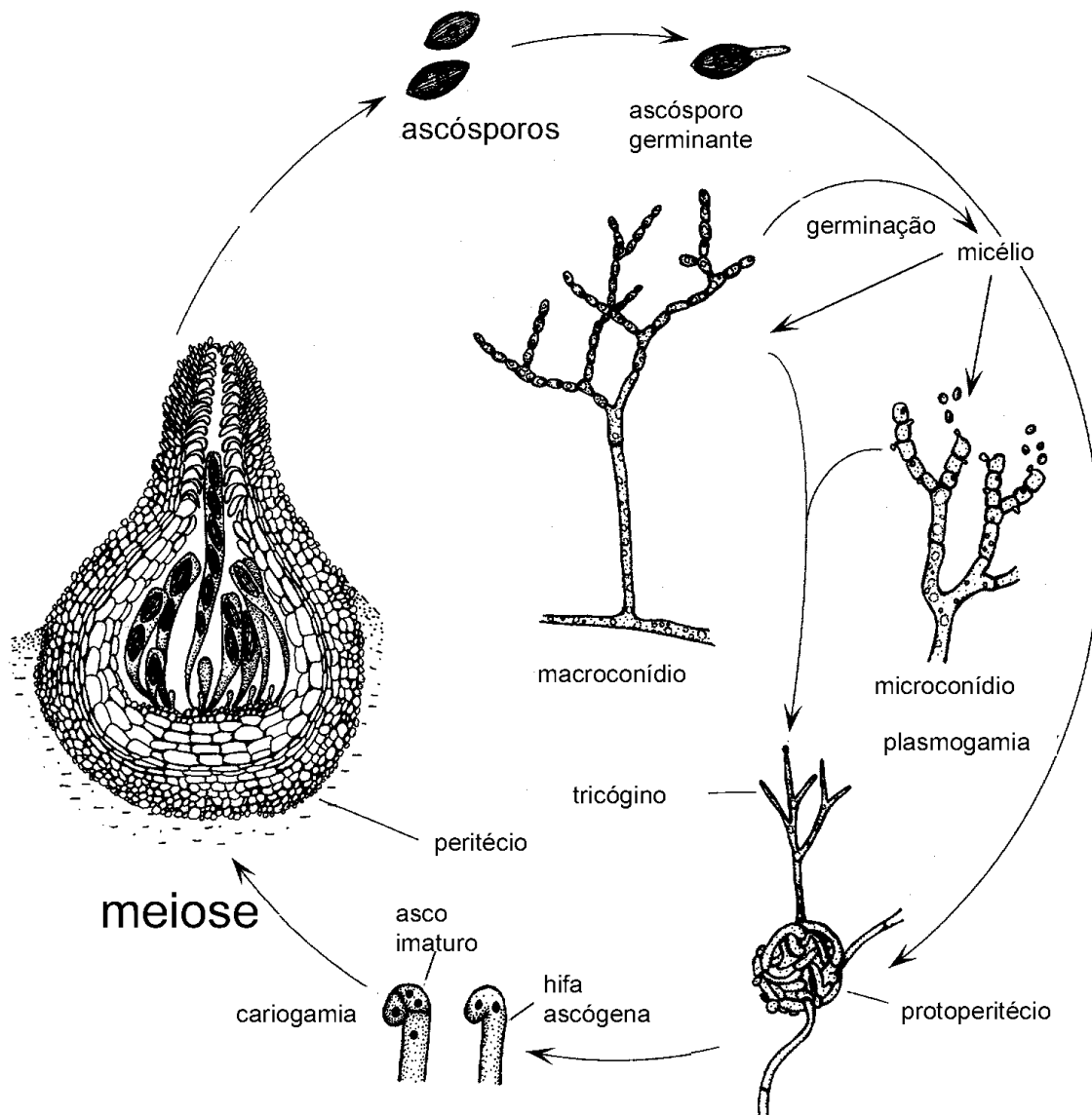


Figura 1- Ciclo de vida do fungo *Neurospora crassa* [14]

[14] Griffin, D. H. – Fungal Physiology, 2nd ed., by Willey-Liss, 1994.

cujos tamanhos variam de 4 a 10 Mb [15]. Com relação ao número de genes, *N. crassa* possui cerca de 10.000 genes, um número duas vezes maior ao observado nas duas leveduras citadas anteriormente e apenas 25% menor ao número de genes deduzidos em *Drosophila melanogaster* (~14.300).

Do total dos genes anotados de *N. crassa*, 4.140 (41%) proteínas deduzidas carecem de significantes ortólogos nos banco de dados públicos, o que reflete o pouco conhecimento dos genomas de fungos assim como a diversidade dos genes em fungos ainda não descritos. Além disso, 57% das proteínas não apresentam ortólogos em ambos *S. cerevisiae* e *S. pombe*. Quando comparado às seqüências de outros eucariotos, um total de 14% das proteínas do fungo apresentou melhor similaridade a proteínas de plantas ou animais, o que demonstra a biologia compartilhada entre fungos filamentosos e eucariotos superiores, a qual, em muitos casos, está ausente em leveduras.

Neurospora representa um importante modelo para o estudo de fenômenos epigenéticos, possuindo uma ampla variedade de mecanismos de defesa do seu genoma. O mais notável destes mecanismos é denominado “Repeat Induced Point Mutation” (RIP), sendo este um mecanismo restrito aos fungos filamentosos. Inicialmente descrito em *N. crassa* [16, 17], este processo tem sido proposto atuar como um mecanismo de defesa do organismo contra DNAs móveis e elementos de transposição. RIP é um processo que detecta seqüências duplicadas no genoma e eficientemente provoca mutações em ambas as cópias. Este processo ocorre exclusivamente durante o ciclo sexual, especificamente no período pré-meiótico, quando o organismo promove um rastreamento do seu genoma em busca de duplicações em suas seqüências. Quando tais duplicações são encontradas, mutações GC→AT são aleatoriamente introduzidas, em ambas as seqüências duplicadas. Em uma única passagem pelo ciclo sexual, cerca de 30% dos pares CG nas seqüências duplicadas podem ser mutados, embora a extensão deste processo dependa de fatores tais como o tamanho das seqüências duplicadas e a distâncias entre elas [18]. A maior preferência ocorre para mutações C→T dentro do dinucleotídeo CpA. Tais modelos de mutação permitem que as seqüências mutadas por RIP

[15] Schulte, U.; Becker, I.; Mewes, H. W. and Mannhaupt, G. (2002) Large scale analysis of sequences from *Neurospora crassa*, *Journal of Biotechnology* **94**:3-13.

[16] Selker, E. U.; Cambareri, E. B.; Jensen, B. C. and Haack, K. R. (1987) Rearrangement of duplicated DNA in specialized cells of *Neurospora*, *Cell* **51**: 741-752

[17] Selker, E. U. (1990) Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*, *Annu. Rev. Genet.* **24**: 579-613.

[18] Perkins, D. D.; Margolin, B. S.; Selker, E. U. and Haedo, S. D. (1997) Occurrence of Repeat Induced Point Mutation in long segmental duplications of *Neurospora*, *Genetics* **147**: 125-136.

sejam eficientemente detectadas [19]. Além disso, o processo somente provoca mutações em seqüências que apresentam ao redor de 80% de identidade [20].

Além de sofrer mutações, as seqüências afetadas pelo processo de RIP são, freqüentemente, alvos para a metilação de DNA. Assim como em mamíferos, este processo tem sido mostrado provocar o silenciamento de genes em *Neurospora* [21]. Deste modo, o processo de RIP em *Neurospora* provoca mutações e também silencia epigeneticamente seqüências de DNA duplicadas. Embora tenha sido inicialmente considerado um mecanismo de defesa do genoma do fungo, RIP também atua além dos limites das seqüências duplicadas [22], provocando efeitos epigenéticos na vizinhança das duplicações.

Além do processo de RIP, *N. crassa* também possui outros mecanismos de silenciamento gênico, os quais atuam em outros estágios de desenvolvimento deste microrganismo. Entre eles, pode-se destacar o processo de “quelling” [23], o qual atua durante o crescimento vegetativo do fungo. Os mecanismos pelos quais esse processo acontece, entretanto, não são completamente compreendidos.

Sendo assim, *Neurospora crassa* tem servido como um valioso modelo de estudos por várias décadas, e a presença de um grande número de genes em seu genoma ainda com funções desconhecidas, aponta este organismo como um promissor modelo para o estudo de novos mecanismos genéticos e bioquímicos até o momento não identificados.

O Glicogênio

1- A estrutura do glicogênio

Polímeros de glicose são amplamente distribuídos na natureza, como glicogênio e amido, e são geralmente considerados como reservas intracelulares de glicose. De um modo geral, todas as células de mamíferos apresentam acúmulo de glicogênio, embora o

[19] Margolin, B. S. (1998) A methylated *Neurospora* 5S rRNA pseudogene contains a transposable element inactivated by repeat-induced point mutation, *Genetics* **149**: 1787-1797.

[20] Cambareri, E. B.; Singer, M. I. and Selker, E. U. (1991) Recurrence of repeat-induced point mutation (RIP) in *Neurospora crassa*, *Genetics* **127**: 699-710.

[21] Rountree, M. R. and Selker, E. U. (1997) DNA methylation inhibits elongation but not initiation of transcription in *Neurospora crassa*, *Genes Dev.* **11**: 2383-2395.

[22] Irelan, I. T.; Hagemann, A. T. and Selker, E. U. (1994) High frequency repeat-induced point mutation is not associated with efficient recombination in *Neurospora*, *Genetics* **138**: 1093-1103.

[23] Romano, N. and Macino, G. (1992) Quelling, transient inactivation of gene expression in *Neurospora crassa* by transformation with homologous sequences, *Mol. Microbiol.* **6**: 3343-3353.

metabolismo deste polímero seja muito mais proeminente em miócitos e hepatócitos, locais onde este polímero exerce funções distintas [24].

O glicogênio é um polímero ramificado de glicose, as quais são unidas através de ligações glicosídicas α -1,4 formando cadeias cujo tamanho médio é de 11-14 resíduos. Os pontos de ramificação são resultados das ligações glicosídicas α -1,6 e, de um modo geral, tais ramificações acontecem a cada 4 resíduos de glicose (figura 2A). Desse modo, a molécula de glicogênio é caracterizada pela sua massa (relativa ao número total de resíduos de glicose), sua estrutura ramificada e ligações covalentes a outros constituintes. Tal estrutura confere a esta molécula uma característica altamente compacta o que permite às células acumular uma grande quantidade de moléculas de glicose intracelular sem aumentar a osmolaridade do citoplasma [25].

Moléculas de glicogênio podem ser visualizadas por microscopia eletrônica usando métodos histoquímicos ou coloração negativa [26]. Usando tais métodos, metais pesados coram grânulos correspondentes às partículas de glicogênio pela interação com as proteínas associadas ao polímero (figura 2B).

Além de moléculas de glicose polimerizada, um dos principais constituintes da molécula de glicogênio é proteína. Glicogênio de músculo de coelho apresenta, em média, 0,35% do seu peso em proteína [27]. Esta abundância de proteína corresponde a uma razão molar 1:1 da proteína iniciadora glicogenina para a molécula de glicogênio com peso molecular ao redor de 10^7 . Dois outros componentes da molécula de glicogênio são glucosamina [28] e fosfato [29], embora a função destes constituintes, nesta molécula, seja pouco óbvia.

2- Funções do glicogênio

De um modo geral, tanto em microrganismos quanto em mamíferos, o glicogênio tem sido considerado uma reserva de glicose, sintetizado em períodos de abundância de nutrientes e degradado posteriormente, em tempos de necessidade, quando as células enfrentam escassez de tais nutrientes [24]. Tal proposição é amplamente aceita em células de mamíferos,

[24] Devlin, T. M. (1992) Textbook of Biochemistry with clinical correlations, 3rd edition, Willey-Liss

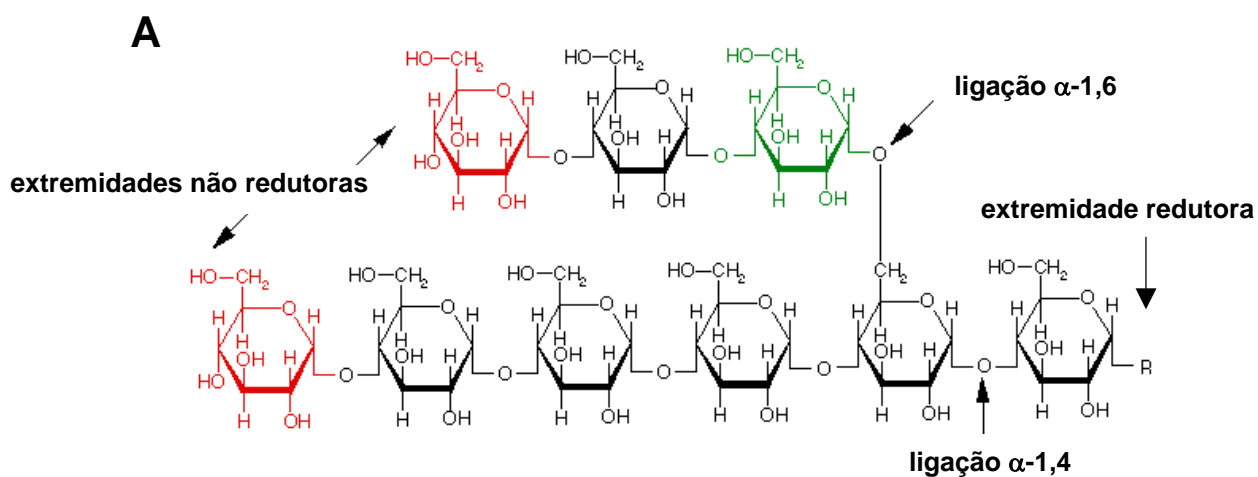
[25] Roach, P. J.; Skurat, A. V. and Harris, R. A. (2001), Regulation of glycogen metabolism, in Handbook of Physiology – The endocrine pancreas and regulation of metabolism, Oxford University Press.

[26] Rybicka, K. K. (1996) Glycosomes – the organelles of glycogen metabolism, *Tissue Cell* **28**: 253-265.

[27] Kennedy, L. D.; Kirkman, B. R.; Lomako, J.; Rodriguez, I. R. e Whelan, W. J. (1985) The biogenesis of rabbit muscle glycogen, *Membranes and Muscle*, Oxford Press p. 65-84.

[28] Kirkman, B. R. and Whelan, J. W. (1986) Glucosamine is a normal component of liver glycogen, *FEBS Lett.* **194**: 6-11.

[29] Fontana, J. D. (1980) The presence of phosphate in glycogen, *FEBS Lett.* **109**: 85-92.



B



Figura 2- A- Representação das ligações α -1,4 e α -1,6 glicosídicas na molécula de glicogênio [24]. **B-** Eletromicrografia de uma célula hepática. Os grânulos de glicogênio são representados pelas estruturas escuras agrupadas [30].

[30] Garret, R. H. and Grisham, C. M. – Biochemistry, 1st edition, Saunders College Publishing, 1995.

onde a maior parte da glicose ingerida é convertida em glicogênio. Em células hepáticas, onde seu metabolismo é fortemente regulado pelo estado nutricional, o conteúdo de glicogênio é rapidamente diminuído em condições de jejum e completamente restaurado após as refeições. A função do glicogênio hepático consiste em ser convertido a glicose livre que pode, então, ser liberada para manter a homeostase de glicose sanguínea. No tecido muscular, o glicogênio, embora seja menos responsivo ao estado nutricional, é usado basicamente para produzir energia durante o exercício físico.

Embora o papel do glicogênio como reserva de nutriente para as células seja bem aceito, isto não elimina outras possíveis funções deste polímero, que até o momento não são inteiramente entendidas. O relato da presença de glicogênio dentro do núcleo [31] tem sido controverso. Uma proposição para a função do glicogênio nuclear veio de estudos utilizando extratos de ovos de *Xenopus*, o qual pressupõe que o glicogênio seria importante para o processo de condensação de cromatina e formação do núcleo [32]. Tal função para a molécula do glicogênio, entretanto, não é completamente aceita e pode ser restrita ao modelo estudado. De qualquer forma, seria importante não considerarmos que todas as funções do glicogênio são completamente conhecidas.

3- O metabolismo de glicogênio – Uma visão geral

De um modo geral, o metabolismo de glicogênio em tecidos específicos tais como o fígado e o músculo compartilham algumas etapas em comum, embora diferenças significantes nesta via metabólica sejam observadas nestes dois tecidos. Isto reflete a presença de isoformas distintas de enzimas em ambos os tecidos.

Glicose livre entra nas células através de transportadores de glicose específicos. Em células hepáticas, os transportadores GLUT-2 possuem alto K_m por glicose, o que basicamente permite que tais moléculas entrem livremente nas células quando a concentração de glicose sanguínea for alta. Por outro lado, células musculares expressam transportadores GLUT-4, os quais possuem baixo K_m e, portanto, limitam a entrada de glicose nestas células [33]. Além

[31] Ferrans, V. J.; Maron, B. J.; Buja, L. M.; Ali, N. and Roberts, W. C. (1975) Intranuclear glycogen deposits in human cardiac muscle cells, ultrastructure and cytochemistry, *J. Mol. Cell. Cardio.* **7**: 373-386.

[32] Hartl, P.; Olson, E.; Dang, T. and 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**: 235-248.

[33] Olson, A. L. and Pessin, J. E. (1996) Structure, function, and regulation of the mammalian facilitative glucose transporter gene family, *Annu. Rev. Nutr.* **16**: 235-256.

disso, transportadores GLUT-4 são regulados hormonalmente, sendo recrutados para a membrana plasmática pela ação de insulina [34].

Após entrada nas células, a glicose é convertida a UDP-glicose por reações seqüenciais que envolvem a ação das enzimas hexoquinase (ou glicocinase, no fígado), fosfoglicomutase e UDP-glicose pirofosforilase. O açúcar nucleosídeo formado (UDP-glicose) atua fornecendo a porção glicosil para o estágio inicial de síntese de glicogênio, a qual envolve a ação da enzima glicogenina, assim como para o processo de alongação, efetuada pela enzima glicogênio sintase. A síntese global se completa pela atuação da enzima ramificadora, a qual produz os pontos de ramificação.

A quebra do glicogênio é efetuada pelas enzimas glicogênio fosforilase e enzima desramificadora, gerando glicose-1-fosfato e uma pequena quantidade de glicose livre. Glicose-1-fosfato pode, então, ser convertida em glicose-6-fosfato, a qual pode ser usada para a glicólise. Além disso, as enzimas frutose-1,6-fosfatase e glicose-6-fosfatase são expressas exclusivamente no tecido hepático e convertem glicose-6-fosfato em glicose livre, que pode ser liberada diretamente na corrente sanguínea. A Figura 3 mostra um esquema representando o fluxo de glicose dentro das células e o processo geral de metabolismo de glicogênio.

4- Biossíntese de glicogênio

4.1- Início da biossíntese. Auto-glicosilação da enzima glicogenina

Os primeiros indícios de que o acceptor inicial para a síntese de glicogênio era uma proteína vieram dos estudos de Krisman e Barengo [35], os quais tentaram responder como a síntese *de novo* do glicogênio era efetuada. Posteriormente uma proteína, denominada glicogenina, foi isolada e caracterizada como possuindo um papel no início da síntese [27]. A glicogenina de músculo esquelético de coelho corresponde a isoforma melhor estudada, a qual possui 332 resíduos de aminoácidos, com um peso molecular aproximado ao redor de 37 kDa [36]. Esta proteína co-purifica com a enzima glicogênio sintase e foi mostrada estar covalentemente ligada ao glicogênio [37]. Em solução a proteína se comporta como um

[34] Kahn, B. B. (1996) Glucose transport: pivotal step in insulin action, *Diabetes* **45**: 1644-1654.

[35] Krisman, C. R. and Barengo, R. (1975) A precursor of glycogen biosynthesis: α -1,4-glucan-protein, *Eur. J. Biochem.* **52**: 117-123.

[36] Viskupic, E.; Cao, Y.; Zhang, W.; Cheng, C.; DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (1992) Rabbit skeletal muscle glycogenin. Molecular cloning, and production of fully functional protein in *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.* **267**: 25759-25763.

[37] Alonso, M. D.; Lomako, J.; Lomako, W. M. and Whelan, W. J. (1995) A new look at the biogenesis of glycogen, *FASEB J.* **9**: 1126-1137.

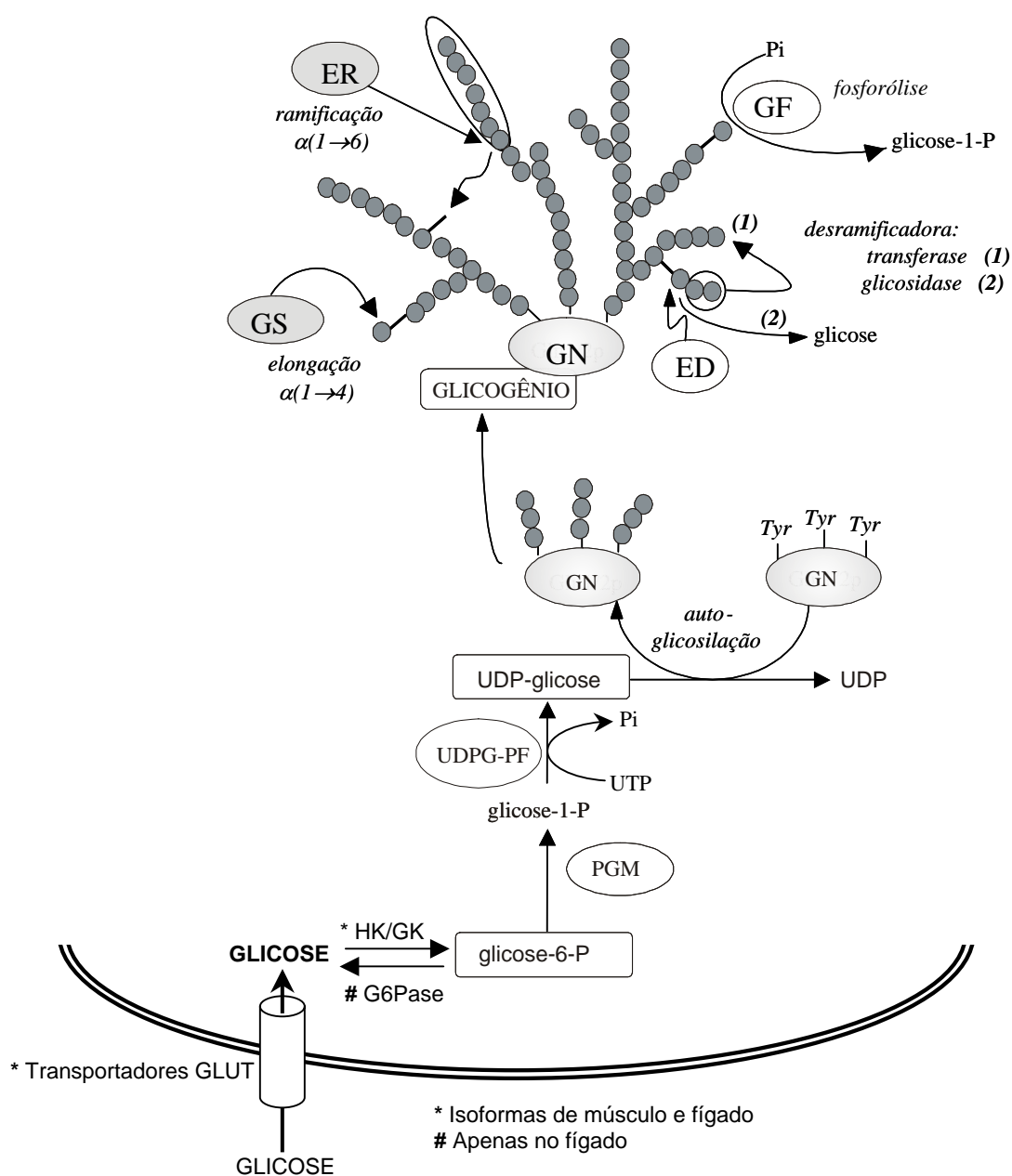


Figura 3- Transporte de glicose e metabolismo de glicogênio [38, modificado]. **GLUT**- transportadores de glicose, **HK/GK**- hexoquinase/glicoquinase, **G6Pase**- glicose-6-fosfatase, **PGM**- fosfoglicomutase, **UDPG-PF**- uridina difosfoglicose pirofosforilase, **GN**- glicogenina, **GS**- glicogênio sintase, **ER**- enzima ramificadora do glicogênio, **ED**- enzima desramificadora, **GF**- glicogênio fosforilase.

[38] François, J. and Parrou, J. L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Reviews* **25**: 125-145.

dímero [39], embora a estrutura tetramérica seja possível [40]. A estrutura tri-dimensional da glicogenina de músculo de coelho foi, recentemente, resolvida em nível de 1,9 Å e constitui um modelo para estudos de estrutura-função desta proteína [41].

Uma das principais características desta enzima é sua capacidade de se auto-glicosilar, usando UDP-glicose como a molécula doadora do resíduo glicosil. A reação é altamente estimulada pela presença de íons Mn^{2+} [42]. O processo de auto-glicosilação é resultado da formação de uma ligação C-1-O-tirosil entre a glicose e um resíduo de tirosina. Posteriormente o resíduo Tyr¹⁹⁴ da proteína de músculo de coelho foi identificado como sendo glicosilado [43] e estudos de mutagênese sítio-dirigida mostraram que a mutação Tyr¹⁹⁴→Phe gerou uma proteína incapaz de se auto-glicosilar [44]. O processo de auto-glicosilação continua, com a formação de ligações glicosídicas α-1,4 levando à produção de uma cadeia contendo de 8 a 12 resíduos de glicose. Deste modo, duas atividades estão presentes na enzima glicogenina, uma capaz de catalisar a formação de ligações C-1-O-tirosil e outra responsável pela formação das ligações glicosídicas α-1,4.

Além das atividades descritas acima, a proteína glicogenina possui também a capacidade de transferir resíduos de glicose para pequenos aceptores, um processo denominado trans-glicosilação [38]. A importância deste processo, em nível fisiológico, não é muito bem compreendida.

Algumas características bioquímicas da enzima glicogenina tornam esta proteína interessante do ponto de vista catalítico. Estudos demonstraram que a reação de catálise é independente da concentração de proteína, o que sugeriu um mecanismo de reação intramolecular [42]. Isso significa que a reação acontece sobre cada dímero independentemente, e não existe atuação de um dímero sobre outro. Além disso, estudos de mutagênese mostraram que a reação acontece inter-subunidades, com um monômero do

[39] Smythe, C.; Watt, P. and Cohen, P. (1990) Further studies on the role of glycogenin in glycogen biosynthesis, *Eur. J. Biochem.* **189**: 199-204.

[40] Cao, Y.; Steinrauf, L. K. and Roach, P. J. (1995) Mechanisms of glycogenin self glucosylation, *Arch. Biochem. Biophys.* **319**: 293-298.

[41] Gibbons, B. J.; Roach, P. J. and Hurley, T. D. (2002) Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J. Mol. Biol.* **319**: 463-477.

[42] Lomako, J. W.; Lomako, M. and Whelan, W. J. (1988) A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis, *FASEB J.* **2**: 3097-3103.

[43] Smythe, C.; Caudwell, F. B.; Ferguson, M. and Cohen, P. (1988) Isolation and structural analysis of a peptide containing the novel tyrosyl-glucose linkage in glycogenin, *EMBO J.* **7**: 2681-2686;

[44] Cao, Y.; Mahrenholz, A. M.; DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (1993) Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function, *J. Biol. Chem.* **268**: 14687-14693

dímero catalisando a incorporação de resíduos de glicose no outro monômero [45]. Sendo assim, a enzima glicogenina é incomum pelo fato de ser, ela própria, uma forma modificada da reação a qual catalisa.

Uma vez glicosilada, a glicogenina pode servir como substrato para a enzima glicogênio sintase, a qual pode alongar o “primer” oligossacarídico ligado à molécula de glicogenina. Foi proposto que a presença da cadeia oligossacarídica na enzima glicogenina afeta as interações com a glicogênio sintase, e que o processo de alongação seja dependente do tamanho desta cadeia [46]. Interações proteína-proteína entre glicogenina e glicogênio sintase são, entretanto, prováveis de acontecer. Preparação da glicogenina de músculo esquelético de coelho identificou a enzima glicogênio sintase como um contaminante, a qual co-purificou com a glicogenina, obedecendo a uma estequiometria de 1:1, o que sugeriu uma forte interação física entre estas proteínas [47]. Além disso, outra evidência da interação proteína-proteína entre glicogenina e glicogênio sintase vieram da clonagem do gene *Glg2* de *S. cerevisiae*, o qual codifica uma enzima similar à proteína glicogenina de coelho [48]. O gene *Glg2* foi clonado através de um rastreamento de duplo-híbrido usando como “isca” a proteína Gsy2p, a qual, juntamente com Gsy1p, correspondem as duas isoformas da glicogênio sintase presentes em *S. cerevisiae* [46].

A visão de um mecanismo de controle sobre a atividade da proteína glicogenina tem sido controversa, até o momento. Existem poucos relatos que comprovem claramente, o controle da expressão gênica de proteínas glicogeninas. A modulação da expressão gênica desta proteína tem sido apenas observada durante o processo de desenvolvimento de galinhas [49]. Lomako *et. al.* relataram a fosforilação da glicogenina no resíduo Ser⁴³ *in vitro* pela PKA [50], embora este resultado seja contestado por outros grupos. Roach *et. al.* [51] demonstraram

[45] Lin, W.; Mu, J and Roach, P. J. (1999) Self-glucosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an intersubunit reaction, *Arch. Biochem. Biophys.* **363**: 167-170.

[46] Cao, Y.; Skurat, A. V.; DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. Initiation of glycogen synthesis. Control of glycogenin by glycogen phosphorylase, *J. Biol. Chem.* **268**: 21717-21721.

[47] Pitcher, J.; Smythe, C.; Campbell, D. G. and Cohen, P. (1987) Glycogenin is the priming glucosyltransferase required for the initiation of glycogen biogenesis in rabbit skeletal muscle, *Eur. J. Biochem.* **169**: 497-502.

[48] Cheng, C.; Mu, J.; Farkas, I.; Huang, D.; Goebel, M. G. and Roach, P. J. (1995) Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6632-6640.

[49] Carrizo, M. E.; Romero, J. M.; Miozzo, M. C.; Brocco, M.; Panzetta, P. and Curtino, J. A. (1997) Biosynthesis of proteoglycogen: Modulation of glycogenin expression in the developing chicken, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**: 142-145.

[50] Lomako, J. and Whelan, W. J. (1988) The occurrence of serine phosphate in glycogenin: a possible regulatory site, *Biofactors* **1**: 261-264.

um possível controle da atividade glicogenina por glicose. Os autores sugeriram que glicose poderia modular os níveis de glicosilação da glicogenina, ou seja, o comprimento da cadeia oligossacarídica, o que a tornaria um melhor substrato para o processo de alongação, catalisada pela glicogênio sintase. O mecanismo oposto, efetuado pela ação da glicogênio fosforilase reduziria o comprimento da cadeia oligossarídica, tornando a glicogenina menos susceptível à alongação pela glicogênio sintase [44]. Uma vez que a atividade glicogênio fosforilase é regulada por glicose, os níveis intracelulares deste açúcar poderiam, portanto, controlar o nível de glicosilação da glicogenina, modulando sua capacidade de funcionar como um substrato para a alongação do polímero de glicogênio.

A pesquisa por proteínas glicogeninas ou proteínas com atividade de auto-glicosilação nos bancos de dados tem gerado muitos resultados, os quais aumentam gradativamente em função da determinação de genomas completos. Duas isoformas estão presentes em humanos, as quais são diferencialmente expressas, a glicogenina 1 é amplamente distribuída em tecidos humanos, embora seja detectada em baixos níveis no fígado [52], e uma outra forma, a glicogenina 2, codificada por um gene específico, e mais amplamente expressa no fígado, embora também tenha sido detectada no coração e pâncreas [53].

A levedura *S. cerevisiae* possui duas isoformas de glicogenina, Glg1p e Glg2p, as quais são codificadas pelos genes *Glg1* e *Glg2*, respectivamente [46]. Estas proteínas possuem 55% de identidade entre si na região N-terminal correspondendo aos primeiros 260 aminoácidos, e aproximadamente 33% de identidade com as glicogeninas de mamíferos na mesma região, a qual, possivelmente, contém o domínio catalítico. A proteína Glg1p, com um peso molecular aproximado de 70 kDa possui uma longa extensão C-terminal, ausente nas demais glicogeninas. A função para essa extensão é desconhecida até o momento [46]. Com relação à funcionalidade, as proteínas Glg também apresentam a capacidade de auto-glicosilação, sendo que a proteína Glg1 possui apenas um resíduo glicosilável (Tyr²³²) enquanto que mutações nos resíduos Tyr²³⁰ e Tyr²³² da proteína Glg2p foram necessárias para abolir a auto-glicosilação [54].

[51] Skurat, A. V.; Cao, Y. and Roach, P. J. (1993) Glucose control of rabbit skeletal muscle glycogenin expressed in COS cells, *J. Biol. Chem.* **268**: 14701-14707.

[52] Roach, P. J. and Skurat, A. V. (1997) Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis, *Prog. Nucleic. Acid. Res. Mol. Biol.* **57**: 289-316.

[53] Mu, J.; Skurat, A. V. and Roach, P. J. (1997) Glycogenin-2, a novel self-glucosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis, *J. Biol. Chem.* **272**: 27589-27597.

[54] Mu, J.; Cheng, C. and Roach, P. J. (1996) Initiation of glycogen synthesis in yeast. Requirement of multiple tyrosine residues for function of the self-glucosylating Glg proteins in vivo, *J. Biol. Chem.* **271**: 25664-26560.

Recentemente, uma nova proteína a qual interage diretamente com a glicogenina de músculo de coelho foi isolada [55]. Esta proteína, denominada GNIP (glycogenin interacting protein), existe como quatro diferentes isoformas, resultantes do processo de “splicing” alternativo de um único gene. Também foi mostrado que a ligação desta proteína à glicogenina aumentou 3-4 vezes a capacidade de autoglicosilação da mesma [53]. Posteriormente, os mesmos autores demonstraram através de ensaios de duplo-híbrido que a isoforma GNIP2 podia formar interações consigo mesma e com a isoforma GNIP1 [56]. Considerando a natureza dimérica da enzima glicogenina, pode-se portanto pressupor a existência de complexos multiméricos entre glicogenina e GNIPs, embora a função fisiológica destes complexos, assim como sua atuação no processo catalítico sejam desconhecidos até o momento.

A função das proteínas glicogeninas parece estar diretamente ligada ao processo de iniciação da biogênese de glicogênio, tanto em células de mamíferos quanto em microrganismos, pelo menos em *S. cerevisiae*, onde estas proteínas foram caracterizadas do ponto de vista molecular e bioquímico. Como citado anteriormente, as proteínas glicogeninas possuem uma atividade de trans-glicosilação, a qual permite que estas proteínas transfiram resíduos de glicose para outros aceptores [38]. A relevância desta propriedade ainda não foi completamente compreendida e dá origem à questão se estas proteínas podem funcionar como glicosil transferases em outros processos que não o metabolismo de glicogênio.

4.2- Elongação e ramificação. As enzimas glicogênio sintase e ramificadora

A enzima glicogênio sintase catalisa a formação de ligações glicosídicas α -1,4 através da transferência de resíduos glicosil da UDP-glicose a extremidades não redutoras de uma cadeia pré-existente. Esta proteína é amplamente distribuída nas células animais, embora sua regulação seja melhor entendida nos tecidos hepático e muscular. Glicogênio sintase foi a terceira enzima mostrada ser regulada por fosforilação reversível [57]. Em mamíferos, duas isoformas foram descritas e seus cDNAs foram clonados [58, 59] A maior parte dos tecidos

[55] Skurat, A. V.; Dietrich, A. D.; Zhai, L. and Roach, P. J. (2002) GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glycosylating initiator of glycogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 19331-19338.

[56] Zhai, L.; Dietrich, A. D.; Skurat, A. V. and Roach, P. J. (2004) Structure-function analysis of GNIP, the glycogenin-interacting protein, *Arch. Biochem. Biophys.* **421**: 236-242.

[57] Friedman, D. L. and Lerner, J. (1963) Studies on UDPG- α -glucan trans-glucosylase III. Interconversion of two forms of muscle UDPG- α -glucan transglucosylase by a phosphorylation-dephosphorylation reaction sequence, *Biochemistry* **2**:669-675

[58] Bai, G.; Zhang, J.; Werner, R.; Nuttal, F. Q.; Tan, A. W. and Lee, E. Y. (1990) The primary structure of rat liver glycogen synthase deduced by cDNA cloning. Absence of phosphorylation sites 1a e 1b, *J. Biol. Chem.* **265**: 7843-7848.

expressa a isoforma de músculo enquanto a isoforma de fígado é expressa, exclusivamente, neste tecido. As isoformas de músculo e fígado compartilham cerca de 70% de identidade entre si [58]. As enzimas glicogênio sintases de músculo humano e de coelho [60] possuem 97% de identidade, o que sugere que a mesma isoforma em diferentes organismos é mais conservada do que diferentes isoformas do mesmo organismo. A expressão simultânea de ambas isoformas em um mesmo tecido ou célula não foi relatada até o momento.

Em microorganismos, diversos genes codificando para glicogênio sintase de diferentes bactérias foram identificados. As enzimas glicogênio sintases bacterianas apresentam pouca similaridade de seqüência com as demais glicogênio sintases e diferem pelo fato de usarem ADP-glicose como substrato [61]. Em *S. cerevisiae*, dois genes (*Gsy1* e *Gsy2*) codificam para duas proteínas glicogênio sintases, as quais possuem 50% de identidade às proteínas de mamíferos [62, 63] e são diferentemente reguladas [63]. Um gene codificando para GS em *Dictyostelium discoideum* também foi isolado e caracterizado [64], e recentemente, o cDNA codificando para o ortólogo da glicogênio sintase no fungo *N. crassa* foi isolado em nosso laboratório e alguns mecanismos de regulação deste gene foram estudados [65].

Em solução, glicogênio sintase de músculo e de fígado se comportam como tetrâmeros formados por subunidades com peso molecular ao redor de 85 kDa [66]. Um trabalho descrevendo a purificação da glicogênio sintase de *N. crassa* relata a formação de um homo-

[59] Browner, M. F.; Nakano, K.; Bang, A. G. and Fletterick, R. J. (1989) Human muscle glycogen synthase cDNA sequence: a negatively charged protein with an asymmetric charge distribution, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**: 1443-1447.

[60] Zhang, W. M.; Browner, M. F.; Fletterick, R. J.; DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (1989) Primary structure of rabbit skeletal muscle glycogen synthase deduced from cDNA clones, *FASEB J.* **3**: 2532-2536.

[61] Preiss, J. and Romeo, T. (1994) Molecular biology and regulatory aspects of glycogen biosynthesis in bacteria, *Prog. Nucleic Acid. Res.* **47**: 299-329.

[62] Farkas, I.; Hardy, T. A.; DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (1990) Isolation of the *GSY1* gene encoding glycogen synthase and evidence for the existence of a second gene, *J. Biol. Chem.* **265**: 20879-20886.

[63] Farkas, I.; Hardy, T. A.; Goebel, M. G. and Roach, P. J. (1991) Two glycogen synthase isoforms in *Saccharomyces cerevisiae* are coded by distinct genes that are differentially controlled, *J. Biol. Chem.* **266**: 15602-15607.

[64] Williamson, B. D.; Favis, R.; Brickey, D. A. and Rutherford, C. L. (1996) Isolation and characterization of glycogen synthase in *Dictyostelium discoideum*, *Dev. Genet.* **19**: 350-364.

[65] de Paula, R.; de Pinho, C. A.; Terenzi, H. F. and Bertolini, M. C. (2002) Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA, *Mol. Genet. Genomics*, **267**: 241-253.

[66] Roach, P. J. (1986) Liver Glycogen Synthase, em *The Enzymes*, 3rd edition, vol 17, Academic Press.

trímero [67]. Apesar de tais informações, pouco é conhecido sobre a estrutura terciária desta enzima uma vez que nenhuma estrutura cristalina foi determinada até o momento.

De um modo geral, todas as enzimas glicogênio sintases são relativamente bem conservadas nas regiões centrais e apresentam as maiores divergências seqüenciais nas regiões amino- e carboxi-terminais, justamente as regiões onde estão contidos os sítios de fosforilação regulatórios. Os resíduos de aminoácidos Lys³⁸ e Lys³⁰⁰ da enzima de músculo de coelho foram mostrados estar envolvidos na ligação do substrato UDP-glicose [68]. O resíduo Lys³⁸ está contido dentro do “motif” KVGG. Um “motif” semelhante (RVGG) está presente nas enzimas Gsy1p e Gsy2p de *S. cerevisiae* [62, 63] assim como na enzima GSN de *N. crassa* [65].

Estudos sobre o controle da expressão dos genes codificando para enzimas glicogênio sintase foram descritos apenas em *S. cerevisiae* [69] e *N. crassa* [65]. Nenhum estudo mostrando o controle da expressão das isoformas de mamíferos é disponível. De um modo geral, todas as proteínas glicogênio sintases de eucariotos são fortemente reguladas por reações de fosforilação reversíveis e por alosterismo através da ação do modulador glicose-6-fosfato. Esta enzima existe em duas formas: a forma **a** (desfosforilada) apresenta atividade completa na ausência ou presença de G-6-P e a forma **b** (com diferentes níveis de fosforilação) possui pouca atividade, embora esta possa ser completamente restaurada na presença de G-6-P. Os sítios regulatórios, os quais constituem alvos para as reações de fosforilação estão localizados tanto nas regiões amino- como carboxi-terminais da proteína. Tais sítios são reversivelmente modificados pela ação de diferentes proteínas quinases e fosfatases, cujos mecanismos de atuação serão discutidos adiante. A figura 4 mostra um esquema ilustrando o controle da enzima glicogênio sintase por proteínas quinases e fosfatases.

A síntese global da molécula de glicogênio se completa pela ação da enzima ramificadora do glicogênio, a qual adiciona os pontos de ramificação da molécula. Isso é feito pela quebra de segmentos da cadeia oligossacarídica e transferência para uma cadeia lateral pela formação das ligações α -1,6 [70]. A ação da enzima ramificadora não representa um papel limitante para a síntese de glicogênio, embora defeitos nesta proteína de humanos leve ao

[67] Takahara, H. and Matsuda, K. (1978) Biosynthesis of glycogen in *Neurospora crassa*. Purification of UDP-Glucose:Glycogen 4- α -Glucosyltransferase, *Biochim. Biophys. Acta* **522**: 363-374.

[68] Mahrenholz, A. M.; Wang, Y. H. and 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**, 10561-10567.

[69] Hardy, T. A.; Huang, D. and Roach, P. J. (1994) Interactions between cAMP-dependent and SNF1 protein kinases in the control of glycogen accumulation in *S. cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* **269**: 27907-27913.

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

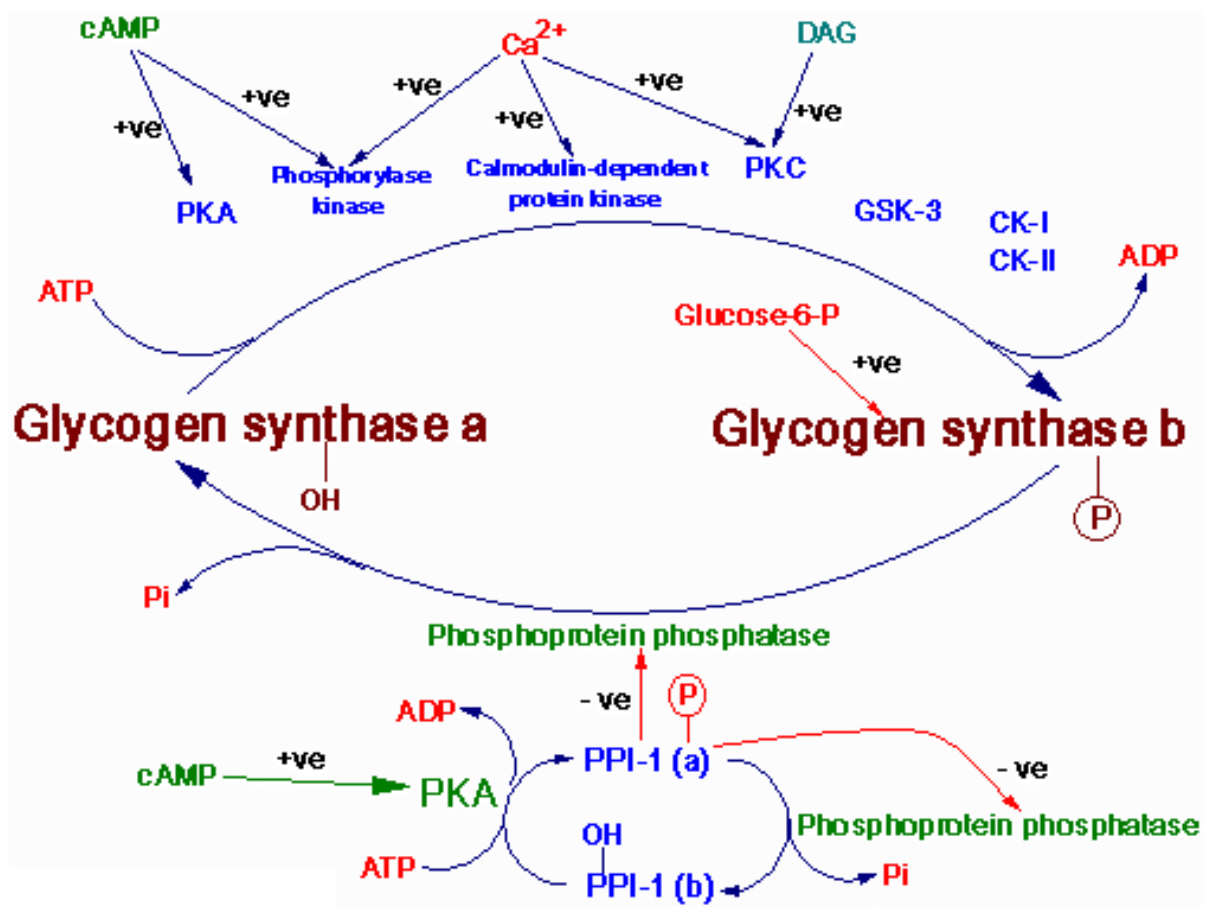


Figura 4- Controle da atividade glicogênio sintase por reações de fosforilação reversíveis e alosterismo (extraído de www.indstate.edu/thcme/mwking/glycogen.html).

aparecimento da doença de armazenamento de glicogênio do tipo IV, caracterizada pela formação anormal de moléculas de glicogênio pouco ramificadas [24].

5- Regulação da atividade glicogênio sintase

5.1- Proteínas quinases envolvidas no controle da atividade glicogênio sintase

Como visto anteriormente, a atividade glicogênio sintase pode ser reduzida por modificações covalentes, via fosforilação, pela ação de proteínas quinases. Uma vez fosforilada, esta atividade pode ser restaurada por alosterismo efetuado por glicose-6-fosfato. Sendo assim, a atividade medida na ausência e na presença deste modulador (-/+ G-6-P) serve como um índice cinético do estado de fosforilação da glicogênio sintase. Este índice varia de valores muito baixos (o que correlaciona a uma proteína altamente fosforilada) até valores ao redor de 0,9 representando formas da proteína completamente desfosforiladas. Além disso, a atividade na presença de G-6-P é diretamente proporcional à concentração da enzima.

A enzima glicogênio sintase de músculo de coelho é a enzima melhor estudada bioquimicamente, e apresenta, no mínimo, nove sítios de fosforilação regulatórios, localizados nas extremidades amino- e carboxi-terminais da molécula [71]. Os sítios são designados 1a, 1b, 2, 2a, 3a, 3b, 3c, 4 e 5 e representam uma ordem temporal de descobrimento, ao invés de uma posição relativa ao longo da proteína. Os sítios 2 e 2a correspondem aos resíduos Ser⁷ e Ser¹⁰ na região N-terminal e os sítios 3a, 3b, 3c, 4, 5, 1 e 1a ocupam as posições Ser⁶⁴⁰, Ser⁶⁴⁴, Ser⁶⁴⁸, Ser⁶⁵², Ser⁶⁵⁶, Ser⁶⁹⁷ e Ser⁷¹⁰. Os sítios 1 e 1a estão ausentes na isoforma de fígado [58]. Estudos de mutagênese sítio-dirigida na proteína recombinante de músculo de coelho, produzida em células COS, demonstraram que os sítios, 2, 2a, 3a e 3b foram os mais importantes na inativação da atividade glicogênio sintase [72]. Mutações simultâneas destes sítios foi necessária para a ativação completa da enzima.

A proteína Gsy2p, a qual representa a isoforma que explica por 80% da atividade glicogênio sintase em *S. cerevisiae* também é regulada por fosforilação reversível e três sítios regulatórios foram identificados nesta proteína [73]. Os resíduos Ser⁶⁵⁰, Ser⁶⁵⁴ e Thr⁶⁶⁷ alinham com os sítios 3a, 3b e 4, respectivamente, nas enzimas de mamíferos. Na enzima de *N. crassa*,

[71] Roach, P. J. (1990) Control of glycogen synthase by hierarchical protein phosphorylation, *FASEB J.* **4**: 2961-2968.

[72] Skurat, A. V.; Wang, Y. and Roach, P. J. (1994) Rabbit skeletal muscle glycogen synthase expressed in COS cells. Identification of regulatory phosphorylation sites, *J. Biol. Chem.* **269**: 25534-25542.

[73] Hardy, T. A. and Roach, P. J. (1993) Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation, *J. Biol. Chem.* **263**: 23799-23805.

os resíduos de aminoácidos correspondentes aos sítios 3a, 3b, 4 e 5 da enzima de músculo de coelho são conservados, embora os resíduos nas posições 4 e 5 da proteína de fungo correspondam a resíduos de treonina, ao invés de serina [65]. Assim como a enzima de *S. cerevisiae*, resíduos correspondentes aos sítios 2, 2a, 3c, 1 e 1a estão ausentes na enzima de *N. crassa*.

Diversas proteínas quinases foram implicadas na regulação da atividade glicogênio sintase a partir de estudos *in vitro* utilizando a proteína purificada [71]. A Figura 5 mostra os sítios regulatórios nas enzimas de músculo, fígado e na isoforma Gsy2p, e as possíveis proteínas quinases envolvidas na fosforilação dos sítios da isoforma de músculo. Na porção N-terminal, várias proteínas quinases podem fosforilar, *in vitro*, o sítio 2, as quais incluem a PKA [74], fosforilase quinase [75] e a proteína quinase ativada por AMP [76]. O sítio 2a é fosforilado pela ação da proteína caseína quinase I, a qual requer a fosforilação prévia do sítio 2 [77]. Portanto, o "motif" de reconhecimento para a proteína caseína quinase I corresponde a -S(P)-X-X-S-. Isto representa um exemplo de fosforilação hierárquica, onde a fosforilação prévia de um resíduo por uma determinada proteína quinase constitui um pré-requisito para a formação do "motif" de reconhecimento de outra proteína quinase. Esta característica foi confirmada por um estudo demonstrando que a mutação do sítio 2 aboliu a subsequente fosforilação do sítio 2a [72].

Os sítios 3a e 3b foram inicialmente identificados como sendo modificados pela enzima glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3) [78]. Posteriormente, foi mostrado que a ação da GSK-3 era também um exemplo de fosforilação hierárquica, onde sua ação sobre a glicogênio sintase era dependente da fosforilação prévia por caseína quinase II [79]. Desse modo, o "motif" de

[74] Huang, T. S. and Krebs, E. G. (1977) Amino acid sequence of a phosphorylation site in skeletal muscle glycogen synthetase, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **75**: 643-650.

[75] Roach, P. J.; DePaoli-Roach, A. A. and Lerner, J. (1978) Ca^{2+} -stimulated phosphorylation of muscle glycogen synthase by phosphorylase *b* kinase, *J. Cyclic. Nucleotide Res.* **4**: 254-257.

[76] Carling, D. and Hardie, D. G. (1989) The substrate and sequence specificity of the AMP-activated protein kinase. Phosphorylation of glycogen synthase e phosphorylase kinase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1012**: 81-86.

[77] Flotow, H. and Roach, P. J. (1989) Synergistic phosphorylation of rabbit muscle glycogen synthase by cyclic-AMP-dependent protein kinase and casein kinase I. Implications for hormonal regulation of glycogen synthase, *J. Biol. Chem.* **264**: 9126-9128.

[78] Picton, C.; Aitken, A.; Bilham, T. and Cohen, P. (1980) Multisite phosphorylation of glycogen synthase from rabbit skeletal muscle. Organization of the seven sites in the polypeptide chain, *Eur. J. Biochem.* **124**: 37-45.

[79] Fiol, C. J.; Mahrenholz, A. M.; Wang, Y.; Roeske, R. W. and 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.* **263**: 14042-14048.

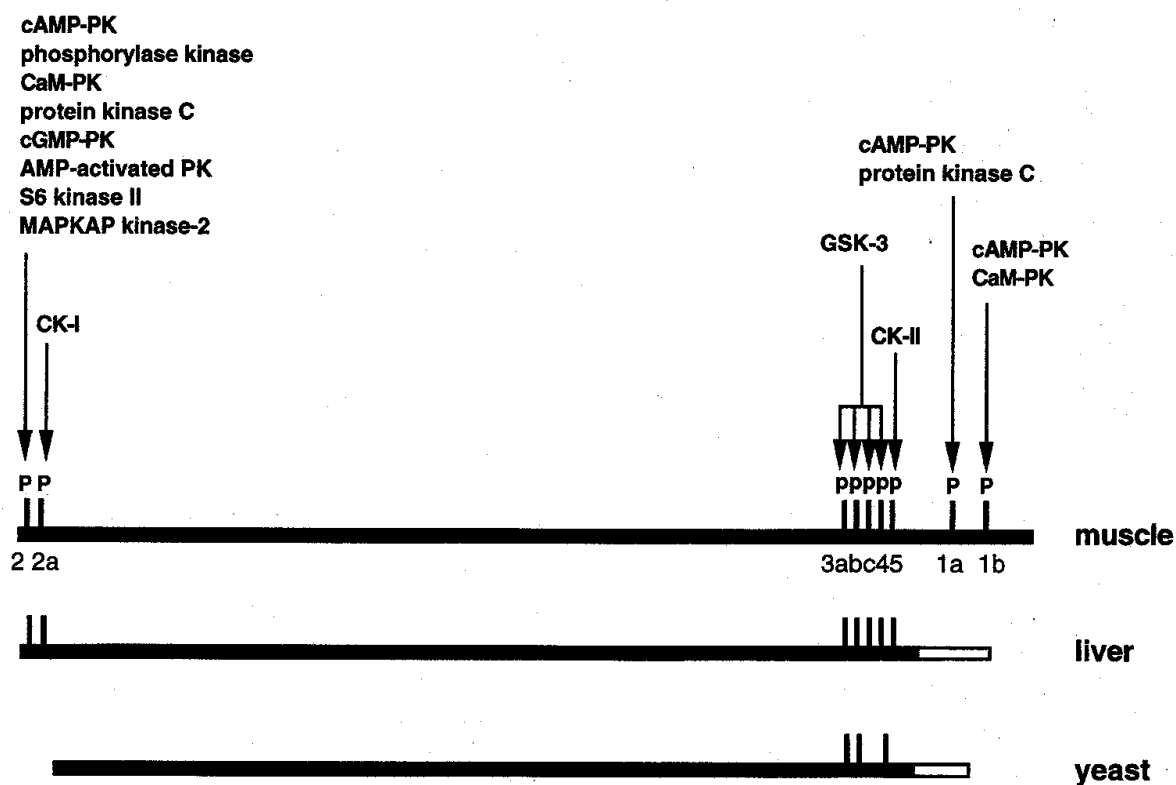


Figura 5- Fosforilação da glicogênio sintase [25]. Os nove sítios de fosforilação (P) na glicogênio sintase de músculo de coelho são mostradas juntamente com as proteínas quinases as quais fosforilam estes sítios "in vitro". **CaM-PK-** proteína quinase II dependente de calmodulina, **cAMP-PK-** proteína quinase dependente de cAMP, **cGMP-PK-** proteína quinase dependente de GMP, **CK-I-** caseína quinase I, **CK-II-** caseína quinase II, **GSK-3-** glicogênio sintase quinase-3, **MAPKAP-** proteína quinase-2 ativada por proteína quinase ativada por mitógeno.

reconhecimento para a enzima GSK-3 corresponde a -S-X-X-X-S(P)- e atua modificando sucessivamente os sítios 4, 3c, 3b, e 3a após a fosforilação prévia do sítio 5 pela caseína quinase II. Considerando que os sítios 3a e 3b possuem um significativo efeito na atividade glicogênio sintase, aparentemente a fosforilação dos demais sítios parece apenas constituir um mecanismo para a fosforilação dos sítios acima citados. Interessantemente, a mutação do sítio 5 para alanina provocou poucas alterações na atividade da proteína de músculo de coelho expressa em células COS [72]. Isto sugere que mecanismos alternativos para a fosforilação dos sítios 3a e 3b, independentes da fosforilação hierárquica efetuada pelo par GSK-3/caseína quinase II, podem também existir. Recentemente foi mostrado um mecanismo para a fosforilação do sítio 3a (Ser⁶⁴⁰) efetuado por um complexo protéico formado por dois componentes [80]. Um destes componentes constitui a proteína HAN11, uma proteína contendo um domínio WD40, de função desconhecida. Outro componente representa a proteína DYRK1A, um membro da família de proteínas tirosina quinase de especificidade dupla.

Em *S. cerevisiae*, estudos com relação às proteínas quinases envolvidas no controle do metabolismo de glicogênio foram realizados extensivamente. A via de sinalização de AMP cíclico foi implicada no controle do metabolismo de glicogênio neste microrganismo. Mutantes apresentando a via de AMP cíclico aumentada, tais como na linhagem *bcy1*, a qual não produz a subunidade regulatória da PKA, apresentam conteúdo de glicogênio reduzido e a proteína Gsy2p altamente fosforilada [81]. O efeito oposto é observado em linhagens com a via de AMP cíclico enfraquecida, como em linhagens *ras*, contendo baixa atividade adenilato ciclase [82]. Mecanismos de controle do metabolismo de glicogênio em leveduras independentes de AMP cíclico foram também descritos [83].

Estudos realizados com o objetivo de identificar proteínas glicogênio sintase quinases em levedura identificaram, através de um rastreamento genético, a proteína Pho85p a qual consiste em uma proteína quinase dependente de ciclinas (cdk) [84]. Esta quinase possui diferentes funções como resultado de suas interações com diferentes ciclinas (Pcls, "Pho85

[80] Skurat, A. V. and Dietrich A. D. (2004) Phosphorylation of Ser640 in muscle glycogen synthase by DYRK family protein kinases, *J. Biol. Chem.* **279**: 2490-2498.

[81] Cannon, J. F.; Gitan, R. and Tatchell, K. (1990) Yeast cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit mutations display a variety of phenotypes, *J. Biol. Chem.* **265**: 11897-11904.

[82] Toda, T.; Uno, I.; Ishikawa, T.; Powers, S.; Kataoka, T.; Broek, D.; Cameron, S.; Broach, J.; Matsumoto, K. and Wigler, M. (1985) In yeast, Ras proteins are controlling elements of adenylate cyclase, *Cell* **40**: 27-36.

[83] Cameron, S.; Levin, L.; Zoller, M. and Wigler, M. (1988) cAMP-independent control of sporulation, glycogen metabolism and heat shock resistance in *S. cerevisiae*, *Cell* **53**: 555-566.

[84] Huang, D.; Farkas, I. and Roach, P. J. (1996) Pho85p, a cyclin-dependent protein kinase, and the Snf1p protein kinase act antagonistically to control glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cel. Biol.* **16**: 4357-4365.

cyclins”) [85]. Inicialmente identificada como uma proteína envolvida no controle da expressão de uma fosfatase ácida [86], esta proteína foi posteriormente implicada na regulação do ciclo celular [87]. Duas ciclinas (Pcls) foram identificadas como “parceiras” da proteína Pho85p no processo de controle do acúmulo de glicogênio em levedura [88]. Tais ciclinas, denominadas Pcl8 e Pcl10 se associam à proteína Pho85p e a direcionam para o controle o metabolismo de glicogênio. O complexo Pho85p/Pcl10 fosforila diretamente a enzima Gsy2p [89] nos sítios regulatórios Ser⁶⁵⁴ e Thr⁶⁶⁷ [88]. Tem sido relatado, entretanto, um papel antagônico da proteína Pho85p no metabolismo de glicogênio de leveduras, o qual ocorre independentemente da interação com as ciclinas Pcl8 e Pcl10 [90].

Uma outra proteína quinase, importante para o processo de controle de acúmulo de glicogênio em células de levedura é Snf1p, um ortólogo da proteína quinase ativada por AMP de mamíferos. Essa proteína está envolvida no processo de repressão catabólica por glicose e mutantes neste gene apresentam baixo acúmulo de glicogênio como resultado da proteína Gsy2p apresentar-se altamente fosforilada [69]. Mais tarde, foi demonstrado que Snf1p e Pho85p possuíam papéis antagônicos no processo de autofagia em leveduras [91]. Autofagia consiste em um processo no qual as células engolfam organelas e citosol para formar autofagossomos que são enviados para o vacúolo onde ocorre a reciclagem de alguns componentes. Estes autores mostraram que defeitos neste processo levam a uma deficiência na manutenção dos níveis de glicogênio intracelular. Posteriormente, Wilson *et al.* [92]

[85] Measday, V.; Moore, L.; Retnakaran, R.; Lee, J.; Donoviel, M.; Neiman, A. M. and Andrews, B. (1997) A family of cyclin-like proteins that interact with the Pho85 cyclin-dependent kinase, *Mol. Cell. Biol.* **17**: 1212-1223.

[86] Lenburg, M. E. and O'Shea, E. K. (1996) Signaling phosphate starvation, *Trends Biochem. Sci.* **21**: 383-387.

[87] Espinoza, F. H.; Ogas, J.; Herskowitz, I. and Morgan, D. O. (1994) Cell cycle control by a complex of the cyclin *HCS26 (PCL1)* and the kinase *PHO85*, *Science* **266**: 1388-1391.

[88] Huang, D.; Moffat, J.; Wilson, W. A.; Moore, L.; Cheng, C.; Roach, P. J. and Andrews, B. (1998) Cyclin partners determine Pho85 protein kinase substrate specificity *in vitro* and *in vivo*: control of glycogen biosynthesis by Pcl8 and Pcl10, *Mol. Cell. Biol.* **18**: 3289-3299.

[89] Wilson, W. A.; Mahrenholz, A. M. and Roach, P. J. (1999) Substrate targeting of the yeast cyclin-dependent kinase Pho85p by the cyclin Pcl10p. *Mol. Cell. Biol.* **19**: 7020-7030.

[90] Wilson, W. A.; Wang, Z. and Roach, P. J. (2002) Analysis of respiratory mutants reveals new aspects of the control of glycogen accumulation by the cyclin-dependent protein kinase Pho85p. *FEBS Letters* **515**: 104-108.

[91] Wang, Z.; Wilson, W. A.; Fujino, M. A. and Roach, P. J. (2001) Antagonistic control of autophagy and glycogen accumulation by Snf1p, the yeast homolog of AMP-activated protein kinase and the cyclin-dependent kinase Pho85p. *Mol. Cell. Biol.* **21**: 5742-5752.

[92] Wilson, W. A.; Wang, Z. and Roach, P. J. (2002) Systematic identification of the genes affecting glycogen storage in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Cell. Proteomics* **1**: 232-242.

utilizaram um conjunto de linhagens contendo deleções individuais geradas pelo “*Sacharomyces cerevisiae* Genome Deletion Project” para efetuar um rastreamento sistemático de linhagens que apresentavam alterações no conteúdo de glicogênio. De um total de 4600 mutantes diplóides homozigóticos, 324 linhagens apresentaram alterações nos níveis de glicogênio. Os genes identificados foram agrupados em famílias e uma delas estava relacionada a genes envolvidos no tráfego vesicular e função vacuolar, confirmando assim o importante papel do acúmulo de glicogênio nos vacúolos.

Além do controle da atividade via fosforilação, Gsy2p também pode ser regulada por modificação alostérica exercida pelo efetor glicose-6-fosfato, da mesma forma que as isoformas de mamíferos. Além de atuar como efetor alostérico, G-6-P também controla o estado de fosforilação da proteína Gsy2p inibindo a atividade de uma proteína glicogênio sintase quinase [93], cuja natureza é desconhecida até o momento.

5.2- Proteínas fosfatases envolvidas no controle da atividade glicogênio sintase

Muitos esforços têm sido efetuados para determinar a natureza das proteínas fosfatases responsáveis pela desfosforilação da enzima glicogênio sintase. A natureza essencial das proteínas fosfatases pode ser observada através de estudos genéticos em leveduras, os quais tem mostrado que todas as proteínas fosfatases são codificadas por genes essenciais, cujas deleções são letais às células [94].

As proteínas fosfatases são classificadas em dois grande grupos (Tipo 1 e Tipo 2) com base na especificidade do substrato e sensibilidade a cátions e inibidores de proteínas. Proteínas fosfatases do Tipo 1 desfosforilam especificamente a subunidade **b** da fosforilase quinase e sua ação é inibida por concentrações nanomolares de proteínas termo e ácido-estáveis denominadas inibidor-1 e inibidor-2. As proteínas fosfatases do Tipo 2 desfosforilam a subunidade **a** da fosforilase quinase e sua ação não é modificada pelos inibidores citados. Tais proteínas podem ser categorizadas em 3 classes distintas, sendo elas: 2A, 2B e 2C. Estas proteínas são caracterizadas pelas suas dependências por cátions divalentes, as fosfatases do tipo 2B e 2C requerem Ca^{2+} e Mg^{2+} , respectivamente, e as fosfatases do tipo 2A, assim como as fosfatases do tipo 1 são ativadas na ausência de tais cátions. Estas duas últimas proteínas são,

[93] Huang, D. Q.; Wilson, W. A. and Roach, P. J. (1997) Glucose-6-P control of glycogen synthase phosphorylation in yeast. *J. Biol. Chem.* **272**: 22495-22501.

[94] Hunter, T. (1995) Protein kinases and Phosphatases: The yin and yang of the protein phosphorylation and signaling, *Cell* **80**: 225-236.

entretanto, inibidas por ácido ocadáico [95], na ordem de 1-2 nM para a fosfatase do tipo 2A e em quantidades maiores (μM) para a fosfatase do tipo 1. Atualmente, várias outras classes de proteínas fosfatases têm sido descritas.

Embora diversas proteínas fosfatases sejam potenciais candidatos no processo de desfosforilação e conseqüente ativação da glicogênio sintase, a fosfatase do tipo 1 tem sido considerada a principal proteína neste processo. Em mamíferos, a proteína PP1G desfosforila as proteínas glicogênio sintase, glicogênio fosforilase e fosforilase quinase [96].

No músculo esquelético, a maior parte da proteína fosfatase do tipo 1 está associada a partículas de glicogênio. Essa forma da PP1 associada ao glicogênio (PP1G) é formada pela subunidade catalítica da PP1 e uma subunidade regulatória denominada G ou R_{GL} [97]. Esta subunidade regulatória se liga à subunidade catalítica e resulta na atuação desta proteína fosfatase sobre a enzima glicogênio sintase. O complexo PP1G possui uma atividade oito vezes maior que a subunidade catalítica isolada frente aos substratos associados ao glicogênio. Além disso, a atividade da subunidade R_{GL} relacionada à associação com a subunidade catalítica também é controlada por fosforilação [96].

Em *S. cerevisiae*, o gene *GLC7* [98] codifica para a subunidade catalítica de uma proteína fosfatase do tipo 1, a qual foi descrita estar envolvido na regulação dos níveis de glicogênio. Destruição deste gene é letal para a célula, consistente com o fato de ser uma proteína com múltiplas funções. Entretanto, alguns alelos mutantes deste gene são viáveis e um deles foi descrito afetar o metabolismo de glicogênio (*glc7-1*) [99], uma vez que mutação pontual neste mutante prejudicou as interações entre Glc7p e a subunidade regulatória da proteína fosfatase, a qual determina a ação da fosfatase no metabolismo de glicogênio.

Usando um rastreamento por duplo-híbrido para buscar proteínas que interagem com a proteína Gsy2p, Cheng *et. al.* [100] mostraram a existência de 4 proteínas (Gac1p, Pig1p, Pig2p

[95] Cohen, P. (1989) The structure and regulation of protein phosphatases, *Ann. Rev. Biochem.* **58**: 453-507.

[96] Hubbard, M. J. and Cohen, P. (1993) On target with a new mechanism for the regulation of protein phosphorylation, *Trends Biochem. Sci.* **18**: 172-177.

[97] Tang, P. M.; Bondor, J. A.; Swiderek, K. M. and DePaoli-Roach, A. A. (1991) Molecular cloning and expression of the regulatory (R_{GL}) subunit of the glycogen-associated protein phosphatase, *J. Biol. Chem.* **266**: 15782-15789.

[98] Feng, Z.; Wilson, S. E., Peng, Z.; Schlender, K.; Reimann, E. M. and Trumbly, R. J. (1991) The yeast *GLC7* gene required for glycogen accumulation encodes a type 1 protein phosphatase, *J. Biol. Chem.* **266**: 23796-23801.

[99] Cannon, J. F.; Pringle, J. R.; Fiechter, A. and Khalil, M. (1994) Characterization of glycogen-deficient *glc* mutants of *Saccharomyces cerevisiae*, *Genetics* **136**: 485-503.

[100] Cheng, C.; Huang, D. and Roach, P. J. (1997) Yeast *PIG* genes: PIG1 encodes a putative type 1 phosphatase subunit that interacts with the yeast glycogen synthase Gsy2p, *Yeast* **13**: 1-8.

e Gip2), as quais são prováveis subunidades regulatórias da proteína fosfatase do tipo 1. Além da atividade do tipo 1, outra atividade fosfatásica, reconhecida como uma fosfatase do tipo 2A foi relatada estar envolvida na desfosforilação e conseqüente ativação da glicogênio sintase de *S. cerevisiae* [101]. Neste microrganismo dois genes, denominados *PPH1* e *PPH2*, codificam para proteínas que apresentam um alto grau de identidade aos seus ortólogos em mamíferos e respondem pela maior parte da atividade PP2A em leveduras [102, 103].

6- Glicogênio sintase quinase-3 (GSK-3). Uma proteína com múltiplas facetas.

Embora inicialmente identificada pelo seu papel na regulação do metabolismo de glicogênio através de sua ação direta fosforilando a enzima glicogênio sintase muscular, GSK-3 tem se tornado nos últimos anos alvo de intenso estudo e atualmente é considerada um componente chave em um grande número de processos celulares e doenças. Isto resultou no interessante comentário por Jope e Johnson [104] de que GSK-3 representa uma proteína a qual sofre uma "crise de identidade" pelo fato de seu nome inexoravelmente se relacionar ao metabolismo de glicogênio. Poucas enzimas exercem influências regulatórias tão amplas sobre as diversas funções celulares quanto GSK-3. Cerca de 40 proteínas constituem alvos de fosforilação por esta quinase, incluindo diversos fatores de transcrição. Os mecanismos que controlam a atividade GSK-3 assim como seu papel na regulação das proteínas alvos são bastante complexos e estão longe de serem completamente compreendidos. Uma das características mais interessantes desta enzima é o fato da mesma ser constitutivamente ativa em células não estimuladas, sendo inativada em função de sinais externos. As isoformas de mamíferos (GSK-3 α e GSK-3 β) apresentam atividade reduzida quando fosforiladas na porção N-terminal, a qual pode ser efetuada por várias outras proteínas quinases tais como PKA, Akt (PKB), PKC, entre outras. Em oposição à inibição negativa por fosforilação N-terminal, a atividade GSK-3 é amplamente estimulada por fosforilação na região C-terminal, a qual ocorre

[101] Peng, Z. Y.; Wang, W.; Wilson, S. E.; Schlender, K. K.; Trumbly, R. J. and Reimann, E. M. (1991) Identification of a glycogen synthase phosphatase from yeast *Saccharomyces cerevisiae* as protein phosphatase 2A. *J. Biol. Chem.* **266**: 10925-10932.

[102] Ronne, H.; Carlberg, M.; Hu, G. Z. and Nehlin, J. O. (1991) Protein phosphatase 2A in *Saccharomyces cerevisiae*: effects on cell growth and bud morphogenesis, *Mol. Cel. Biol.* **11**: 4876-4884.

[103] Sneddon, A. A.; Cohen, P. T. W. and Stark, M. J. R. (1990) *Saccharomyces cerevisiae* protein phosphatase 2A performs an essential cellular function and is encoded by two genes. *EMBO J.* **9**: 4338-4346.

[104] Jope, R. S. and Johnson, G. V. M. (2004) The glamour and gloom of glycogen synthase kinase-3. *Trends in Biochemical Sciences.* **29**: 95-102.

muito provavelmente por autofosforilação [105]. A atividade GSK-3 também é regulada através da localização sub-celular desta enzima, a qual facilita seu acesso aos seus substratos ou a mantém distante de alvos, os quais não devem ser fosforilados em determinado período. GSK-3 é tradicionalmente citosólica, embora possa ser localizada no núcleo e em mitocôndrias, onde sua atividade é significativamente aumentada [106]. Finalmente, um terceiro mecanismo de controle da atividade GSK-3 ocorre através da formação de complexos multiméricos composto de proteínas, as quais se associam à GSK-3 e a impedem de fosforilar proteínas alvos. Um dos mais conhecidos mecanismos de controle de GSK-3 através da associação de proteínas é a via de sinalização Wnt [107], a qual tem sido implicada em doenças tais como câncer.

Dentre os inúmeros processos celulares os quais envolvem a atuação da enzima GSK-3 pode-se destacar arquitetura e motilidade celular, metabolismo, diferenciação e sobrevivência celular. Além disso, recentes trabalhos associaram a ação desta enzima a diferentes doenças em humanos tais como hipertrofia muscular [108], câncer, desordem bipolar [109], esquizofrenia e Mal de Alzheimer [110].

Embora considerações detalhadas possam ser feitas sobre a ação da enzima GSK-3 nos diversos processos celulares, isso fugiria ao escopo do presente trabalho. De qualquer modo, isso indica que o estudo das características envolvendo esta quinase pode trazer importantes informações sobre a bioquímica e fisiologia celular.

[105] Frame, S. and Cohen, P. (2001) GSK3 takes centre stage more than 20 years after its discovery. *Biochem. J.* **359**: 1-16.

[106] Bijur, G. N. and Jope, R. S. (2003) Glycogen synthase kinase-3 β is highly activated in nuclei and mitochondria. *Neuro. Report* **14**: 2415-2419.

[107] Manoukian, A. S. and Woodgett, J. R. (2002) Role of glycogen synthase kinase-3 in cancer: regulation of Wnts and other signaling pathways. *Adv. Cancer Res.* **84**: 203-229.

[108] Hardt, S. E. and Sadoshima, J. (2002) Glycogen synthase kinase-3 β : a novel regulator of cardiac hypertrophy and development. *Circ. Res.* **90**: 1055-1063.

[109] Klein, P. S. and Melton, D. A. (1996) A molecular mechanism for the effect of lithium on development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 8455-8459.

[110] Grimes, C. A. and Jope, R. S. (2001) The multifaceted roles of glycogen synthase kinase-3 β in cellular signaling. *Prog. Neurobiol.* **65**, 391-426.

OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho foi a caracterização molecular, bioquímica e funcional de enzimas envolvidas na síntese do polímero de glicogênio no fungo filamentoso *Neurospora crassa*. Baseado neste contexto, os objetivos específicos foram agrupados em três grupos de estudos:

1- Estudos relacionados à proteína glicogênio sintase. Inativação gênica, caracterização parcial do mecanismo de fosforilação e avaliação preliminar sobre papel da via de sinalização mediada por AMP cíclico na expressão da glicogênio sintase.

2- Estudos relacionados à proteína glicogênio sintase quinase-3. Caracterização molecular e funcional da enzima e seu envolvimento no metabolismo de glicogênio em *N. crassa*.

3- Estudos relacionados à proteína glicogenina. Clonagem molecular, caracterização da expressão gênica, análises funcionais e caracterização da interação com a enzima glicogênio sintase.

Como resultado dos objetivos expostos acima, a apresentação deste trabalho foi dividida em três partes, as quais serão apresentadas de maneira independente. Os resultados relacionados às partes 1 e 2 serão apresentados conjuntamente e os resultados relacionados à parte 3 serão apresentados, separadamente, na forma de dois manuscritos a serem submetidos à publicação.

MATERIAIS E MÉTODOS

1- Linhagens

Neurospora crassa

- FGSC #424 A**, Selvagem (“Wild type” ou WT)
- FGSC #2226 a**, Selvagem (linhagem Mauriceville)
- FGSC #488 a**, Mutante *cr-1* (*crisp*). Deficiente na atividade adenilato ciclase.
- FGSC #7094 a**, Mutante termosensível *mcb*. Deficiente na subunidade regulatória da proteína quinase dependente de AMP cíclico.
- FGSC #3957**, Mutante (*A, aro-9, qa-2*). Deficiente na via biossintética de chiquimato. Incapaz de produzir amino ácidos aromáticos.
- Bat 9-5a** (*a, nic⁻, cot-1*), Mutante colonial-temperatura dependente, auxotrófica para ácido nicotínico.

Escherichia coli

- XL1-Blue**, *recA1- endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [F'proAB *lacI^q*ΔM15 Tn10(Tet^r)] (Stratagene).
- BNN132**, JM107 (λKC) lysogen [111].
- DH5α**, *supE44 Δ lacU169 (φ 80 lacZΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

2- Meios de cultura

E. coli

LB-Luria Broth

- 1% NaCl
- 1% Bacto-triptona
- 0,5% extrato de levedura

2YT + 0,2% Glicose

- 1,6% Bacto-triptona
- 1,0% extrato de levedura
- 0,5% NaCl
- 0,2% glicose

[111] Brunelli, J. P. and Pall, M. L. (1993) A series of Yeast/*Escherichia coli* λ expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and *cre/lox* mediated plasmid excision, *Yeast* **9**: 1309-1318.

Neurospora crassa

O meio de cultivo utilizado para crescimento e manutenção das cepas foi o meio mínimo de Vogel. Esse meio foi preparado contendo sacarose, sais de Vogel e biotina. A solução de sais de Vogel foi preparada 50X concentrada, a partir da dissolução dos seguintes sais, na ordem indicada, em 700 mL de água destilada:

- 150 g de citrato de sódio.H₂O
- 250 g de KH₂PO₄
- 100 g de NH₄NO₃
- 10 g de MgSO₄.7H₂O
- 5 g de CaCl₂.2H₂O (pré-dissolvido em água destilada)
- 5 mL de solução de biotina (50 mg em 100 mL de etanol 50%)
- 5 mL de solução de elementos traços

O volume foi, então, ajustado para 1 L com água destilada e 300µL de clorofórmio foi adicionado como agente conservante. A solução estoque de sais de Vogel foi armazenada a 4 °C.

A solução de elementos traços foi feita pela dissolução dos seguintes compostos em 90 mL de água:

- 5 g de MgSO₄.7H₂O
- 5 g de ácido cítrico.H₂O
- 5 g de ZnSO₄.7H₂O
- 1 g de Fe(NH₄)₂(SO₄)₂.6H₂O
- 0,25 g de CuSO₄.5H₂O
- 0,05 g de MnSO₄.H₂O
- 0,05 g de H₃BO₃
- 0,05 g de NaMoO₄.2H₂O

O meio mínimo de Vogel foi preparado a partir de 2% de sacarose, sais de Vogel 1X, algumas gotas de biotina (preparada em 50% etanol) e 2% de ágar para culturas em meio sólido. Para o preparo do meio de Vogel "N-free", NH₄NO₃ foi omitido da preparação de sais de Vogel 50X.

3- Condições de cultivo

Culturas de *N. crassa* em meio sólido foram cultivadas em garrafas contendo 50 mL de meio de Vogel mínimo suplementado com 2% de ágar. As culturas foram incubadas por três dias a 30°C no escuro e adicionalmente por 5-7 dias, à temperatura ambiente, na presença de luz, para estimular a conidiação. Para o cultivo em meio líquido, uma suspensão conidial a partir

das culturas em meio sólido foi feita, através da adição de 15-20 mL de água estéril às garrafas, seguida por agitação vigorosa. A suspensão foi, então, filtrada em gaze estéril para a retenção de pedaços de hifas. As células foram contadas em câmara de Neubauer e inoculadas em culturas líquidas na densidade de 1×10^7 células/mL. As culturas foram incubadas a 30°C, com agitação constante de 250 rpm. Nos tempos apropriados, alíquotas (10mL) foram retiradas, filtradas a vácuo, imediatamente congeladas em nitrogênio líquido e armazenadas a -80°C para posterior processamento.

4- Bibliotecas de cDNA utilizadas

A biblioteca de cDNA λ AD5-NC de *N. crassa* foi utilizada neste trabalho, a qual foi adquirida junto ao FGSC (“Fungal Genetics Stock Center”) e gentilmente doada pelo Prof. Dr. Hector F. Terenzi (FFCL-USP, Ribeirão Preto). A biblioteca foi construída em vetor do fago λ , o qual permite a excisão da biblioteca na forma de plasmídeo, através do sistema de excisão *cre/lox*. O vetor contém a origem de replicação 2μ de levedura, uma origem de replicação de *E. coli* (plasmídeo “shuttle”), a marca de resistência à ampicilina e uma região de clonagem múltipla semelhante àquela existente no sistema λ ZAP KS/SK (Stratagene). Além disso, possui *TRP1* como marca de seleção em leveduras e o promotor *ADH2*. Os insertos de cDNA foram inseridos nos sítios *EcoRI* e *XhoI* da região de clonagem múltipla.

A biblioteca plasmidial pYADE5, resultante da excisão, também foi utilizada. Esta biblioteca foi produzida através da infecção da linhagem de *E. coli* BNN132 (λ KC), (gentilmente cedida pelo Dr. Johan M. Thevelein, “Laboratorium voor Moleculaire Celbiologie, Katholieke Universiteit te Leuven, Leuven-Heverlee”, Bélgica) e plaqueamento em meio seletivo. Os sítios *lox* existentes nos vetores λ são sítios de recombinação catalisados pela proteína *cre*.

5- Extração de DNA genômico do fungo *Neurospora crassa*

O DNA genômico de *N. crassa* foi preparado segundo método de Weiland [112]. Brevemente, micélios do fungo (aproximadamente 100 mg) foram macerados em um gral de porcelana juntamente com nitrogênio líquido, transferidos para tubos eppendorf de 1,5 mL contendo 700 μ L de tampão de extração (Tris-HCl 200 mM, pH 8,5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA e 0,5% SDS) e 700 μ L de fenol saturado em tampão TE, pH 7,6. As amostras foram, então agitadas em “vortex” por 5 minutos. Os tubos foram centrifugados por 15 min a 14.000 rpm; a fase aquosa foi transferida para um outro tubo e igual volume de clorofórmio foi

[112] Weiland, J. J. (1997) Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. *Fungal Genet. Newsl.* **44**: 60-63.

adicionado. A mistura foi centrifugada por 5 min e a fase aquosa foi precipitada com 0,54 vol. de isopropanol. O precipitado de ácidos nucleicos foi ressuspenso em 100 µL de RNase A (preparada em tampão TE, pH 7,6) e incubado a 37°C por 30 min, ao final dos quais as amostras foram desproteinizadas pela adição de igual volume de fenol saturado. A fase aquosa, após centrifugação, foi precipitada com 50 µL de NH₄Ac 7,5M e 500 µL de etanol 95% gelado. O DNA genômico foi recolhido por centrifugação, lavado duas vezes com etanol 70% e dissolvido em 100 µL de tampão TE. A concentração da solução foi determinada por absorvância a 260 nm e a pureza foi analisada através da relação de absorvância 260/280 nm em um espectrofotômetro Beckman, modelo DU 640.

6- Clonagem molecular do cDNA da glicogênio sintase quinase-3 de *N. crassa*

6.1- Amplificação de fragmentos do cDNA através de PCR

A estratégia utilizada para o isolamento do cDNA de GSK-3 (*Ncgsk*) em *N. crassa* se baseou na amplificação de fragmentos, por PCR, utilizando oligonucleotídeos degenerados. Cinco oligonucleotídeos foram desenhados com base em um alinhamento de seqüências de aminoácidos entre proteínas GSKs de humano (isoformas α e β), *D. melanogaster*, *S. cerevisiae* e *Arabidopsis thaliana*. As seqüências dos oligonucleotídeos estão relacionadas a seguir:

NcGSK-1F: 5'-AAGAAGGTBCTBCARGAYAAG-3'

NcGSK-2F: 5'- GAYATYAAGCCBCARAAC-3'

NcGSK-1R: 5'- TCVGGVGCRCGGTAGTA-3'

NcGSK-2R: 5'- GTAGTTVGGGTTTCAT-3'

NcGSK-3R: 5'- CTTRATYTGVGGRAACTT-3'

Onde: R=A ou G, Y=C ou T, B=C, G ou T, V=A, C ou G

Os oligonucleotídeos foram desenhados considerando a freqüência dos códons em *N. crassa* [113]. Combinações destes primers foram usadas em reações de PCR utilizando como molde a biblioteca de cDNA plasmidial YpADE5-Nc. A temperatura de anelamento utilizada foi de 50°C. Os fragmentos obtidos foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X. Os fragmentos apresentando tamanhos esperados foram subclonados no vetor pMOS-Blue ("Blunt Ended PCR cloning kit", GE Healthcare) e sequenciados em um

[113] Wadda, K.N.; Wadda, Y.; Doi, H. Ishibashi, F.; Gojorobi, T. and Ikemura, T. (1981) *Nucleic Acids Research* 19: supplement.

aparelho ABI 377 DNA Sequencer (Perkin Elmer), utilizando-se o kit Dye Terminator (Perkin Elmer).

6.2- Rastreamento da biblioteca λ AD5-NC

Os experimentos de rastreamento foram realizados segundo protocolo de Sambrook *et al.* [114].

6.2.1- Infecção da bactéria hospedeira

Uma alça de células da linhagem bacteriana *E. coli* XL1-Blue foi inoculada em meio LB+maltose 0,2%, contendo tetraciclina (12,5 mg/mL) e crescidas até uma A_{600nm} de 1. Posteriormente estas células foram colhidas por centrifugação, lavadas em $MgSO_4$ 10 mM, novamente centrifugadas e dissolvidas em $MgSO_4$ 10 mM até A_{600nm} de 0,6. Um μ L da biblioteca λ AD5 foi diluído até uma concentração de 10^{-5} em tampão SM e 200 μ L de células bacterianas foram adicionados. A solução foi incubada a 37°C por 30 minutos sem agitação. Ao final desse período, adicionou-se 3 mL de "top" agarose 0,8% em meio LB mantido a 48°C. A mistura foi homogeneizada e espalhada na superfície de placas contendo LB ágar. As placas foram incubadas a 37°C por 12 h.

6.2.2- Réplica das placas de lise

Após o período de incubação, as placas foram colocadas no refrigerador por duas horas e, após este período, as réplicas das placas de lise foram feitas em membranas de Nylon neutras (Hybond N, Amershan), colocando as membranas em contato com a superfície das placas por 1 minuto. Posteriormente as membranas foram tratadas com as seguintes soluções:

Solução de desnaturação (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) – 5 min

Solução de neutralização (1,5 M NaCl, 0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 1 mM EDTA – 5 min

20x SSC (3 M NaCl, 0,3 M citrato de trissódio) – 5 min

As membranas foram secas ao ar por 30 min e, então, tratadas por exposição à luz ultravioleta em um "crosslynker" (Ultraviolet Crosslynker UVP, modelo CL-1000) para fixação do DNA à membrana.

6.2.3- Hibridização do cDNA à sonda radioativa

As membranas foram pré-hibridizadas durante 1 h a 42 °C em tubos de hibridização contendo 10 mL da seguinte solução:

[114] Sambrook, J. and Russell, D. W. In: Molecular cloning. A laboratory manual, 3rd edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- 50% de formamida
- 5x solução de SSC
- 0,5% de leite em pó desnatado
- 1% de Sarkosyl
- 100 µg/mL de DNA esperma de salmão desnaturado

Ao final da pré-hibridização, 100 ng do fragmento amplificado por PCR (item 5.1) marcado radioativamente foi adicionado à solução. A marcação do fragmento foi feita com o kit "NE random priming" (New England Biolabs) e purificada em colunas de Sephadex G-50 para a retirada dos nucleotídeos não incorporados. A hibridização ocorreu a 42°C, com leve agitação, durante uma noite em um forno de hibridização Hybaid. Posteriormente, as membranas foram lavadas em:

- 2x SSC - 30 min, temperatura ambiente
- 0,2x SSC; 0,1% SDS – 30 min, temperatura ambiente
- 0,2x SSC; 0,1% SDS – 30 min, 65°C

Após as lavagens, as membranas foram expostas ao filme radiográfico (Kodak T-Mat G/RA).

Devido à alta densidade de placas de lise, um segundo rastreamento foi realizado, através da remoção das placas da região dos sinais positivos, com o auxílio de um palito de dente estéril, e transferência para tubos contendo 1 mL de tampão SM e uma gota de clorofórmio. Essa mistura foi incubada por 1 h, à temperatura ambiente, e utilizada para infectar células da linhagem bacteriana de *E. coli* XL1-Blue nas diluições de 10^{-2} a 10^{-4} , para todos os clones positivos, segundo o mesmo protocolo citado anteriormente.

6.2.4- Análise dos clones positivos

Após dois ciclos de rastreamento, os clones positivos foram obtidos como placas de lise isoladas. Todas as placas positivas foram transferidas para tubos contendo 1 mL de tampão SM e uma gota de clorofórmio com auxílio de palitos de dentes estéreis. Após a eluição das partículas virais da "top" agarose, alíquotas de 1 µL da solução foram usadas na infecção da linhagem bacteriana *E. coli* BNN132, para a recuperação dos clones positivos na forma plasmidial. Colônias obtidas da excisão plasmidial foram inoculadas em meio LB+ampicilina (100 µg/mL) e crescidas durante a noite. O DNA plasmidial destas culturas foi extraído e analisados por digestão com as enzimas de restrição *Bam*HI e *Kpn*l. O produto da digestão foi analisado por eletroforese em gel de agarose 0,8% em Tampão TAE.

7- Inativação gênica mediada por RIP ("Repeat Induced Point Mutation")

A estratégia para a inativação dos genes estudados neste trabalho foi baseada no processo de introdução de mutações ao longo das seqüências duplicadas, mediadas pelo processo de RIP em *N. crassa*, e será descrita detalhadamente a seguir.

7.1- Preparação do vetor para transformação de *N. crassa*

O vetor utilizado em nossos experimentos de RIP foi o pMSN1, o qual foi adquirido junto ao FGSC ("Fungal Genetics Stock Center"). Este plasmídeo é derivado do pGEM-3Zf, onde o gene *qa-2* (quinato-2) foi inserido. O gene *qa-2* de *N. crassa* codifica para a enzima desidroquinase catabólica. Linhagens de *N. crassa* carecendo dessa enzima são incapazes de usar quinato ou chiquimato como única fonte de carbono na presença do gene *aro-9*. Por sua vez, linhagens deficientes no gene *aro-9* requerem uma mistura de três aminoácidos aromáticos e de ácido p-aminobenzóico para o crescimento. Dessa forma, uma linhagem *aro-9, qa-2* é incapaz de crescer em meio mínimo. Portanto, o vetor pMSN1 pode ser usado em processos de transformação de linhagens de *N. crassa aro-9, qa-2*.

A estratégia de inativação gênica para todos os genes descritos neste trabalho foi semelhante. As cópias genômicas dos genes *gsn*, *gnn* e *Ncgsk* foram amplificadas por PCR a partir do DNA genômico, subclonadas no vetor pMOS-Blue e as seqüências confirmadas através de sequenciamento de DNA. Os cassetes de DNA correspondendo às seqüências gênicas foram então, subclonadas no vetor pMSN-1. Clones positivos foram selecionados após transformação de células de *E. coli* DH10B competentes e plaqueamento em meio de cultura LB seletivo contendo 100 µg/mL de ampicilina. Colônias individuais foram inoculadas em meio de cultura líquida e submetidas à mini-extração de DNA plasmidial através do kit Mini-Prep (Qiagen). Clones positivos foram detectados por digestão enzimática com enzimas de restrição adequadas seguido por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X.

7.2- Transformação de DNA exógeno em *N. crassa*.

A inserção das construções plasmidiais em *N. crassa* foi realizada através da eletroporação de conídios. Conídios da linhagem de *N. crassa* FGSC#3957, coletados a partir de cultura em meio sólido de 10 dias foram filtrados em gaze estéril e coletados em tubos Falcon de 50mL estéreis. As células foram coletadas por centrifugação a 4.000 rpm, 4°C, 5 min. Posteriormente, as células foram lavadas, duas vezes, com 30 mL de água gelada estéril e adicionalmente duas vezes com 30 mL de sorbitol 1 M estéril. Finalmente, as células foram ressuspensas em 1 mL de sorbitol 1 M e contadas em câmara de Neubauer. A densidade de células foi ajustada a 1×10^9 células/mL. Uma mistura contendo 1 mg de DNA plasmidial e 100 µL de células foi transferido para cubetas de eletroporação estéreis e eletroporadas em um

eletroporador Gene Pulser II (BioRad). As condições de transformação foram as seguintes: 2000 Volts, 25 μ Faradays, 300 Ω . Imediatamente após o pulso elétrico, 1 mL de sorbitol 1 M foi adicionado. A suspensão de células eletroporadas foi misturada a 10 mL de "top ágar" (1 M sorbitol, 1x Sais de Vogel, 0,05% glicose, 0,05% frutose, 2% sorbose, 1% ágar) mantido a 48°C e despejados sobre a superfície de placas contendo meio mínimo de Vogel suplementado com 2% de sacarose e 2% de sorbose para induzir o crescimento colonial. As placas foram incubadas a 30°C por dois dias, e após esse período colônias isoladas foram transferidas para tubos de ensaio contendo 1 mL de meio mínimo de Vogel + 2% sacarose. As culturas foram crescidas por 7 dias e usadas para inocular culturas líquidas. Micélios obtidos das culturas líquidas foram usados para preparação de DNA genômico segundo descrito no item 5.

7.3- Análise do DNA genômico por "Southern blot"

7.3.1- Digestão das amostras e eletroforese

DNA genômico dos diferentes (10 μ g) foi digerido com enzimas de restrição adequadas por 12 h a 37°C. Posteriormente, as amostras digeridas foram submetidas à eletroforese em gel de agarose 0,8% em uma voltagem de 23V durante 14 h.

7.3.2- Tratamento do gel e transferência para membrana

Após eletroforese os fragmentos de DNA foram transferidos por capilaridade para membrana de Nylon carregada positivamente (Hybond N+, GE Healthcare), utilizando solução de NaOH 0,4 N. A membrana foi, então, exposta a luz ultravioleta por 1 min e 30 seg em um "crosslynker" (Ultraviolet Crosslynker UVP, modelo CL-1000).

7.3.3- Condições de hibridização e detecção.

Inicialmente, as membranas foram bloqueadas através de pré-hibridização com 5 mL da solução Ultra-Hyb (Ambion), em tubos, em um forno de hibridização Hybaid por 2 h a 42°C. Após esse período, as sondas (100 ng de DNA), marcadas radiativamente e purificadas foram adicionadas após terem sido desnaturadas a 100°C por 5 min. A hibridização continuou por 12 h e ao final do período as membranas foram lavadas da seguinte forma:

- 2 x SSC – 15 min, temperatura ambiente
- 0,5x SSC; 0,1% SDS – 15 min, temperatura ambiente
- 0,1x SSC; 0,1% SDS – 15 min, temperatura ambiente
- 0,1x SSC; 0,1% SDS – 30 min, 50°C

Ao final das lavagens as membranas foram expostas ao filme radiográfico (Kodak T-Mat G/RA).

7.4- Cruzamento das linhagens de *N. crassa*.

Os cruzamentos foram realizados de acordo com o procedimento descrito por Davis e De Serres [115]. Inicialmente as linhagens receptoras (Bat 9-5a ou FGSC #2226) foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 5mL de meio de cruzamento sintético de Westergaard [116]. As linhagens foram incubadas à temperatura ambiente no escuro por 5 dias. Após esse período, uma suspensão de conídios da linhagem contendo dupla cópia do gene (uma endógena e outra inserida por transformação) foi gentilmente inoculada sobre a linhagem receptora e os tubos foram incubados na posição horizontal por 15 dias à temperatura ambiente. Após este período observou-se a liberação dos ascósporos nas paredes do tubo de cruzamento. Os ascósporos foram recolhidos com água estéril, centrifugados a 1.000 x *g* por 2 min, lavados duas vezes com água e ressuspensos em uma solução de hipoclorito de sódio 1% por 15 min para inativação de conídios e hifas. Os ascósporos foram então lavados três vezes em água estéril, ressuspensos em uma solução 0,1% ágar e ativados através de choque térmico a 60°C por 45 min. Posteriormente, as células foram contadas e plaqueadas em meio VM contendo 2% de sacarose e 2% de sorbose numa densidade de aproximadamente 500 células/placa.

7.5- Seleção das linhagens mutantes.

Clones resultantes dos cruzamentos foram selecionados entre a progênie e transferidos para tubos contendo 1mL de meio VM sólido. Para a seleção dos mutantes *gsn^{rip}* e *gnn^{rip}*, o cruzamento foi entre a linhagem contendo a dupla cópia e a linhagem Bat 9-5a (colonial a temperatura restritiva), e os tubos contendo VM com sacarose foram incubados a 37°C para o isolamento dos clones coloniais à temperatura restritiva. Clones apresentando morfologia colonial foram selecionados e incubados à temperatura não restritiva (30°C) para permitir o crescimento micelial e conidiação. Suspensões conidiais, em água estéril, de cada clone foram aplicadas na superfície de placas contendo meio VM com sacarose e crescidas a 37°C. A determinação do fenótipo deficiente no acúmulo de glicogênio foi feita através da exposição das placas ao vapor de iodo por dois minutos.

A seleção do mutante *Ncgsk^{rip}*, resultante do cruzamento da linhagem contendo dupla cópia deste gene com a linhagem FGSC#2226, foi realizada através da observação visual da

[115] Davis, R. H. and De Serres, F. J. (1970) Genetic and microbiological research technique for *Neurospora crassa*. Methods in Enzymology. Academic Press, New York, 17:79-148.

[116] Westergaard, M. and Mitchell, K. (1947) *Neurospora* V.A. synthetic medium favoring sexual reproducing. *Am. J. Bot.* 24: 573-577.

morfologia dos clones crescidos em meio VM com sacarose. Clones demonstrando alterações morfológicas foram selecionados para caracterizações adicionais.

Em alguns casos as mutações foram também detectadas através de análise por "Southern Blot" do DNA genômico obtido da progênie, o qual foi digerido com a enzima de restrição *Mbol*, uma enzima sensível à metilação e, portanto, não cliva em sítios metilados. Alteração nos perfis de restrição foram indicativos do processo de RIP. Finalmente, DNA genômico dos clones apresentando deficiência no acúmulo de glicogênio (*gsn^{rip}* e *gnn^{rip}*) ou alterações morfológicas (*gsk^{rip}*) foram usados como molde para a amplificação das sequências genômicas de cada gene. As mutações pontuais foram então detectadas por sequenciamento de DNA, após subclonagem dos fragmentos amplificados no vetor pMOS-Blue.

8- Reversão fenotípica do mutante RP-1 (*gsn^{rip}*)

A reversão do fenótipo deficiente em glicogênio na linhagem RP-1 (*gsn^{rip}*) foi feita através da inserção dos plasmídeos pBARGPE1-*gsn* (contém a ORF amplificada a partir do cDNA, sob o controle do promotor *gpd1*) e pBARGEM7-2-*gsn* [117], por eletroporação. O plasmídeo pBARGEM7-2-*gsn* contém a cópia genômica do gene *gsn*, mais as regiões flanqueadoras 5' e 3' e o gene *BAR*, o qual confere resistência à droga glufosinato de amônio, um potente inibidor da enzima glutamina sintetase, em meio carecendo de qualquer fonte de nitrogênio (Vogel "N-free"). Conídios da linhagem RP-1 (*gsn^{rip}*), a partir de uma cultura de 10 dias em meio VM foram eletroporados com 1 µg do plasmídeo pBARGEM7-2-*gsn* e as células foram misturadas a 10 mL de "top ágar" (Vogel mínimo "N-free", contendo sorbitol 1 M, 0,05% glicose, 0,05% frutose e 0,8% ágar) e imediatamente espalhadas na superfície de placas contendo meio de Vogel "N-free" contendo 250 µg/mL glufosinato de amônio (nome comercial BASTA, gentilmente cedido pela Bayer Cropscience do Brasil) e 2% de sorbose. Transformantes individuais foram transferidos para tubo de cultura contendo o mesmo meio de cultura sem sorbose e crescidos por 7 dias. Análise da reversão fenotípica foi efetuada pela exposição das colônias ao vapor de iodo, como descrito anteriormente.

9- Dosagem do conteúdo de glicogênio e atividade glicogênio sintase

9.1- Preparo dos extratos celulares para as dosagens de glicogênio e atividade GS

[117] Freitas, F. Z. and Bertolini, M. C. (2004) Genomic organization of the *Neurospora crassa gsn* gene and transcription modulation by the STRE and HSE elements. *Mol. Genet. Genomics* (submetido).

Extrato protéico bruto de *N. crassa* foi preparado a partir de 200 mg de células. As células foram maceradas com nitrogênio líquido em gral de porcelana até a obtenção de um pó fino e transferido para tubo eppendorf contendo 1 mL de tampão de lise (Tris-HCl, 50 mM, pH 8,0, 50 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 2 mM TLCK, 1 µg/mL aprotinina e pepstatina). A suspensão celular foi agitada em "vortex" e centrifugada a 10.000 x g por 10 min a 4°C. A solução protéica foi recolhida em novo tubo e quantificada através do método de Bradford utilizando o kit Bradford Reagent (BioRad).

9.2- Dosagem de glicogênio

O conteúdo de glicogênio foi determinado através do método descrito por Hardy e Roach [73]. Brevemente, 100 µL de extrato protéico foi precipitado com ácido tricloroacético numa concentração final de 20%. O sobrenadante foi recolhido, após centrifugação, a 7.000 x g por 10 min e precipitado com 400 µL de etanol 95% gelado. O precipitado de glicogênio foi recolhido, por centrifugação, a 20.000 x g, lavado duas vezes com etanol 66%, seco ao ar e, posteriormente, ressuspenso em 400 µL de tampão acetato de sódio, 50 mM, pH 5,2, contendo 5mM CaCl₂. Amiloglicosidase (30 mg/mL) (20 µL) foi adicionado e a mistura foi incubada a 37°C por 12 h. A glicose liberada foi detectada através através do método enzimático da glicose oxidase usando o kit Glicose Trinder (Sigma).

9.3- Dosagem da atividade glicogênio sintase (GS)

A atividade GS foi dosada através do método de Thomas [118], com modificações. A atividade glicogênio sintase é medida pela incorporação de unidades glicosil a partir da UDP-[U-¹⁴C]-glicose a moléculas de glicogênio. O ensaio é realizado na ausência e presença de 7,2 mM de glicose-6-fosfato (G6P), o qual constitui o ativador alostérico da enzima glicogênio sintase.

Uma alíquota de 15 µL de extrato bruto total foi incubado com 30 µL da mistura de reação (4,44 mM UDPG, 0,67% glicogênio, 50 mM Tris-HCl, pH 7,8, 2 mM EDTA, 25 mM NaF, 1 µL ¹⁴C-UDPG (265 mCi/mmol), concentração final). Quando presente, G6P foi adicionada na concentração final de 7,2 mM por reação. A mistura foi incubada a 30°C por 30 min, ao final dos quais uma alíquota de 35 µL foi depositada em pedaços de papel (1,5 x 1,5 cm) Whatman P81, e imediatamente mergulhados em solução de etanol 66% gelado, sob agitação. Três lavagens sucessivas em etanol 66% foram realizadas para a remoção de UDP-[U-¹⁴C]-glicose livre e os

[118] Thomas, J. A.; Shlender, K. K. and Lerner, J. (1968). A rapid filter paper assay for UDP-glucose-glycogen glycosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glycose. *Anal. Biochem.* **25**; 486-499.

papéis foram secos à temperatura ambiente. Após secagem, a radioatividade incorporada ao glicogênio foi medida por cintilação líquida em um cintilador Beckman LS6500.

10- Análises do mutante *gsk^{rip}*

10.1- Determinação da taxa de crescimento

A taxa de crescimento do mutante *gsk^{rip}* foi determinada através do crescimento em "race tubes", os quais constituem de tubos vidro (30 cm de comprimento x 2 cm de diâmetro) contendo as duas extremidades curvadas num ângulo de 45° e parcialmente preenchidos com meio VM sólido suplementado com 2% de sacarose. Amostras de células foram inoculadas em uma das extremidades dos tubos e o crescimento do fungo ao longo do tubo foi monitorado diariamente, por 6 dias, através da marcação da frente do crescimento micelial. A linhagem selvagem FGSC#424 foi usada como controle do experimento.

10.2- Análises morfológicas

A análise morfológica foi efetuada em meio sólido, através de análise visual, e através de microscopia de células crescidas em culturas submersas. As células foram inoculadas em meio VM líquido e incubadas a 30°C, 250 rpm. Alíquotas foram retiradas ao longo do tempo, coradas com azul de lactofenol e visualizadas por microscopia de campo claro em um microscópio Leica DML-B (Laboratório de Micologia, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP-Araraquara).

11- Produção de proteínas recombinantes em *E. coli*

As proteínas GSN, GNN e GSK de *N. crassa* foram produzidas na forma recombinante em *E. coli*. Aqui serão descritas as metodologias para a produção das proteínas GSN e GSK. A metodologia de produção da enzima GNN será abordada posteriormente na parte 3 deste trabalho.

11.1- Construção dos plasmídeos para a produção da proteína GSN recombinante

11.1.1- Amplificação dos insertos por PCR

Para a expressão da proteína glicogênio sintase de *N. crassa* (GSN) em *E. coli*, diferentes construções foram realizadas, as quais permitiram a expressão da proteína fusionada

a diferentes "tags". Para a produção da proteína GSN em fusão com o "tag" de glutathione-S-transferase (GST), a ORF correspondente foi amplificada usando os seguintes oligonucleotídeos:

GSN-F: 5'-CGGGATCC**ATG**GCCACGAGAACCG-3'

*Bam*HI

GSN-R2: 5'-AGGAAAAAAGCGGCCGCT**TAC**CTGGTGCCGTTGAGTTG-3'

*Not*I

Para a produção da mesma proteína, fusionada a um 'tag' de poli-histidinas (His6), os seguintes oligonucleotídeos foram utilizados:

GSN-F2: 5'-GG**CATATG**GCCACGAGAACCG-3'

*Nde*I

GSN-R3: 5'-CGGGATCC**TAC**CTGGTGCCGTTGAGTTG-3'

*Bam*HI

Adicionalmente, para a produção da proteína GSN truncada no aminoácido 624 (GSN Δ 624) em fusão ao "tag" de poli-histidinas, o primer GSN-F2 (acima) juntamente com o primer GSN624-R (listado abaixo) foram utilizados:

GSN624-R: 5'-CGGGATCC**TACT**CGACTCCTGGAAT-3'

*Bam*HI

Os correspondentes sítios de restrição em cada oligonucleotídeo estão sublinhados e os códons de iniciação e terminação estão representados em negrito. O códon de terminação no oligonucleotídeo GSN624-R foi inserido para permitir a produção da proteína truncada.

As reações de PCR foram efetuadas tendo como fonte de DNA o plasmídeo YpADE5-*gsn*, o qual contém o cDNA *gsn* completo. As reações de polimerização foram efetuadas na presença de 100 pmoles de cada oligonucleotídeo, 1x tampão de reação, 2,0 mM de MgCl₂, 100 ng de DNA molde e 1U de "Taq *pf*x High Fidelity DNA Polymerase" (Invitrogen), num volume final de 50 μ L de reação. Os ciclos da PCR foram: desnaturação (95°C/1 min), anelamento (55°C/30 seg) e polimerização (72°C/2 min), por 30 ciclos.

Os produtos das reações de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 0,8% em tampão TAE 1X concentrado (40 mM Tris-HCl, pH 8,0, 19 mM ácido acético e 1 mM EDTA) contendo 1 μ g/mL de brometo de etídeo. As bandas correspondentes aos

produtos de amplificação foram cortadas do gel e purificados através do kit Gene-Clean (Bio101).

11.1.2- Subclonagem dos produtos de PCR nos vetores de expressão

Os produtos de amplificação purificados foram, inicialmente, subclonados no vetor de clonagem pMOS-Blue e checados por sequenciamento de DNA. Os insertos foram, então, transferidos para os vetores de expressão da seguinte maneira: o inserto *gsn* foi retirado do vetor pMOS-Blue, por digestão com as enzimas *Bam*HI e *Not*I, e transferido para o vetor de expressão pGEX-4T1 (Amersham), previamente digerido com as mesmas enzimas. Os insertos *gsn* (*Nde*I/*Bam*HI) e *gsn624* (*Nde*I/*Bam*HI) foram igualmente transferidos do vetor pMOS-Blue para o vetor pET28a (Novagen), por digestão dos vetores com as respectivas enzimas de restrição. Os produtos de ligação foram usados para transformar células bacterianas da linhagem DH10B, e seleção dos transformantes através de plaqueamento em meio de cultura LB, suplementado com 100 µg/mL de ampicilina (construção pGEX-*gsn*) e 60 µg/mL de kanamicina (pET28a-*gsn* e pET28a-*gsn624*). Clones positivos foram escolhidos para a transformação da linhagem de *E. coli* produtora.

11.2- Construção do vetor para a produção da proteína GSK recombinante

11.2.1- Amplificação dos insertos por PCR

A proteína NcGSK de *N. crassa* foi produzida na forma recombinante em células de *E. coli* como proteínas de fusão ao "tag" de GST. Para isso, a ORF foi amplificada por PCR, a partir do vetor YpADE5-*Ncgsk*, com os seguintes oligonucleotídeos:

GSK-F: 5'-GAATTCATGGCGTCGAACCGCC-3'

*Eco*RI

GSK-R: 5'-GTCCACTCAGTCTAACTTGGCCATC-3'

*Sal*I

O produto de amplificação foi subclonado no vetor pMOS-Blue e seqüenciado para confirmação da seqüência. Posteriormente o inserto foi retirado do vetor com as enzimas *Eco*RI e *Sal*I e inserido no vetor de expressão pGEX-4T1, previamente digerido com as mesmas enzimas. Os clones positivos contendo os insertos clonados adequadamente foram obtidos após análises de restrição e sequenciamento de DNA.

11.3- Produção das proteínas recombinantes

Células de *E. coli* BL21(DE)pLys-S competentes foram transformadas separadamente com 1 µg das construções plasmidiais pGEX-*gsn*, pET28a-*gsn*, pET28a-*gsn624* e pGEX-*Ncgsk*, posteriormente plaqueadas em meio LB contendo o respectivo antibiótico. Colônias isoladas de cada transformação foram analisadas para a produção da proteína recombinante em pequena escala (10 mL de cultura). Um clone apresentando alta produção das diferentes proteínas recombinantes foi utilizado nos procedimentos de produção em larga escala. Inicialmente, as células foram inoculadas em 10 mL de meio LB contendo o antibiótico adequado, e incubadas por 12 h a 37°C, 250 rpm. Esta cultura foi usada como pré-inóculo e 2 mL desta cultura foram inoculados em 50 mL de meio LB suplementado com o antibiótico. A cultura foi incubada nas mesmas condições acima até atingir uma $DO_{600nm}=0,7$. Posteriormente, a produção das proteínas recombinantes foi induzida pela adição de IPTG numa concentração final de 0,1 mM. As culturas foram incubadas a 28°C, 250 rpm por 4 h e ao final da indução as células foram coletadas por centrifugação a 5.000 rpm.

11.4- Purificação das proteínas recombinantes

Diferentes procedimentos cromatográficos foram usados para a purificação das proteínas recombinantes, os quais são descritos a seguir:

11.4.1- Purificação de proteínas recombinantes fusionadas à GST

Para a purificação da proteína GST-GSN e GST-NcGSK, o precipitado de células foi ressuspenso em 50 mL de tampão de lise (tampão salina fosfato, PBS 1x pH 7,3, 10 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 2 mM TLCK, aprotinina e pepstatina, ambos na concentração de 1 µg/mL. As células foram lisadas por 3 passagens sucessivas em uma *French Pressure Cell Press* (Sim Aminco) ajustada para 10.000 psi. O lisado celular foi centrifugado a 20.000 x *g* por 20 min a 4°C e o sobrenadante foi recolhido. A proteína recombinante contida no sobrenadante foi purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna de glutationa sepharose 4B GST-Trap (1 mL) (Amersham) num aparelho "Äkta Prime Protein Purification System" (Amersham). A proteína recombinante foi eluída da coluna com uma solução 10 mM de glutationa reduzida.

11.4.2.- Purificação de proteínas recombinantes fusionadas à poli-Histidinas (His6)

As células expressando as proteínas His6-GSN e His6-GSNΔ624 foram ressuspenso em tampão de homogeneização (tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 8,0, 500 mM NaCl, 10 mM imidazol, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina, 2 mM TLCK, aprotinina e pepstatina ambos na concentração de 1 µg/mL. Similarmente, a suspensão celular foi lisada em uma French Press, e o sobrenadante foi recolhido após centrifugação. As proteínas recombinantes foram fracionadas

por cromatografia de afinidade em colunas de Ni²⁺-NTA-agarose Hi-Trap (1mL) (Amersham). As proteínas foram eluídas em um gradiente linear 10-500 mM imidazol preparado no mesmo tampão de homogeneização. Todas as proteínas recombinantes foram dialisadas contra 1L de tampão Tris-HCl, 50 mM, pH 7,6, 1 mM β-mercaptoetanol e 1 mM PMSF, por 24 horas, com duas trocas do tampão de diálise. Glicerol foi adicionado a uma concentração final de 20% e as proteínas foram estocadas a -80°C.

12- Produção de anticorpos

A produção dos anticorpos anti-GSN, anti-GNN e anti-NcGSK seguiu procedimentos semelhantes, exceto que para a produção do anticorpo anti-NcGSK, fragmentos de gel de poliacrilamida contendo a proteína NcGSK foram macerados em nitrogênio líquido e utilizados para a imunização.

12.1- Imunização dos coelhos

Os anticorpos foram produzidos em coelhos utilizando a infra-estrutura existente no Departamento de Análises Clínicas, Lab. Profa. Dr. Maria José S. M. Giannini, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara. O esquema de imunização está descrito abaixo:

Inicialmente uma sangria feita na orelha dos animais foi efetuada para a retirada de sangue, dos quais foi separado o soro pré-imune.

Primeira inoculação –250 µg da proteína (volume de 500 µL) foi misturada com igual volume de adjuvante de Freund completo e a emulsão foi inoculada na região dorsal por via subcutânea, em diferentes locais.

Segunda inoculação (“challenge”) - Esta inoculação foi feita 21 dias após a primeira inoculação. Um volume contendo 200 µg de antígeno (450 µL) foi misturado ao mesmo volume de adjuvante de Freund incompleto e a emulsão foi inoculada na região dorsal do animal, via subcutânea em diferente locais.

Terceira inoculação (1º“Booster”) - Esta inoculação ocorreu 15 dias após a segunda inoculação e foi usada a mesma quantidade de proteína e adjuvante incompleto citada anteriormente.

Primeira sangria de prova - A sangria foi feita sete dias após a terceira inoculação através da retirada de amostras de sangue da orelha dos animais e análise do soro, em diferentes

diluições, por "Western blot". A análise foi feita usando amostras das proteínas recombinantes purificadas (5 µg por canaleta) , assim como contra o extrato protéico total de *N. crassa* (50 µg de proteína do extrato bruto por canaleta).

Quarta inoculação (2° "Booster") - Inóculo feito 15 dias após a terceira inoculação (sete dias após a primeira sangria de prova). As quantidades de proteína e adjuvante usados foram iguais aos descritos anteriormente.

Quinta inoculação (3° "Booster") - Esta inoculação foi feita 15 dias após o 2° "booster" da mesma forma como descrito anteriormente.

Segunda Sangria de Prova - A sangria foi feita sete dias após o terceiro "booster". Análise do soro por "Western blot" similar ao procedimento descrito na primeira sangria de prova.

Sacrifício do animal - 7 dias após a segunda sangria. O sacrifício foi feito através de punção cardíaca. O sangue foi colhido, o soro separado, aliquotado e armazenado a -20°C.

12.2- Análise dos soros obtidos

O título do soro obtido do processo de imunização foi determinado através de "Western blot" usando um dispositivo Multi-Screen (BioRad). Inicialmente, o extrato protéico bruto de *N. crassa* foi preparado a partir de 200 mg de células, segundo o protocolo descrito no item 8.1.

Amostras contendo 50 µg de extrato protéico bruto (por canaleta) foram separadas por SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%. As amostras foram transferidas para membranas de nitrocelulose em um sistema Mini Trans-Blot Electrophoretic Transfer Cell (Bio Rad) usando um tampão de transferência contendo 20 mM Tris-HCl, pH 8,0, 150 mM glicina, 200 mL/L de metanol. A transferência foi efetuada por 1 h a 250-300mA, 33W. A membrana foi então incubada com 15 mL de uma solução tampão 1 X TBS (tampão Tris-salina), 0,05% Tween-20 suplementada com 5% de leite em pó desnatado, por 3 horas, para permitir o bloqueio da mesma. Após esse período, a membrana foi transferida para o dispositivo Mini-Protean Multi-Screen e diferentes diluições do soro (1:100 a 1:5000) preparados em TBST + 5% leite foram adicionadas a cada uma das canaletas. A membrana foi incubada, por duas horas, ao final da qual foi lavada duas vezes em TBST. Posteriormente, 15 mL de TBST + 5% leite contendo anti-γ-globulina de coelho conjugado com peroxidase (Bio Rad) foi adicionado (diluição 1:2000). A incubação com o anti-anticorpo procedeu por 3 h, ao final das quais a membrana foi lavada 3 vezes em TBST. A revelação da membrana foi efetuada com o kit ECL-Enhanced Chemiluminescence (Amersham) seguida de exposição a filmes de raios-X.

13- Fosforilação *in vitro* da glicogênio sintase de *N. crassa*

A fosforilação das proteínas recombinantes His6-GSN e His6-GSN Δ 624 foi efetuada, usando-se os extratos brutos das linhagens RP-1 (*gsn^{rip}*), *crisp* e *mcb* como fonte de proteínas quinases. Para isso, estas linhagens foram crescidas em meio mínimo de Vogel líquido a 30 °C por 36 h, filtradas e congeladas. Extratos protéicos destas linhagens foram obtidos segundo descrito anteriormente e diluídos para uma concentração protéica final de 5 mg/mL.

A fosforilação das proteínas foi realizada na presença de 3 μ g de cada proteína recombinante e 5 μ L de extrato protéico bruto (5 mg/mL) em um volume de 20 mL. A mistura foi pré-incubada a 30°C por 5 min, ao final dos quais 5 mL do "mix" ATP/Mg²⁺ (1 mM ATP, 25 mM MgCl₂, 0,5 μ L γ -³²P-dATP, atividade específica 330 mCi/mmol, ~1.200 cpm/mmol) foi adicionado. A reação continuou por 1 h. Após esse período foi adicionado 25 μ L da resina Ni²⁺-NTA-Agarose, equilibrada em tampão de ligação (tampão fosfato de sódio 20 mM, pH 7,6, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidina). A mistura foi incubada à temperatura ambiente, sob leve agitação, por 1 h, e a resina foi, então, recuperada por centrifugação a 3.000 rpm por 1 min, lavada 3 vezes no mesmo tampão e finalmente ressuspensa em 30 μ L de tampão de amostra SDS-PAGE 1X. As proteínas foram eluídas da resina por incubação em banho de água fervente e separadas por SDS-PAGE em géis 9%. Os géis foram corados com Coomassie-Blue Brilliant R250, descorados, lavados em água, secos e expostos ao filme radiográfico.

14- Fosforilação *in vitro* do Inibidor-1 de *N. crassa* (INc-1) por NcGSK

A proteína recombinante GST-NcGSK foi usada em um experimento *in vitro* para fosforilar a proteína INc-1, produzida na forma recombinante e gentilmente cedida pela Profa. Dr. Aline M. da Silva, Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, USP, São Paulo.

Para isso, 2,5 μ g de INc-1 foi incubada na presença de 1,5 μ g de GST-NcGSK em uma reação contendo 50 mM Tris-HCl, pH 7,4, 25 mM MgCl₂ e 1 μ L γ -³²P-dATP, atividade específica 330 mCi/mmol, num volume final de 20 μ L. A mistura foi incubada a 30 °C por 30 min e terminada pela adição de 5 μ L de tampão de amostra SDS-PAGE 5x. As amostras foram submetidas a SDS-PAGE em gel 12%, o gel foi corado, descorado, seco e submetido a autoradiografia.

15- Análise da expressão gênica

15.1- Preparação de RNA total

O procedimento de extração foi realizado segundo o protocolo descrito por Sokolovsky *et al.*, [119]. Conídios ou micélio do fungo foram macerados em gral de porcelana com nitrogênio líquido e transferidos para tubos eppendorf de 2 mL contendo 750 μ L de tampão de lise (100 mM Tris-HCl, pH 8,0, 4% de SDS, 0,6 M de NaCl, 10 mM de EDTA) e 750 μ L de fenol saturado com 0,1 M Tris-HCl, pH 8,0. A suspensão foi agitada, à temperatura ambiente, por 20 min, e então, centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. A fase aquosa foi transferida para um tubo eppendorf de 1,5 mL contendo um volume igual de fenol saturado. A mistura foi homogeneizada e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm. Novamente a fase aquosa foi transferida para um tubo limpo e 0,75 vol. de uma solução 8 M LiCl foi adicionado. A mistura foi mantida a 4°C por uma noite, brevemente homogeneizada e centrifugada por 10 min a 10.000 rpm. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resultante foi dissolvido em 300 μ L de água tratada com dietil-pirocarbonato (DEPC). Posteriormente, foram adicionados 30 μ L de acetato de sódio 3 M e 750 μ L de etanol 95%. A mistura foi homogeneizada e mantida a -80°C por 30 min, ao final dos quais foi centrifugada a 10.000 rpm por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi lavado duas vezes com 500 μ L de etanol 70%, antes de ser dissolvido em 50 μ L de água tratada com DEPC.

15.2- Análise da expressão gênica por "Northern blot"

Quantidades iguais (15 μ g) de amostras de RNA total em tampão de desnaturação (20 mM MOPS, pH 7,0, 50% formamida, 7,0% formaldeído, 0,025% azul de bromofenol e 0,1 μ g brometo de etídeo) foram desnaturadas a 65°C por 10 min e aplicadas em gel de agarose 1,5% em tampão MOPS contendo 0,6 M de formaldeído. As amostras foram submetidas à eletroforese por 8 h, a uma voltagem de 35V. O RNA foi transferido para membranas de Nylon neutras (Hybond N- GE Healthcare) por capilaridade em solução SSC 2x e fixadas através de "crosslinking". Posteriormente, a membrana foi extensivamente lavada em SSC 2x para a eliminação de qualquer resíduo de formaldeído. As condições de hibridização foram similares às descritas anteriormente no item 6.2.3.

Após as lavagens, a membrana foi exposta ao filme radiográfico Kodak G/RA T-MAT por 24 h. A análise densitométrica foi realizada através do programa Kodak Digital Science 1D Image Analysis Software em um sistema de fotodocumentação EDAS, para a determinação da taxa de indução da expressão.

[119] Sokolovsky, V.; Kaldenhoff, R.; Ricci, M and Russo, V. E. A. (1995) Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*, *Fungal Genet. Newsl.* **37**: 41-43.

RESULTADOS
PARTE 1

Considerações iniciais

Em um trabalho anterior em nosso laboratório descrevemos a clonagem de um cDNA (*gsn*) o qual codifica para a enzima glicogênio sintase em *Neurospora crassa* e a caracterização da expressão deste gene em condições que são conhecidas afetar o acúmulo de glicogênio no fungo [65]. Nesta parte do trabalho, estendemos a caracterização do gene *gsn*, estudando o efeito da inativação deste gene no metabolismo global de glicogênio no fungo e efetuamos uma caracterização parcial dos mecanismos de controle da atividade GS por fosforilação, analisando especificamente o papel da via de transdução de sinais mediada por AMP cíclico.

1- Inativação do gene *gsn*

Um mutante de *N. crassa* contendo o gene *gsn* inativo foi gerado para permitir estudos posteriores sobre os mecanismos que regulam a expressão e atividade da enzima glicogênio sintase nesse modelo. Para isto efetuamos a inativação do gene *gsn* utilizando a técnica denominada RIP ("Repeat Induced Point Mutation"). Essa técnica se baseia numa característica do fungo *N. crassa*, na qual cópias duplicadas de uma mesma seqüência são mutadas durante o período pré-meiótico. Este processo representa uma maneira de se evitar eventos de recombinações, inserções e transposições no genoma do fungo, como resultado da entrada de DNAs exógenos. Nesse processo, no período do cruzamento anterior à fusão dos núcleos o genoma é "scaneado" para a presença de seqüências duplicadas e, quando encontradas, ambas as seqüências duplicadas são mutadas pontualmente. Desse modo, esse fenômeno pode ser utilizado como um mecanismo para inativar especificamente um gene.

Para a inativação do gene da glicogênio sintase, a cópia genômica foi amplificada por PCR a partir do DNA genômico do fungo e subclonada no vetor pMSN1, gerando a construção pMSN1-*gsn*. Esta construção foi usada para transformar conídios da linhagem FGSC 3957 por eletroporação. A eficiência de transformação foi de ~750 transformantes/ μ g de DNA plasmidial, e dezoito clones foram aleatoriamente selecionados a partir dos transformantes e crescidos individualmente em tubos contendo VM. A presença da dupla cópia do *gsn*, inserida por transformação, foi confirmada por "Southern blot", após crescimento dos clones em meio líquido e extração de DNA genômico.

A figura 6 mostra o resultado da análise do DNA genômico de 17 transformantes. O clone 5 não apresentou crescimento em cultura líquida e foi descartado. Três clones apresentaram uma segunda cópia do gene *gsn* (4, 7 e 16), além da cópia endógena. Um outro clone apresentou 5 cópias além da cópia endógena demonstrando a ocorrência de eventos de integração múltiplos. Um clone (7), contendo uma cópia adicional do *gsn*, foi escolhido para dar prosseguimento ao processo de inativação gênica. Essa linhagem foi usada no cruzamento com

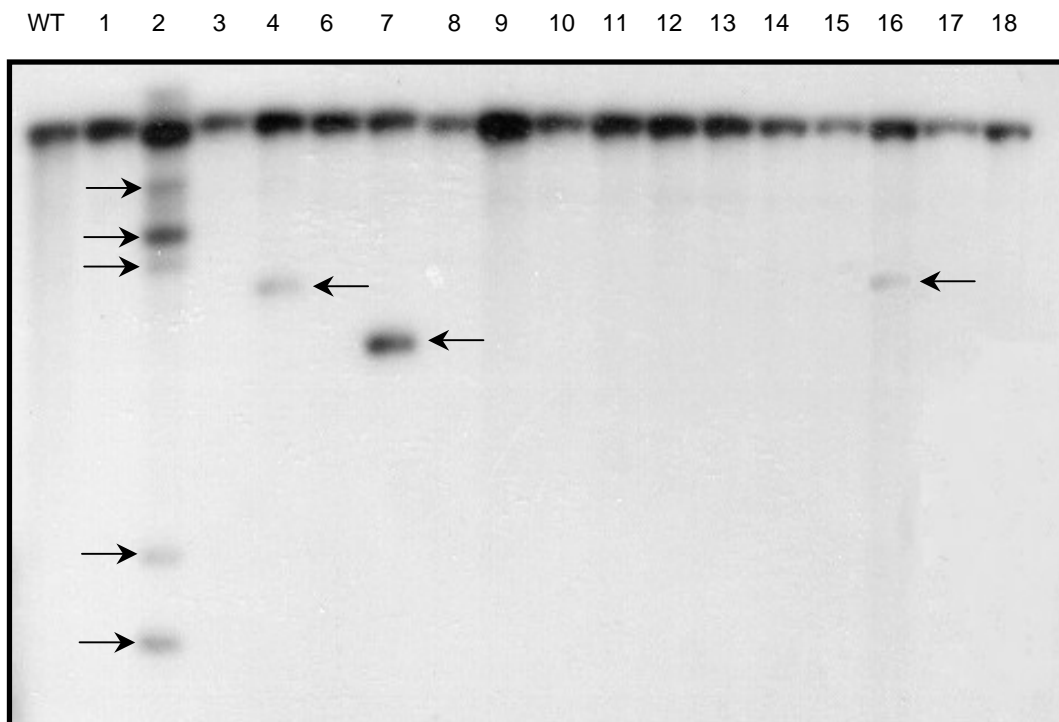


Figura 6- Análise da integração do vetor pMSN1-*gsn* no genoma de *N. crassa*. DNA genômico de 18 clones transformados com a construção pMSN1-*gsn* foram analisados por “Southern blot” para a determinação dos eventos de integração. Amostras de DNA de cada clone foram digeridos com a enzima *EcoRI*, separados por eletroforese em gel de agarose 0,8%, transferidos para membrana de Nylon e hibridizados com o gene *gsn* marcado radiativamente. WT representa o DNA genômico da linhagem selvagem não transformada.

a linhagem Bat9-5a (*a*, *nic*⁻, *cot-1*). Essa linhagem é auxotrófica para ácido nicotínico e apresenta crescimento colonial em temperaturas maiores ou iguais a 32°C.

A linhagem Bat9-5a foi usada como linhagem receptora e seguiu os protocolos padrões de cruzamento para o fungo *N. crassa*. Após 15 dias de cruzamento, os ascósporos foram coletados das paredes do tubo com água estéril, submetidos a choque térmico para a ativação dos mesmos e plaqueados em meio mínimo de Vogel com sorbose (para permitir o crescimento colonial) sem ácido nicotínico. Desse modo clones prototróficos para ácido nicotínico foram selecionados. Após dois dias de incubação a 30°C, colônias foram transferidas para tubos contendo meio de Vogel sem sorbose e sem ácido nicotínico. Os tubos foram incubados a 37°C e os clones que cresceram colonialmente nessa temperatura foram selecionados e incubados adicionalmente a 30°C para permitir o crescimento micelial e conidiação. Suspensões em água estéril de cada clone foram feitas e 10 µL de cada suspensão foram aplicados na superfície de uma placa de meio Vogel sem sorbose. A placa foi incubada a 37°C por 48 h, e ao final desse período, o conteúdo de glicogênio de cada clone foi analisado qualitativamente através de exposição ao vapor de iodo. A figura 7 demonstra a análise qualitativa do acúmulo de glicogênio na progênie obtida do cruzamento da linhagem Bat9-5a com a linhagem FGSC#3957 contendo dupla cópia do gene da glicogênio sintase. Setenta e oito clones foram analisados em placas. Quatro segregantes não foram capazes de crescer ou cresceram pouco em placa. Oito segregantes (B12, D6, D8, E4, F4, F6, F7 e F12) apresentaram colorações alteradas quando comparadas ao controle Bat9-5a, o qual apresentou uma coloração mais escura e um clone (F6) apresentou coloração bastante amarelada. Esses clones foram selecionados para análises adicionais.

De um modo geral, no processo de RIP as mutações pontuais acontecem basicamente por alterações GC→AT e esse processo envolve a metilação de bases de citosina. Sendo assim, linhagens resultantes do processo de RIP apresentam uma significativa proporção de citosinas metiladas na região das seqüências alvo do processo de RIP. Portanto, pudemos analisar os clones que sofreram o processo de RIP através de "Southern blot", usando, para isso, uma enzima de restrição sensível a metilação que não é capaz de clivar o sítio de reconhecimento quando este possui citosinas metiladas. Para isso, utilizamos a enzima *Mbol*.

A figura 8 mostra o resultado obtido da análise por "Southern blot" dos oito segregantes que apresentaram variações na coloração com vapor de iodo. Apenas o clone F6 apresentou uma variação no perfil de restrição, com a presença de uma banda que estava ausente nos outros clones analisados, assim como na amostra controle (DNA genômico da linhagem Bat9-5a). Este clone, o qual apresentou a maior diferença na coloração com iodo, foi denominado RP-1. A seqüência genômica da glicogênio sintase deste clone foi amplificada por PCR usando

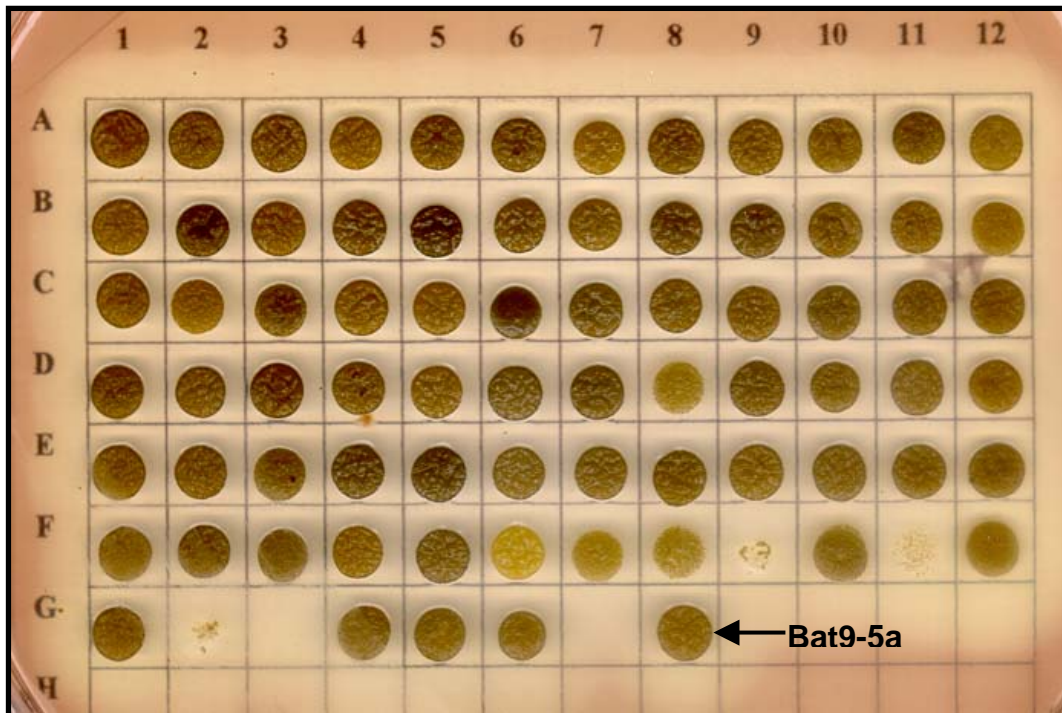


Figura 7– Análise dos segregantes mutantes na enzima glicogênio sintase. Suspensões conidiais dos clones resultantes do cruzamento da linhagem FGSC#3957, contendo uma cópia exógena do gene *gsn*, com a linhagem Bat9-5a foram aplicadas na superfície de uma placa contendo meio VM. As células foram crescidas por 48 h a 37°C. Após esse período o conteúdo de glicogênio dos clones foi determinado pela coloração com solução de lugol. O clone apontado pela flecha corresponde à linhagem controle.

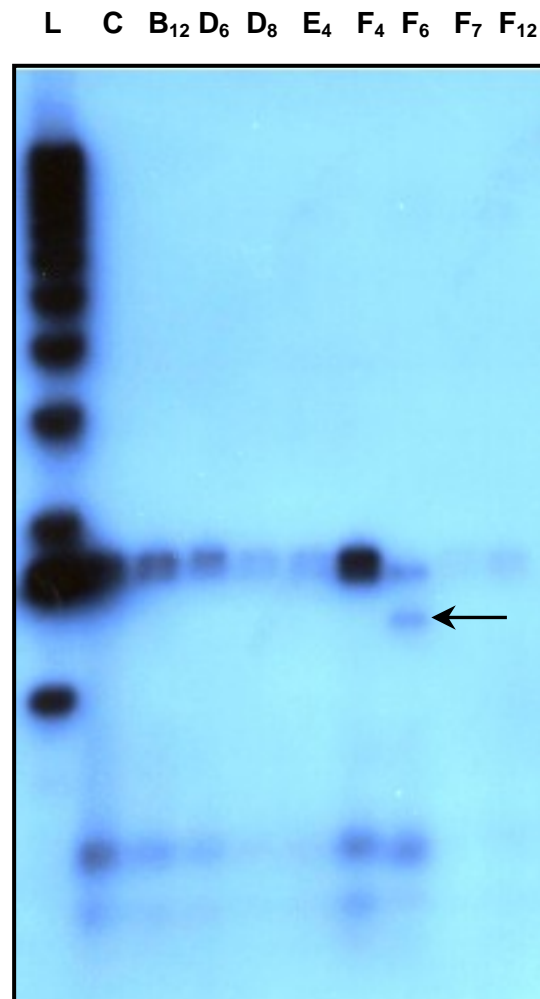


Figura 8- “Southern blot” do DNA genômico de oito segregantes apresentando alteração no conteúdo de glicogênio após RIP. O DNA genômico foi digerido com *Mbol*, separado em gel de agarose 0,8%, transferido para membrana de Nylon Hybond N+ e sondado com o gene *gsn* marcado radioativamente. (C) representa o DNA genômico da linhagem parental Bat9-5a. A flecha indica uma banda de restrição que pode ser vista apenas na linhagem F6 (RP-1).

oligonucleotídeos específicos e a posição das mutações foi determinada através de sequenciamento de DNA. Comparação das seqüências do gene da linhagem selvagem e da linhagem RP-1 mostrou a presença de 62 mutações ao longo da seqüência do gene na linhagem RP-1. Três destas mutações estavam localizadas dentro do segundo íntron. Todas as mutações foram do tipo G→A. A figura 9 mostra as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos da porção N-terminal das proteínas selvagem e mutada. Uma mutação no nucleotídeo 280 inseriu um “stop códon” na posição do aminoácido 93. Desse modo, a linhagem RP-1 expressa apenas os primeiros 93 aminoácidos da porção N-terminal da glicogênio sintase e explica a ausência de glicogênio na linhagem obtida.

A linhagem contendo o gene *gsn* inativo foi analisada através de crescimento em meios sólido e líquido e não apresentou diferenças em relação à linhagem selvagem. Esta linhagem também foi analisada frente ao choque térmico e também não mostrou diferenças comparada à linhagem selvagem (dados não mostrados).

2- Reversão fenotípica do mutante *gsn^{rip}*

A recuperação do fenótipo da linhagem mutante foi realizada com o objetivo de conseguir produzir a proteína GSN recombinante no próprio fungo e, assim, estudar os sítios de fosforilação através de mutagênese sítio-dirigida. Para isto dois plasmídeos, um contendo a ORF amplificada do cDNA e outro a cópia genômica inteira (mais introns) do gene *gsn* foram utilizados para transformar a linhagem RP-1 (*gsn^{rip}*) e a seleção dos transformantes foi realizada em meio contendo glufosinato de amônio (Basta). Os transformantes foram analisados para a reversão fenotípica através de coloração com iodo. Dez clones de cada transformação foram analisados e apenas dois clones transformados com plasmídeo contendo a cópia genômica do gene *gsn* apresentaram reversão, uma vez que estes clones mostraram coloração bastante intensa com iodo (figura 10).

A presença de atividade glicogênio sintase foi medida nas linhagens estudadas com o objetivo de confirmar a inativação do gene e a subsequente reversão do fenótipo. A figura 11 mostra a determinação da atividade glicogênio sintase entre as linhagens parentais FGSC#3957 e Bat9-5a, a linhagem RP-1 e a linhagem recuperada pela inserção do gene *gsn*. A linhagem RP-1 basicamente não apresentou atividade GS, quando comparada com as linhagens parentais, o que demonstrou que o gene da glicogênio sintase foi eficientemente inativado pelo processo de RIP. A inserção de uma cópia genômica extra do gene *gsn* na linhagem RP-1 foi suficiente para restaurar os níveis de atividade GS próximo aos observados nas linhagens controles.

```

1  M A H D N R E P R E V K N H L L F
GSN ATGGCCCACGACAACCGTGAACCCCGCGAGGTCAAAAACCACCTCCTCTTT
RP-1 ATGGCCCACGACAACCGTGAACCCCGCGAGGTCAAAAACCACCTCCTCTTT

18  E V A T E V A H R V-----
GSN GAGGTGGCGACCGAGGTCGCCATCGAGgtatgcgcaaaagtatcaattgc
RP-1 GAGGTGGCGACCGAGGTCGCCATCGAGgtatgcgcaaaagtatcaattgc

28  ----- G G I Y S
GSN gccaggaaggagcttccaatctaacaattggttctagTTGGTGGGAATCTACT
RP-1 gccaggaaggagcttccaatctaacaattggttctagTTGGTGGGAATCTACT

33  V L K S K A P V T T A E Y G D R Y
GSN CCGTTCTCAAGTCGAAAGCTCCAGTTACAACCGCTGAATATGGCGACCGTT
RP-1 CCGTTCTCAAGTCGAAAGCTCCAGTTACAACCGCTGAATATGGCGACCGTT

50  T L I G P L N H Q S -----
GSN ACACTCTTATCGGTCTTTGAACCACCAATCGgtacgctgctcttgcgccc
RP-1 ACACTCTTATCGGTCTTTGAACCACCAATCGgtacgctgctcttgcgccc

60  -----A A
GSN tttacactgtGgcttGaaacatgggttgttgacaggaatGattccagGCGGC
RP-1 tttacactgtAgcttAaaacatgggttattaacaggaatAttccagGCGGC

62  V E V E E L E P S N P E L K A T I
GSN CGTCGAGGTTGAAGAGCTAGAGCCATCCAACCCGAACTAAAGGCGACGAT
RP-1 CGTCGAGGTTGAAGAGCTAGAGCCATCCAACCCGAACTAAAGGCGACGAT

79  Q A M R D R G I G I L Y G R W L I
GSN TCAGGCCATGAGAGACCGTGGCATCGGCATTCTTTACGGACGATGGCTCAT
RP-1 TCAGGCCATGAGAGACCGTGGCATCGGCATTCTTTACGGACGATAGCTCAT
                                     *
                                     ↑

```

Figura 9– Comparação entre as seqüências nucleotídicas do gene *gsn* e de aminoácidos da proteína glicogênio sintase da linhagem selvagem (GSN) e da linhagem RP-1 (F6). Os nucleotídeos alterados estão representados em negrito e sublinhados. O “stop codon” inserido pelo processo de RIP está mostrado com asterisco.

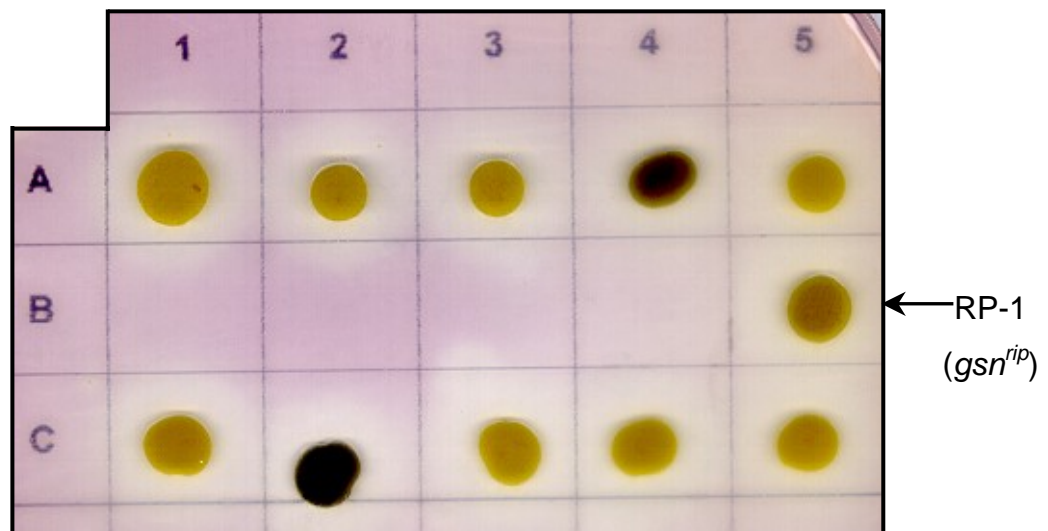


Figura 10- Reversão fenotípica do mutante RP-1 por inserção da cópia genômica do gene *gsn* (pBARGEM7.2-*gsn*) por transformação. Conídios da linhagem RP-1 foram eletroporados com a construção pBARGEM7.2-*gsn* e os transformantes foram selecionados em meio Vogel "N-free" contendo 250 µg/mL de glufosinato de amônio (Basta). Dez transformantes individuais foram selecionados e analisados para o acúmulo de glicogênio por exposição ao vapor de iodo.

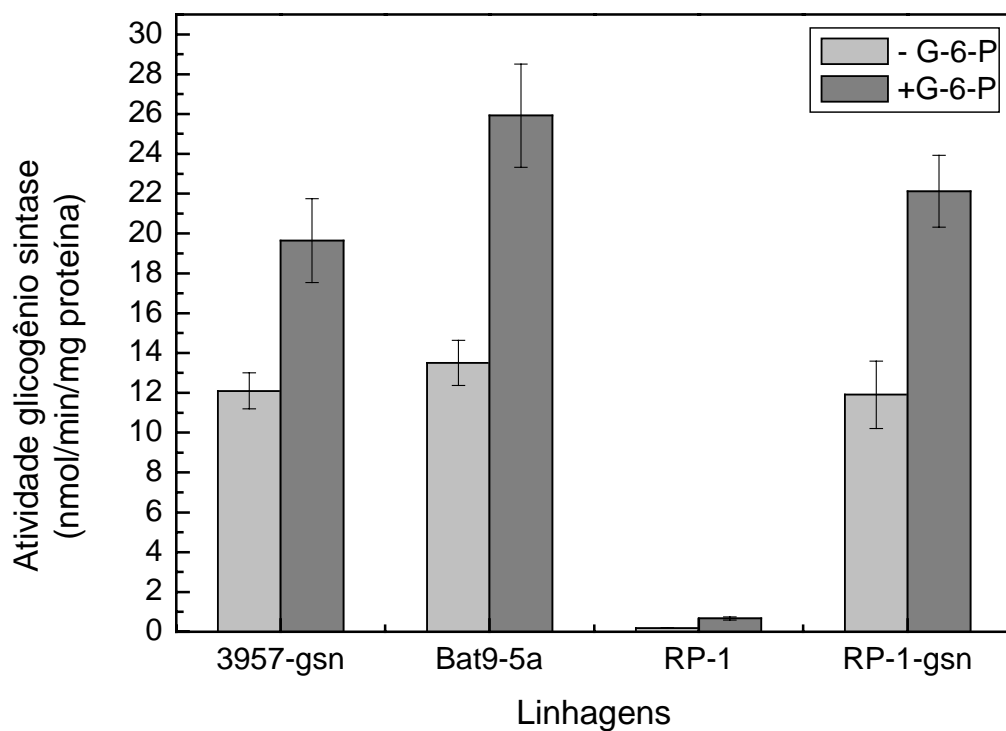


Figura 11– Dosagem de atividade glicogênio sintase nas linhagens RP-1, RP-1 complementada e parentais. Células foram crescidas em meio líquido por 24 horas, filtradas e usadas na preparação de extrato protéico total. A atividade GS foi medida nas formas dependente (+G6P) e independente de glicose-6-fosfato (-G6P).

3 - Produção e purificação da proteína GSN recombinante

A proteína GSN foi produzida na forma recombinante em *E. coli*, fusionada à GST. A proteína recombinante foi expressa em células de *E. coli* da linhagem BL21 e purificada por cromatografia de afinidade em uma coluna de glutationa sepharose 4B. A proteína foi produzida com boa solubilidade, mas com baixa ligação à coluna (resultados não mostrados), entretanto foi purificada e utilizada na produção de anticorpos em coelhos. O anticorpo produzido mostrou um título de 1:2.500 e será utilizado, no laboratório, para analisar a expressão do gene *gsn* por Western blot.

Devido à baixa ligação da proteína GST-GSN à coluna, a proteína foi produzida em fusão ao "tag" de poli-histidinas (His6). Nesta forma, foram produzidas as proteínas GSN inteira, assim como uma forma truncada na posição do aminoácido 624. A figura 12 mostra as etapas de purificação das proteínas His6-GSN e His6-GSN Δ 624. Em ambos os casos, as proteínas foram produzidas em baixa quantidade e parcialmente insolúveis, embora quantidades consideráveis das mesmas foram obtidas ao final do processo de purificação. Embora a proteína não tenha sido obtida com um alto grau de pureza, a preparação final foi utilizada nos experimentos de fosforilação *in vitro*.

4- Ensaio de fosforilação *in vitro* da GSN

As proteínas His6-GSN e His6-GSN Δ 624 foram utilizadas nos ensaios de fosforilação *in vitro* utilizando como fontes de proteínas quinases, extratos celulares brutos da linhagem RP-1 (*gsn^{rip}*), assim como da linhagem *cr-1* (*crisp-1*), a qual apresenta deficiência na atividade adenilato ciclase e, portanto, possui a via de sinalização mediada por cAMP enfraquecida. Para estes experimentos, os extratos celulares foram obtidos a partir de células crescidas por 36 horas, o qual representa o tempo quando o estado de fosforilação da enzima glicogênio sintase é máximo [65]. Como descrito na metodologia, as proteínas recombinantes foram fosforiladas em reações contendo extratos de ambas as linhagens, na presença de fosfato marcado radiativamente (γ - 32 P). Após as reações de fosforilação, as proteínas recombinantes foram recuperadas por "pull down" usando resina de Ni $^{2+}$ -NTA-agarose, ressuspensas em tampão de amostra e analisadas por SDS-PAGE. A figura 13 mostra o resultado obtido nas reações de fosforilação das proteínas His6-GSN e His6-GSN Δ 624 com extrato da linhagem RP-1.

De um modo geral, a recuperação das proteínas foi baixa após "pull-down", embora isso não tenha comprometido o ensaio. Reações controles foram efetuadas, onde apenas as proteínas recombinantes ou os extratos celulares de ambas linhagens foram incubados,

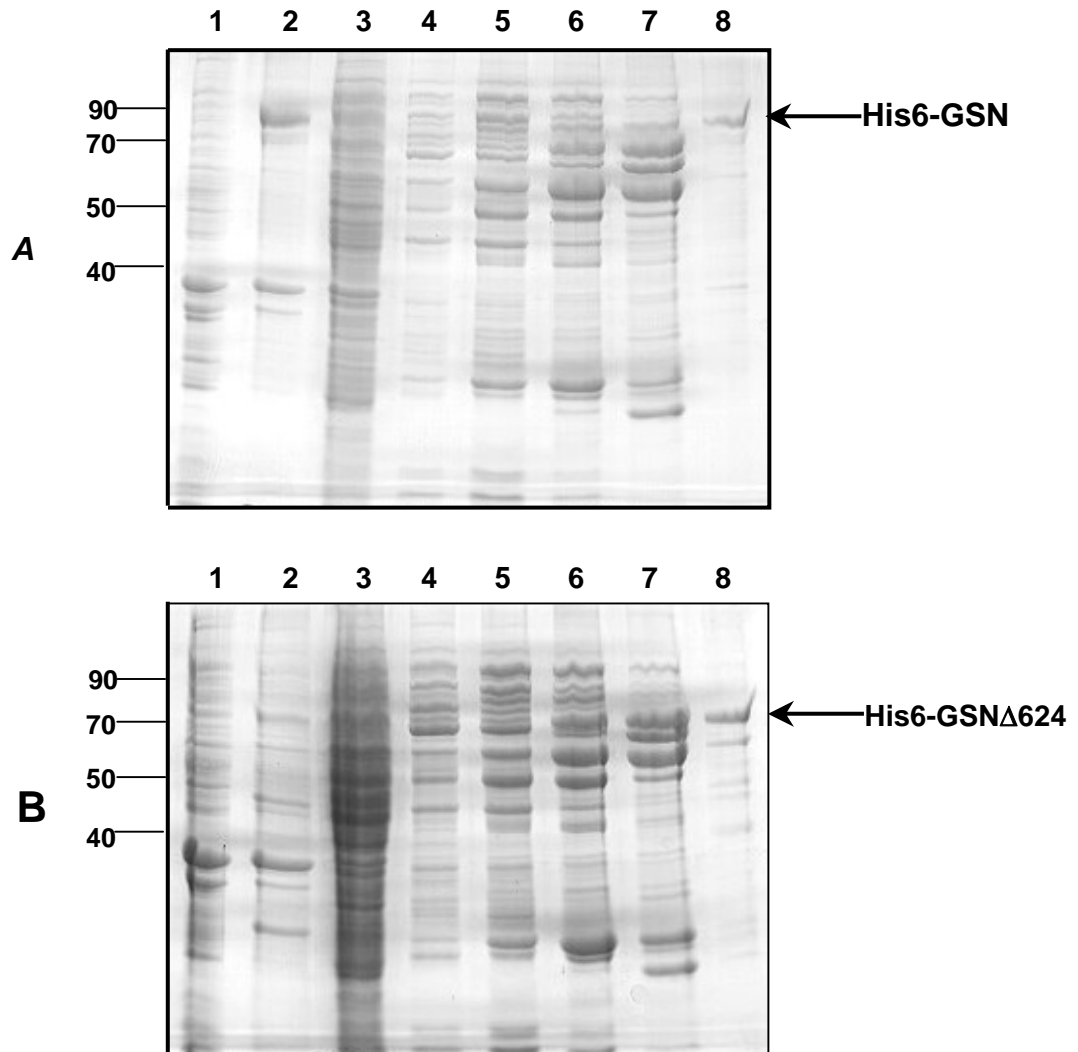


Figura 12- Etapas de purificação das proteínas glicogênio sintase recombinante His6-GSN e His6-GSN Δ 624 produzidas em *E. coli*. O extrato celular de uma cultura de 500 mL foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de Ni²⁺-NTA agarose (His-Trap) em um aparelho de purificação Äkta Prime (Amersham). 1- amostra antes da indução com IPTG, 2- fração do precipitado, 3- fração do sobrenadante, 4-8- frações do gradiente de imidazol.

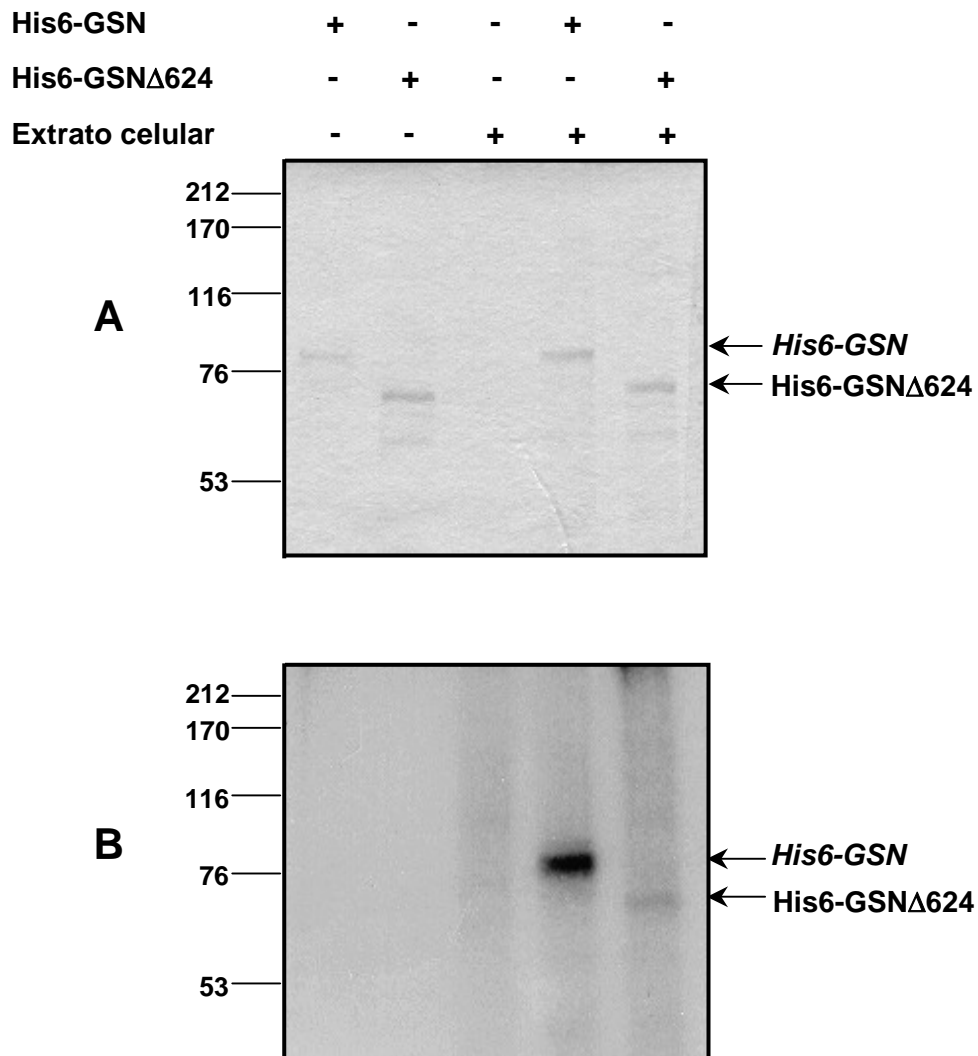


Figura 13– Fosforilação “*in vitro*” das proteínas His6-GSN e His6-GSN Δ 624 com o extrato celular bruto da linhagem RP-1. As proteínas recombinantes His6-GSN e His6-GSN Δ 624 (3 μ g) foram incubadas com extrato celular (5 mg/mL) na presença de γ -³²P-dATP. Posteriormente as proteínas foram recuperadas e analisadas por SDS-PAGE, seguido de autoradiografia do gel de poliacrilamida. Os sinais (-) e (+) representam ausência ou presença dos constituintes da reação, respectivamente. **A**- Gel de poliacrilamida corado com Coomassie-Blue, **B**- Autoradiografia.

isoladamente com γ -³²P-dATP. Nestas reações, nenhuma marcação foi observada e isto serviu como controle negativo do experimento. A proteína His6-GSN foi eficientemente fosforilada pelo extrato celular da linhagem RP-1, e apresentou considerável marcação após fosforilação e recuperação da proteína. Comparativamente, em outro experimento, onde o extrato celular da linhagem *crisp-1* foi utilizado como fonte de proteínas quinases, a extensão da fosforilação das proteínas recombinantes foi reduzida (figura 14). Análise densitométrica e determinação da relação entre as bandas das proteínas e os sinais obtidos na autoradiografia, demonstraram que a extensão da incorporação de fosfato radioativo na proteína His6-GSN quando fosforilada pelo extrato da linhagem *crisp-1* foi de aproximadamente 30% àquela observada quando o extrato da linhagem RP-1 foi utilizada. Isto demonstrou que a via de sinalização mediada por cAMP possui um papel bastante importante no processo de fosforilação da enzima glicogênio sintase.

Um resultado interessante foi obtido com a proteína His6-GSN Δ 624, o qual não possui os últimos 82 aminoácidos da região C-terminal. Esta proteína apresentou uma incorporação residual quando fosforilada com ambos os extratos. Esta incorporação, embora pequena quando comparada à quantidade de proteína, é significativa e foi confirmada em vários experimentos semelhantes. Este resultado sugeriu que possíveis sítios de fosforilação, não localizados na região C-terminal, podem existir na glicogênio sintase de *N. crassa*.

5- Atividade glicogênio sintase e conteúdo de glicogênio em linhagens mutantes na via de cAMP

Para caracterizarmos de um modo mais detalhado o papel a via de sinalização de AMP cíclico no metabolismo de glicogênio em *N. crassa*, atividade glicogênio sintase assim como o conteúdo de glicogênio foi analisado em duas linhagens mutantes nesta via, os quais apresentam mutações que levam a efeitos antagônicos. A linhagem *crisp-1*, como citado anteriormente possui a via de AMP cíclico enfraquecida devido a uma deficiência na atividade da enzima adenilato ciclase. A outra linhagem utilizada, *mcb*, consiste em uma linhagem mutante dependente de temperatura, a qual possui uma mutação na atividade regulatória da PKA, resultando numa proteína quinase constitutivamente ativa em temperaturas restritivas. Dessa forma, neste mutante, a via de sinalização mediada por AMP cíclico é exacerbada, devido a alta atividade da PKA. A figura 15 mostra os resultados de conteúdo de glicogênio e atividade glicogênio sintase das linhagens WT, *crisp-1* e *mcb* durante o crescimento vegetativo de *N. crassa*. Como pode ser observado, a linhagem *crisp-1* acumulou glicogênio em níveis muito maiores ao observado na linhagem WT, enquanto na linhagem *mcb*, os níveis deste carboidrato foram reduzidos.

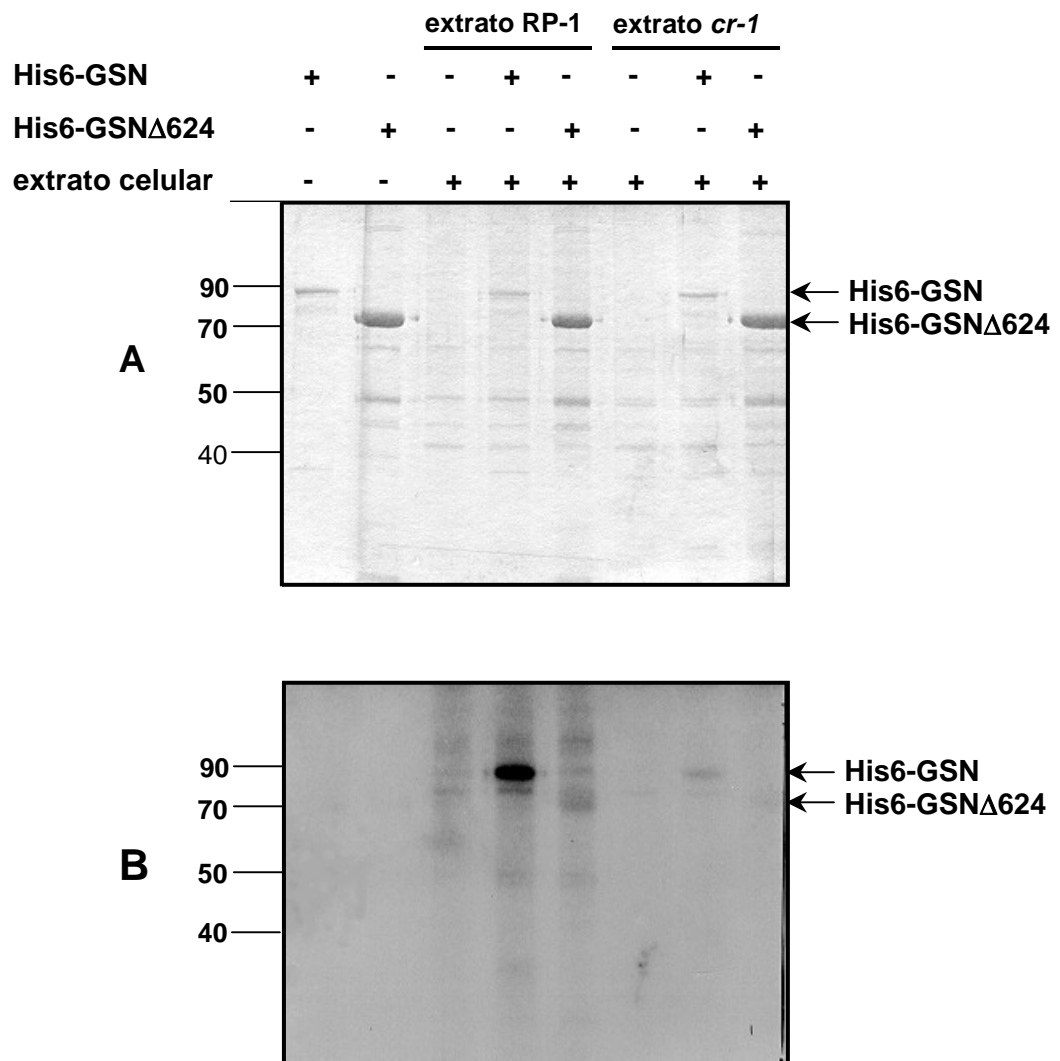


Figura 14– Fosforilação “*in vitro*” das proteínas His6-GSN e His6-GSN Δ 624 com os extratos celulares das linhagens RP-1 e *cr-1*. As proteínas recombinantes His6-GSN e His6-GSN Δ 624 (3 μ g) foram incubadas com os extratos celulares (5 mg/mL) na presença de γ -³²P-dATP. As proteínas fosforiladas foram recuperadas e analisadas por SDS-PAGE, seguido de autoradiografia do gel de poliacrilamida. Os sinais (-) e (+) representam ausência ou presença dos constituintes da reação, respectivamente. **A**- Gel de poliacrilamida corado com Coomassie-Blue, **B**- Autoradiografia.

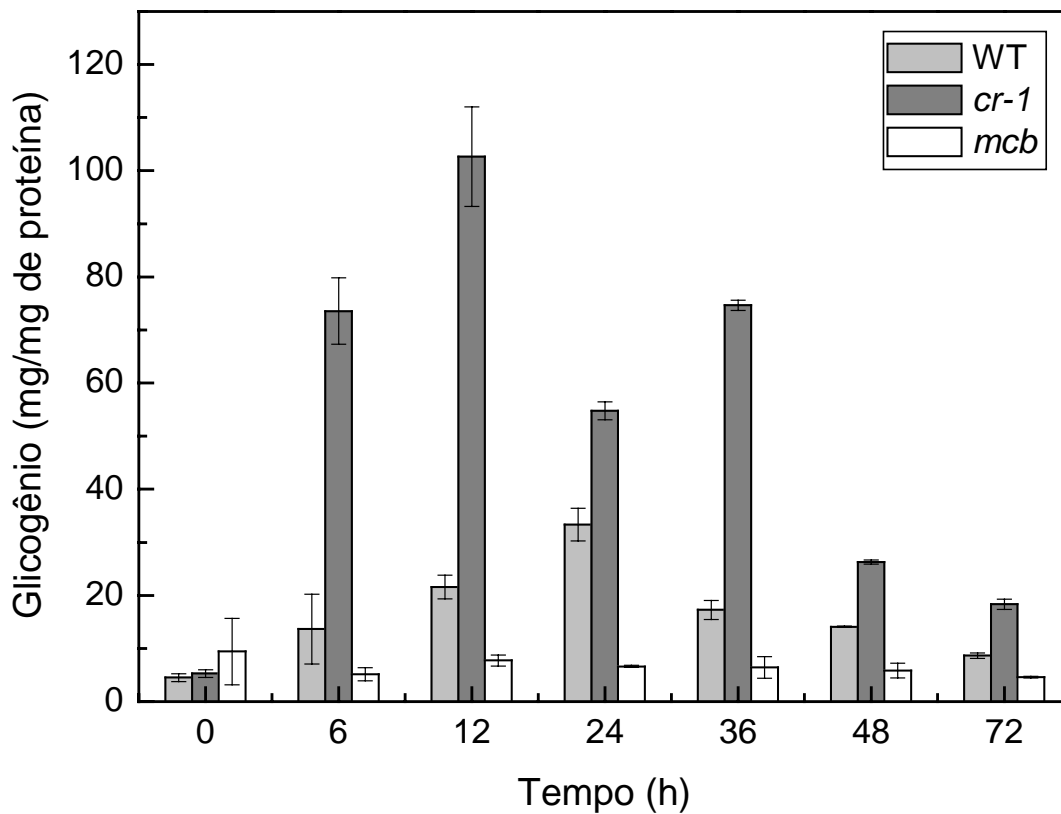


Figura 15- Conteúdo de glicogênio em células das linhagens WT, *crisp-1* e *mcb*. Amostras de glicogênio foram preparadas a partir de extratos celulares como descrito em Materiais e Métodos e digeridas com amiloglicosidase (30 mg/mL). Glicose livre liberada foi dosada enzimaticamente.

A determinação da atividade glicogênio sintase nas linhagens mutantes da via de AMP cíclico também foi efetuada. A atividade GS medida na presença do modulador alostérico glicose-6-fosfato reflete a atividade da enzima no seu estado desfosforilado enquanto os valores obtidos nas dosagens na presença de G6P correspondem à atividade total da enzima, tanto no estado fosforilado quanto desfosforilado. Portanto, a razão de atividade na ausência e presença de G6P (taxa -/+) representa um índice cinético do estado de fosforilação da enzima, onde valores próximos a zero são correlacionados à proteína altamente fosforilada, e valores próximos a 1 refletem o baixo estado de fosforilação da enzima. A figura 16 mostra os valores de razão de atividade -/+ G6P para as linhagens WT, *cr-1* e *mcb* durante o crescimento vegetativo. Para a linhagem WT, os valores permaneceram altos até o período de 48 horas demonstrando que a enzima permaneceu no estado desfosforilado até este momento, sofrendo em seguida uma inativação por fosforilação. Estes resultados concordam com dados publicados anteriormente [65]. Em contraste, a enzima GSN na linhagem *cr-1* permaneceu desfosforilada ao longo do experimento e não apresentou a inativação observada na linhagem WT no tempo de 48 horas. Além disso, a razão de atividade no mutante *mcb* foi extremamente reduzida em todos os tempos analisados, correlacionando com uma forma da enzima altamente fosforilada.

6- Análise da expressão do gene *gsn* em linhagens deficientes na via de AMP cíclico

Para determinarmos se alterações na via de sinalização mediada por AMP cíclico poderiam afetar o perfil de expressão do gene *gsn* durante condições de crescimento normal, efetuamos uma análise de "Northern blot" para avaliarmos os níveis de transcrito *gsn* durante o crescimento vegetativo das linhagens *crisp-1* e *mcb*. A figura 17 mostra o resultado obtido da análise de "Northern blot". Apenas um transcrito de aproximadamente 3,0 kb foi observado, o qual corresponde ao tamanho esperado do mRNA da glicogênio sintase. Comparação entre as linhagens WT, *crisp-1* e *mcb* demonstrou que uma alteração considerável nos níveis do transcrito *gsn* pôde ser observada entre as linhagens. A linhagem WT apresentou variações na expressão ao longo do crescimento, demonstrando que o gene *gsn* foi induzido em determinados momentos de crescimento, confirmando resultados já descritos [65]. Os níveis do transcrito *gsn* foram reduzidos e basicamente constantes na linhagem *mcb* quando comparados às linhagens *cr-1* e WT. Finalmente, na linhagem *cr-1* os níveis de expressão também foram aproximadamente constantes e em alguns períodos, superiores aos níveis observados nas linhagens WT e *mcb*. Estes resultados sugerem que a via de AMP cíclico possivelmente está envolvida no controle da expressão do gene *gsn*.

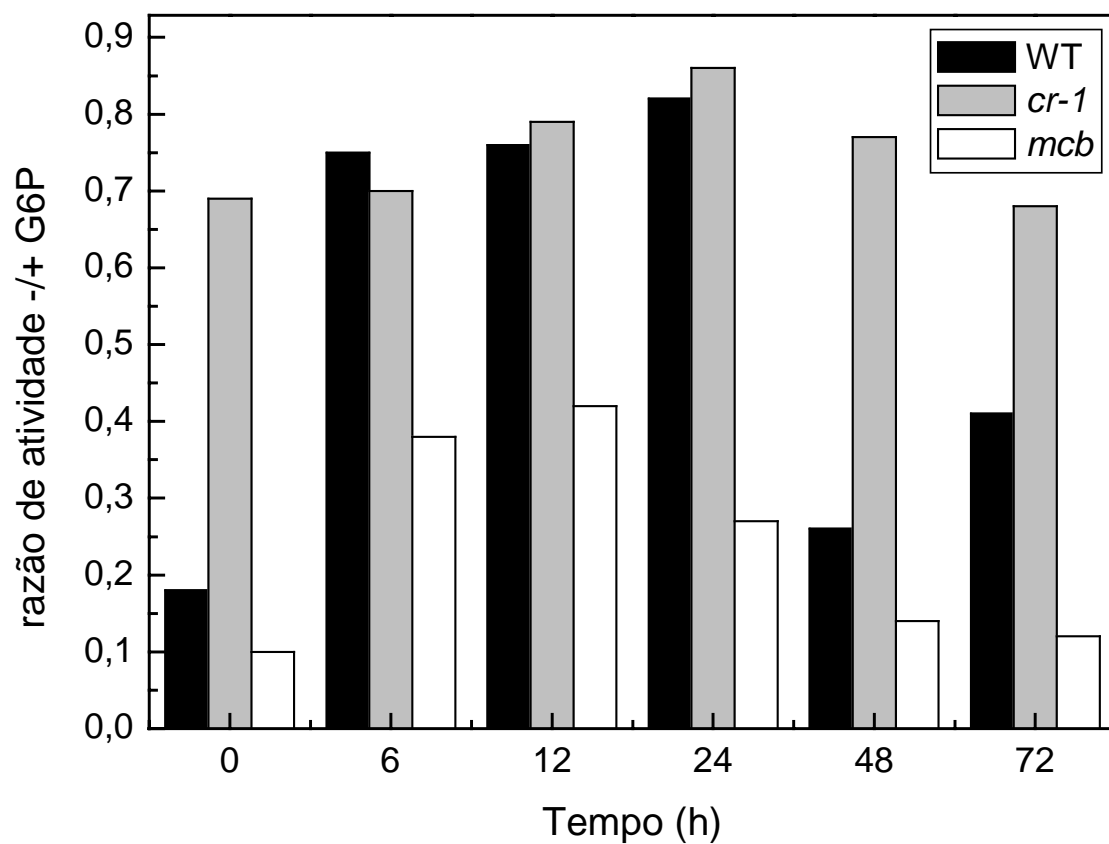


Figura 16- Determinação do índice de fosforilação da enzima GSN em mutantes da via de AMP cíclico. A atividade glicogênio sintase (na ausência e presença de glicose-6-fosfato) foi medida nas linhagens WT, *cr-1* e *mcb*, durante o crescimento vegetativo como descrito em Materiais e Métodos. A razão de atividade foi expressa como o valor da atividade na ausência de G6P por aquela na presença do modulador.

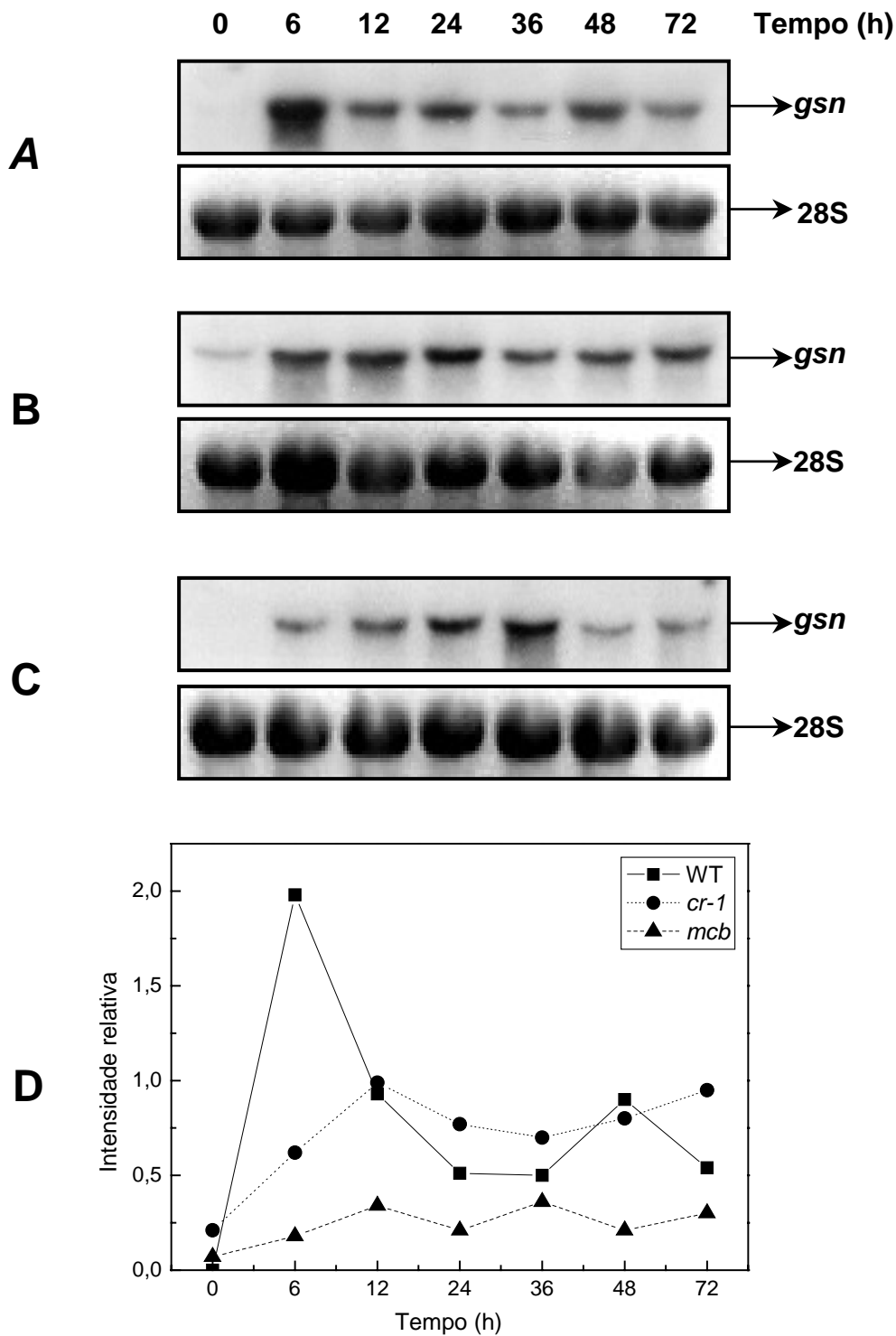


Figura 17- Análise da expressão do gene *gsn* durante crescimento vegetativo nas linhagens WT, *crisp-1* e *mcb*. Análise de “Northern blot” foi realizada com RNA total extraído a partir das diferentes linhagens durante crescimento vegetativo em culturas líquidas. **A-** WT, **B-** *crisp-1*, **C-** *mcb*, **D-** Análise densitométrica da abundância relativa dos transcritos. Todas as amostras foram processadas simultaneamente. O rRNA 28S representa a normalização das quantidades de RNA total aplicadas.

RESULTADOS
PARTE 2

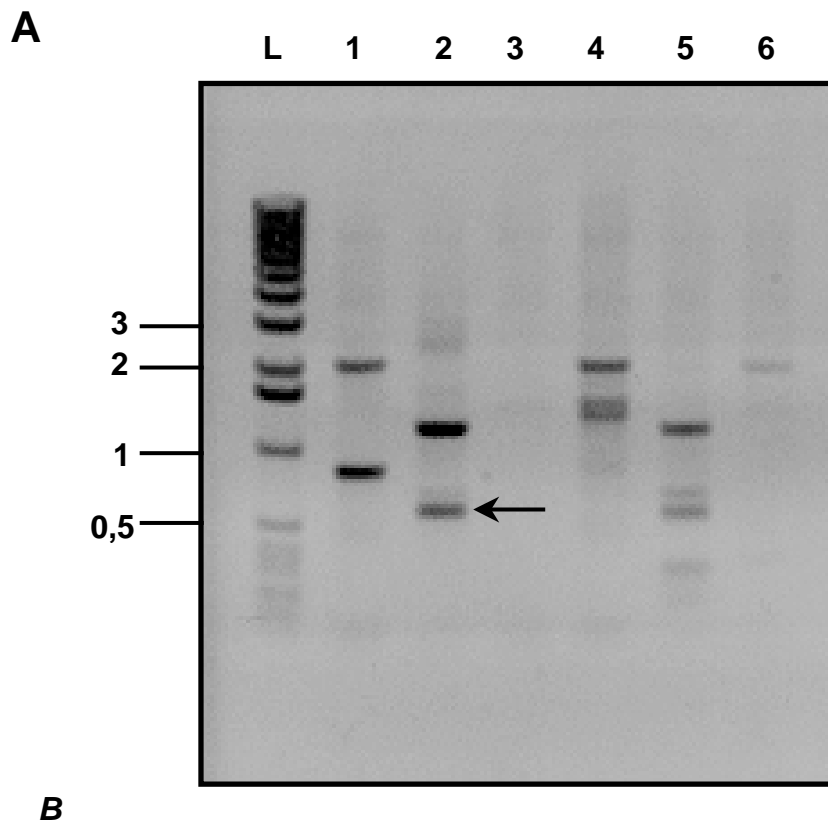
1- Clonagem molecular do cDNA da glicogênio sintase quinase-3 (NcGSK) de *N. crassa*

Com o objetivo de analisarmos o papel da enzima glicogênio sintase quinase-3 de *N. crassa* no metabolismo de glicogênio do fungo, a seqüência de cDNA que codifica para esta enzima foi isolada.

Para isso, utilizamos uma estratégia baseada na amplificação de fragmentos de DNA a partir da biblioteca plasmidial YpADE5 usando oligonucleotídeos degenerados desenhados a partir de seqüências conservadas entre glicogênio sintase quinases de diferente organismos. Cinco oligonucleotídeos foram desenhados e diferentes combinações de "primers" foram utilizados nas reações de amplificação. A figura 18 mostra o resultado da eletroforese em gel de agarose 0,8% dos produtos amplificados por PCR usando as diversas combinações de "primers" e uma tabela contendo o tamanho dos fragmentos esperados.

Fragmentos de tamanho esperado foram obtidos em 2 reações utilizando os "primers" NcGSK1F/2R (609 bp, linha 2 da fig. 18A) e NcGSK-2F/2R (321 bp, linha 5 da fig. 18A). O fragmento de 609 bp foi purificado do gel, subclonado no vetor pBluescript e sequenciado usando "primers" que hibridizam no vetor e os "primers" usados na amplificação. A análise da seqüência demonstrou alta similaridade com enzimas GSK-3 de diversos organismos. Este fragmento foi, então, usado como sonda em experimentos de rastreamento da biblioteca λ AD5-Nc. Três clones positivos foram isolados a partir de $2,7 \times 10^7$ placas de lise após três ciclos de hibridização. Os bacteriófagos positivos foram usados para a infecção da linhagem de *E. coli* BNN132, a qual efetua a excisão plasmidial a partir do DNA do fago. As colônias bacterianas obtidas foram crescidas e o DNA plasmidial foi isolado a partir delas. Digestão enzimática dos plasmídeos com as enzimas *Bam*HI e *Kpn*I liberou insertos únicos sendo que o maior deles possuiu um tamanho aproximado de 2,5 kb (dados não mostrado). Esse clone foi selecionado para o sequenciamento. O inserto de cDNA foi sequenciado, em ambas as fitas, a montagem da seqüência foi feita pelo pacote de programas Phred-Phrap-Consed e a seqüência final foi analisada por alinhamento à outras enzimas GSK-3.

A seqüência do cDNA obtido (*Ncgs*k) possuiu 2.605 nucleotídeos e mostrou uma ORF de 1.185 bases, a qual codifica para uma proteína de 394 aminoácidos com Peso Molecular e *pI* calculados de 45,1 kDa e 8,9, respectivamente. A Figura 19 mostra a seqüência do cDNA obtida assim como a seqüência de aminoácidos deduzida. As regiões 5'- e 3'-UTR apresentam 497 e 821 pares de base, respectivamente. Uma cadeia de poli-adenilatos, contendo 22 poliadeninas está presente no final da região 3'-UTR e um possível sinal de poliadenilação (ATTAAG) foi encontrado 22 bp "upstream" ao poli-A.



Reação	“primers”	Tamanho esperado (bp)
1	NcGSK-1F/ NcGSK-1R	423
2	NcGSK-1F/ NcGSK-2R	609
3	NcGSK-1F/ NcGSK-3R	623
4	NcGSK-2F/ NcGSK-1R	135
5	NcGSK-2F/ NcGSK-2R	321
6	NcGSK-2F/ NcGSK-3R	348

Figura 18- Amplificação de fragmentos da GSK-3 de *N. crassa*. Seis combinações de oligonucleotídeos degenerados foram usadas para amplificar fragmentos de DNA da GSK-3 a partir da biblioteca plasmidial YpADE5-Nc. **A** - Eletroforese em gel de agarose 0,8% dos fragmentos de DNA amplificados (L, Ladder 1 kb). **B** - Combinações de oligonucleotídeos utilizadas e tamanhos dos fragmentos esperados. A seta indica o fragmento usado como sonda nas etapas subsequentes.

1 ACAGTCGAGACAAGCGACAGACCCCTCCAGTCAGTCCACAGTCACGGTCAC
 52 AGTTCATACCGCACCTGACGCACTACCATCGCCCAGCCCTGGCGCACCTTG
 103 CCGCATTCCGCGTCCATTAACCGTACCTCTTCTACTGCTTGACAGCTCGAG
 154 ACAACCCCCCGCAAACAACAAAAAATACCCCAAAGCCATCACCAGCTCC
 205 AGAGCTGCTGCTACGGACTCAAGTACAATATAGCACAACGCTTTACGCATC
 356 ACGTCGCGCCGCCTCGCATCCTGCTTCCATTTCAAACGAACAGGGAACATC
 407 ACTGCTGCATCCAGGCCCGACGTCAAGCCCATCAGCCGTGAACCCAGTTGC
 458 CCCGTCTCCACACAACCTGTTGCCAACACGGCCCGCATCAATCCTTCAGC
 509 GACCTTCCTTCACTCGCGCATCGCTGCCACCAACTCCGTGACGAATACCT
 560 CGAGCGATAGCACCGAATCGATCTAAACTTAATT CACAATGGCGTCGAACC
 1 M A S N R

611 GCCCAGCGGCTTTCAACACCCTCCGGATGGGAGAAGTGATCCGTGAGAAGG
 6 P A A F N T L R M G E V I R E K V

662 TACAAGACGGCGTTACAGGAGAGACGCGGGAGATCCAGTACACCCAATGCA
 23 Q D G V T G E T R E I Q Y T Q C K

713 AGATTGTCGGCAATGGCTCGTTTGGTGTGCTCTTCCAGACCAAGCTGTCAC
 40 I V G N G S F G V V F Q T K L S P

764 CTTCCAATGAAGATGCCGCCATCAAGCGCGTTCTCCAGGACAAGCGCTTCA
 57 S N E D A A I K R V L Q D K R F K

815 AGAACCGCGAACTTCAAATTATGCGGATTGTTGCGCACCCCAATATTGTCC
 74 N R E L Q I M R I V R H P N I V Q

866 AGCTCAAGGCCTTCTACTACTCGAACGGCGAACGTAAAGATGAGGTGTACC
 91 L K A F Y Y S N G E R K D E V Y L

917 TCAACCTGGTGCAAGAGTTTGTTCAGAGACCGTTTACCGAGCCTCGAGGT
 108 N L V Q E F V P E T V Y R A S R F

968 TCTTCAACAAGATGAAGACCACCATGCCCATCTTGGAAGTCAAGCTGTACA
 125 F N K M K T T M P I L E V K L Y T

1019 CCTACCAGCTATTTCAGGGCTTTGGCATATATCCACTCGCAAGGAATTTGCC
 142 Y Q L F R A L A Y I H S Q G I C H

1070 ATCGCGACATCAAGCCGCAGAACCTCCTGCTTGACCCTACTACCGGTGTCC
 159 R D I K P Q N L L L D P T T G V L

1121 TCAAGCTGTGCGACTTTGGCAGCGCAAAGATTCTGGTGGAGAACGAGCCCA
 176 K L C D F G S A K I L V E N E P N

1172 ATGTGTCCTATATCTGCTCGCGGTATTACCGTGCACCTGAATTGATCTTCG
 193 V S Y I C S R Y Y R A P E L I F G

1223 GTGCTACCAATTACACGACCAAGATCGATGTCTGGTCTACTGGATGCGTAA
 210 A T N Y T T K I D V W S T G C V M

1274 TGGCCGAGCTCATGCTTGGGCAGCCCCTCTTCCCTGGCGAGTCTGGCATTG
 227 A E L M L G Q P L F P G E S G I D

1325 ACCAGCTGGTGGAGATCATCAAGGTCCTCGGAACACCTACTCGGGAGCAGA
 244 Q L V E I I K V L G T P T R E Q I

1376 TTCGAACCATGAACCCGAACTACATGGAACACAAGTTTCCTCAGATCAAGC
 261 R T M N P N Y M E H K F P Q I K P

1427 CTCATCCGTTCAACAAGGTTTTTAAGAAGGCCGACGCTGATGCTATCGACC
 278 H P F N K V F K K A D A D A I D L

1478 TCATCGCCCCTCTTCTTGAGTATAACCCACCCGAGCGTCTGGCGGCGATTG
 295 I A R L L E Y T P T E R L A A I D

1530 ATGCCATGGTCCATCCCTTCTTCGATGAACTCCGGGACCCAGTACCAGAC
 312 A M V H P F F D E L R D P S T R L

1581 TTCCCGACTCGAGGCACAACCTCTGGAACCGTTAGGGATCTGCCACCGCTCT
 329 P D S R H N S G T V R D L P P L F

1632 TTGACTTTACCCGTCATGAGCTATCCATCGCCCCTCAGCTCAACCACAAGC
 346 D F T R H E L S I A P Q L N H K L

1683 TTGTTCCCTTCGCACATGAGGCCGGTTCTCGCGTCGAAAGGACTCGATATCG
 363 V P S H M R P V L A S K G L D I D

1734 ACAACTTCACTCCTATGAACAAGTCGGAGATGATGGCCAAGTTAGACTGAA
 380 N F T P M N K S E M M A K L D *

1785 GCTGATGTCGTTTCGATACTCAATGTGCGCGATCCATTCCCGAAATATGAA
 1836 CGTGGACGATATGCGCTGTGATTCCCGAATAGCAGAGCGTTGCCTAAGATT
 1887 TCGAAGCAAGCGGTTTGACTCGCCGATCCGATTATGACCCAAAAAACCAGAA
 1938 GAACGGATTATTTCTGCGTCCACCTGGACGAAACGAAAGCGATTTTCAGATC
 1989 ACGGCCTAAACCGACGCACAGATACCCCTCATCACAAGTGCGCTGGATCAA
 2040 CCGTGCAAAAATTCGTGCCGGCCTGGAGGCCGAGAAGAGCCCGGGACAGCC
 2091 AAGAACGTCTCCGAGCAACTTCCCTCAGCGAAAGGGACTGGTTACAAATT
 2142 GCTTGGTTTCATGGGAGGATACTCTCGAGACATGTTATGGGCTACACGTAT
 2193 TTTTTTTTCTAGATTTCTTATTTTTTCTGCATGACCGGGATGGCTTTTGGTT
 2244 ATTCTTGCCCTCAACCCTTTCGTTTCAGCAGGAGCGCTTTTTTATTTCCCGTGGC
 2295 AGGGGTCCCCAAAATGAAAGGCGAAAGGCGGTAGGCTGGAAAAACTTTGTT
 2346 TGCTTTGGGGGACCTCGTCCGACACTGGCCCCTGGCCAAGTCGTTTTTGGTT
 2397 TTAAGGGAAAAATGGAAGGAAAAATGGGGGGCATCAATGATATGATGGATT
 2448 ATGGCAAAAAGGGTACCAGTGTTGGAGTGGGTAATAGGTTAGGGAGTGGTA
 2499 AATGGATGTGGGGCATTGGGTGTTGTAAGGCTTTGCCTGCTATAACGAGT

2550 GTCACCGAGGTT**TATTTAAA**AGGATGGGTGGTCCCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
2601 AAAAA

Figura 19- Sequência nucleotídica e sequência de aminoácidos, deduzida a partir do cDNA da glicogênio sintase quinase-3 de *N. crassa*. As sequência em negrito e sublinhada na região N-terminal representa a sequência "consensus" de Kozak e a sequência sublinhada na região 3'-UTR representa o possível sinal de poliadenilação.

Uma sequência "consensus" (CACAAATGGC) correspondendo à sequência Kozak, envolvida no controle de tradução de mRNA [120] foi encontrado ao redor do codon (ATG) codificando para a metionina inicial. Comparação entre as sequências gênica (obtida a partir do banco de dados) e de cDNA demonstrou que o gene é interrompido por 5 íntrons, os quais possuem tamanhos de 66, 60, 60, 67 e 72, respectivamente. Todas as regiões intrônicas apresentam as sequências características para doadores e receptores.

O alinhamento de sequência de aminoácidos entre a proteína NcGSK e seus correspondentes ortólogos em diferentes organismos (figura 20) demonstrou que NcGSK apresenta 66% de identidade com a GSK3 (isoforma α) de humanos (78% considerando trocas conservativas) e 60% de identidade com a isoforma β de humanos. Também mostrou 67% de identidade com a proteína de *C. elegans* e 68% com o produto do gene *skp1* de *S. pombe*. Portanto, de uma maneira geral, essa proteína é bastante conservada do ponto de vista evolutivo.

2- Inativação do gene *Ncgsk* por RIP

Para determinarmos os possíveis papéis da enzima glicogênio sintase quinase-3 no metabolismo de glicogênio em *N. crassa*, assim como seu envolvimento em outras funções celulares, efetuamos a inativação do gene *Ncgsk* por RIP. A cópia genômica do gene *Ncgsk* correspondente a ORF e todos os íntrons foi amplificada por PCR, subclonada no vetor pMSN1 e usada para transformar células da linhagem FGSC 3957. Dezoito clones transformantes foram selecionados e o evento de integração ectópica da construção pMSN1-*Ncgsk* foi detectado nestes clones através de análise de DNA genômico por "Southern blot". Três clones apresentaram cópias adicionais do gene *Ncgsk* integrados aos seus genomas (dados não mostrados). Os três clones foram cruzados com a linhagem FGSC#2226 e a progênie foi isolada após 15 dias de cruzamento. Clones individuais foram inoculados separadamente em tubos de ensaio contendo meio VM e diferenças morfológicas foram observadas entre alguns clones escolhidos após três dias de crescimento. De um modo geral, estes clones cresceram muito lentamente, com formação de poucas hifas e apresentaram um processo de conidiação precoce. A figura 21 mostra uma comparação entre a linhagem selvagem e alguns clones apresentando alterações morfológicas.

Uma análise do DNA genômico de alguns clones, apresentando ou não alterações morfológicas foi efetuado por "Southern blot". O DNA dos clones foi digerido com a enzima de

[120] Bruchez, J. J. P.; Eberle, J and Russo, V. E. A. (1993) Regulatory sequences involved in the translation of *Neurospora crassa* mRNA: Kozak sequences and stop codons. *Fungal Genet. Newslett.* 40:

NcGSK 1 -----
 hGSK- α 1 MSGGGPSGGGPGGSGRARTSSFAEPGGGGGGGGGGPSSASGPGGTGGGKASVGAMGGGV
 hGSK- β 1 -----
 D.disc 1 -----MSSKD
 Mrk1 1 -----
 C.eleg 1 -----

NcGSK 1 -----MASNRPAAFN^{*}ILRMGEVIREKVVQDGVGTGETREIQ
 hGSK- α 61 GASSSGGGPSSGGGSGGPGAGT^{*}SFPPPGVKLGRD^{*}SGKVTTVVA--TLGQGPERSQEVA
 hGSK- β 1 ---MSGRPRTTSFAESCKPVQQPSAFGSMKVS^{*}RDKD^{*}SGKVTTVVA--TPGQGPDRPQEV^{*}S
 D.disc 6 QILEKDKKETDDNGNKKTTTTTSSSSSSSSSSSK^{*}PRSNKFDKVI-----IKSNGVC
 Mrk1 1 -----MGITLY^{*}TNIGLVHKRVYKHDK^{*}KTDV-----DRKNHGGTIDIS
 C.eleg 1 -----MNRMRRS^{*}TAFSE^{*}HVTFHTVMAKRG^{*}TGSKLDREVEIQ

NcGSK 35 Y^{*}TQCKIVGNGSFGVV^{*}FQTKLSPSNEDA^{*}AIKRVLQDKR^{*}FKNRELQIMR^{*}IVRHPNIVQLKAF
 hGSK- α 119 YTDIKVIGNGSFGVVYQARLAETRELVAIKKVLQDKR^{*}FKNRELQIMR^{*}KLDHCNIVRLRYF
 hGSK- β 56 YTDTKVIGNGSFGVVYQAKLCDSGELVAIKKVLQDKR^{*}FKNRELQIMR^{*}KLDHCNIVRLRYF
 D.disc 57 YITEGVIGNGSFGVVTQAI^{*}VADTKEVVAIKKVLQD^{*}QRYKNRELQIMKMLHNINIVSLKNS
 Mrk1 38 YPTTEVVGHSFGVVVTTVLIETN^{*}QKVAIKKVLQD^{*}RRYKNRELETMKMLCHPNITVGLQYY
 C.eleg 37 FTNLQ^{*}LIGTGSFGAVYKAVLRENDEPTA^{*}IKKIKVDDRFK^{*}SRELTIMHEMDHPNIRLLYY

NcGSK 95 YYSNGERKDEVYLN^{*}LVQEFVPE^{*}TVYRASREFN^{*}KMKTTMP^{*}ILEVKLYTYQLFRALAYIHSQ
 hGSK- α 179 FYSSGEKKDELYLN^{*}LVLEYVPE^{*}TVYRVARHFTKAKLT^{*}IPILYVKVYMYQLFRSLAYIHSQ
 hGSK- β 116 FYSSGEKKDEVYLN^{*}LVLDYVPE^{*}TVYRVARHYSRAK^{*}QTL^{*}PVIYVKLYMYQLFRSLAYIHSF
 D.disc 117 FYTS--DNDEVYLN^{*}LVLEYV^{*}PD^{*}TVYRVSRHYSMSK^{*}QPV^{*}PNIFVKLYTYQLCRSINYIHSL
 Mrk1 98 FYEK--DEEDEVYLN^{*}LVLDYMP^{*}QSLYQRLRHFV^{*}NLKM^{*}QMPRVEIKFYAYQLFKALNYLHN^{*}V
 C.eleg 97 YV---M-QQENCLN^{*}FVMEFMPKDLAYVHR^{*}QFAHNDK^{*}QMPAYS^{*}IKLYMFQLLRGIGFHLH

NcGSK 155 G-^{*}ICHRDIKPQNLLDPT^{*}TCVLKLCDFGSAK^{*}ILVENEPN^{*}VS^{*}YICSRYYRAPELIFGATNY
 hGSK- α 239 G-V^{*}ICHRDIKPQNLLVDP^{*}TAVLKLCDFGSAK^{*}QLVRGEPN^{*}VS^{*}YICSRYYRAPELIFGATDY
 hGSK- β 176 G-^{*}ICHRDIKPQNLLD^{*}PD^{*}TAVLKLCDFGSAK^{*}QLVRGEPN^{*}VS^{*}YICSRYYRAPELIFGATDY
 D.disc 175 G-^{*}ICHRDIKPQNLLD^{*}ST^{*}STL^{*}KLCDFGSAK^{*}ILIKGETN^{*}VS^{*}YICSRHYRAPELIFGSTNY
 Mrk1 157 PRICHRDIKPQNLLVDP^{*}TF^{*}SFKICDFGSAK^{*}CLKPD^{*}QPN^{*}VS^{*}YICSRYYRAPELMFGATNY
 C.eleg 153 N-^{*}IVHRDIKPKNLLVDES^{*}NGILKICDFGSAK^{*}RLEKNEPN^{*}ITYICSRYYRAPELIFGSKNY

NcGSK 214 TTKIDVWSTGCVMAELMLGQPLFPGESGIDQLVEI^{*}IKVLGTP^{*}TREQIR^{*}TMNPNYMEHKFP
 hGSK- α 298 TSSIDVWSAGCVLAELLGQPIFPGDSGVDQLVEI^{*}IKVLGTP^{*}TREQIREMNPNYTEFKFP
 hGSK- β 235 TSSIDVWSAGCVLAELLGQPIFPGDSGVDQLVEI^{*}IKVLGTP^{*}TREQIREMNPNYTEFKFP
 D.disc 234 TTTIDVWSLGCVLAELLGQPLFPGENGIDQLVEI^{*}IKVLGTP^{*}TKEQIHAMNPYYTSFKFP
 Mrk1 217 SNQVDVWSSAGCVLAELLGKPLFSGESGIDQLVEI^{*}IKIMG^{*}IP^{*}TKDEISGMNPNYEDHVF^{*}P
 C.eleg 212 DTSIDTWSVGT^{*}VVGELLHNSP^{*}IFLADSAVDLALQIKAF^{*}GTPSKEDMAKWN^{*}YEVVHIPYD

NcGSK 274 QIKPH^{*}PFNKVF-KKAD--ADAIDL^{*}IARLLEYTP^{*}TERIAAIDAMVHPFFDEL^{*}RDPS^{*}TRLPD
 hGSK- α 358 QIKAHPWTKVF-KSRT-PPEAIALCS^{*}SLLEYTP^{*}SSR^{*}LSPLEACAHSFFDEL^{*}RCLGTQLPN
 hGSK- β 295 QIKAHPWTKVF-RPRT-PPEAIALCS^{*}RLLLEYTP^{*}TARLT^{*}P^{*}LEACAHSFFDEL^{*}RDPNVKLPN
 D.disc 294 EIKANPWP^{*}RVF-KAKDVPAESID^{*}LISKILLYDP^{*}SSRLK^{*}PVEICAHPFFDEL^{*}RDPKTCLPD
 Mrk1 277 NIKPITLAEIF-KAED--PDTL^{*}DLTK^{*}TKYHP^{*}CERLV^{*}PLQ^{*}LLSSYFDETK^{*}RCDTID---
 C.eleg 272 TITGVGIQKFIGR^{*}KLSL--STLELL^{*}NSLMKMDPK^{*}LRIK^{*}PYEAL^{*}TL^{*}PHYFDDLRDPHYK---

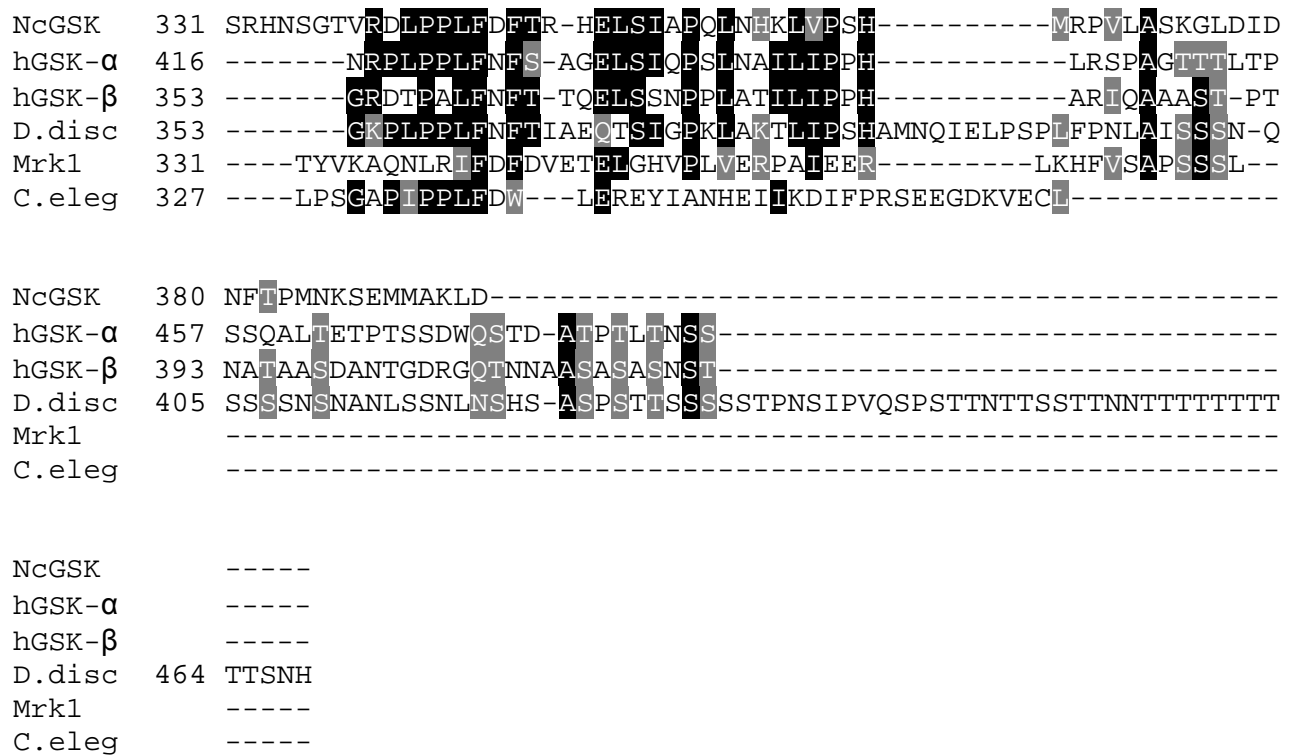


Figura 20- Multi-alinhamento de seqüências de aminoácidos da glicogênio sintase quinase-3 de *N. crassa* (NcGSK) com outras GSKs: NcGSK – *N. crassa*, hGSK- α e h-GSK- β – isoformas α e β de humanos, respectivamente, D. disc. – *Dyctiostelium discoideum*, Mrk1 – uma das isoformas GSK de *S. cerevisiae*, C. eleg – *Caenorhabditis elegans*. As identidades são representadas pelos “boxes” em preto e as trocas conservativas são representadas em cinza. Os asteriscos representam os aminoácidos que foram trocados pelo processo de RIP, descrito na página 95.

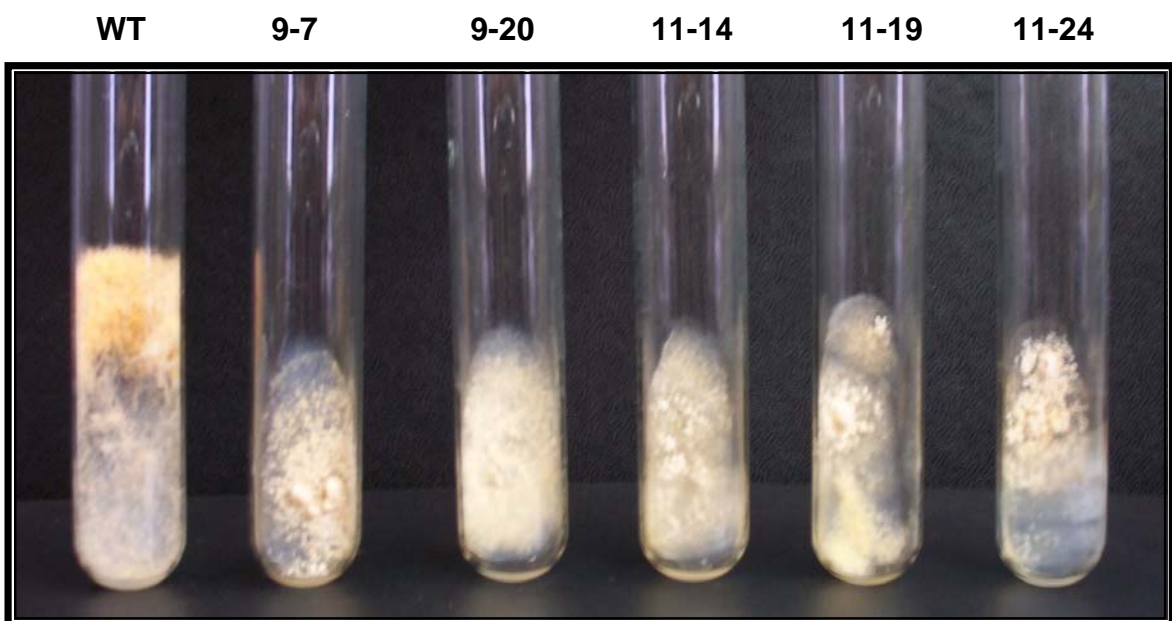


Figura 21- Alterações morfológicas dos mutantes no gene *Ncgsk* em *N. crassa*. Células foram crescidas em tubos contendo 1mL de meio VM, 2% de sacarose e 2% de ágar. As células foram crescidas por 5 dias, à temperatura ambiente.

restrição *Mbol*, separados por eletroforese em gel de agarose 1%, transferidos para membrana e hibridizados com o cDNA *Ncgsk*, marcado radiativamente. Cinco clones (9-7, 9-20, 11-14, 11-19 e 11-24) apresentaram alterações no perfil de restrição, indicando que o processo de RIP ocorreu nessas linhagens (dados não mostrados). Dessa forma, as sequências genômicas (ORF e introns) correspondendo do gene *Ncgsk* foram amplificadas a partir do DNA genômico de quatro linhagens (9-7, 9-20, 11-14 e 11-24), subclonadas e sequenciadas para a identificação das mutações. Não foi possível amplificar a sequência gênica a partir do DNA genômico da linhagem 11-19.

O sequenciamento dos clones mutantes demonstrou que todos os clones apresentaram poucas mutações, algumas delas dentro de sequências de íntrons. A tabela abaixo mostra as mutações obtidas do processo de RIP nos quatro mutantes analisados. Um clone (9-7) apresentou o maior número de mutações (5) e foi escolhida para análises adicionais de microscopia.

<i>Clone</i>	Mutações na sequência codificadora	Mutações em introns
9-7	His ⁸⁵ →Tyr, Thr ²⁵⁴ →Ala, Ala ²⁸⁷ →Val	2- íntron II
9-20	Val ¹¹⁸ →Ile, Ser ¹⁸² →Asn	1- íntron I
11-14	Ser ⁵⁵ →Leu, Leu ²³² →Phe	-
11-24	Pro ¹⁷⁰ →Ser	1- íntron I

3- Análise do mutante *Ncgsk^{rip}*

3.1-Determinação da taxa de crescimento

A determinação da velocidade de crescimento da linhagem *Ncgsk^{rip}* foi determinada pelo crescimento das células em "race tubes". Brevemente, as células foram inoculadas em uma extremidade do tubo e mantidas a temperatura ambiente, no escuro, por 1 dia. Após este período, o "front" de crescimento foi marcado periodicamente, dia a dia até o mesmo atingir a outra extremidade do tubo. A distância de crescimento foi medida e expressa em função dos dias de crescimento. Os experimentos foram realizados em duplicata. A figura 22 demonstra as taxas de crescimento da linhagem *Ncgsk^{rip}* comparada àquelas observadas para a linhagem WT. Os resultados mostraram claramente que o desenvolvimento e crescimento na linhagem *Ncgsk^{rip}* foi bastante afetado e após seis dias a taxa de crescimento da linhagem mutante foi

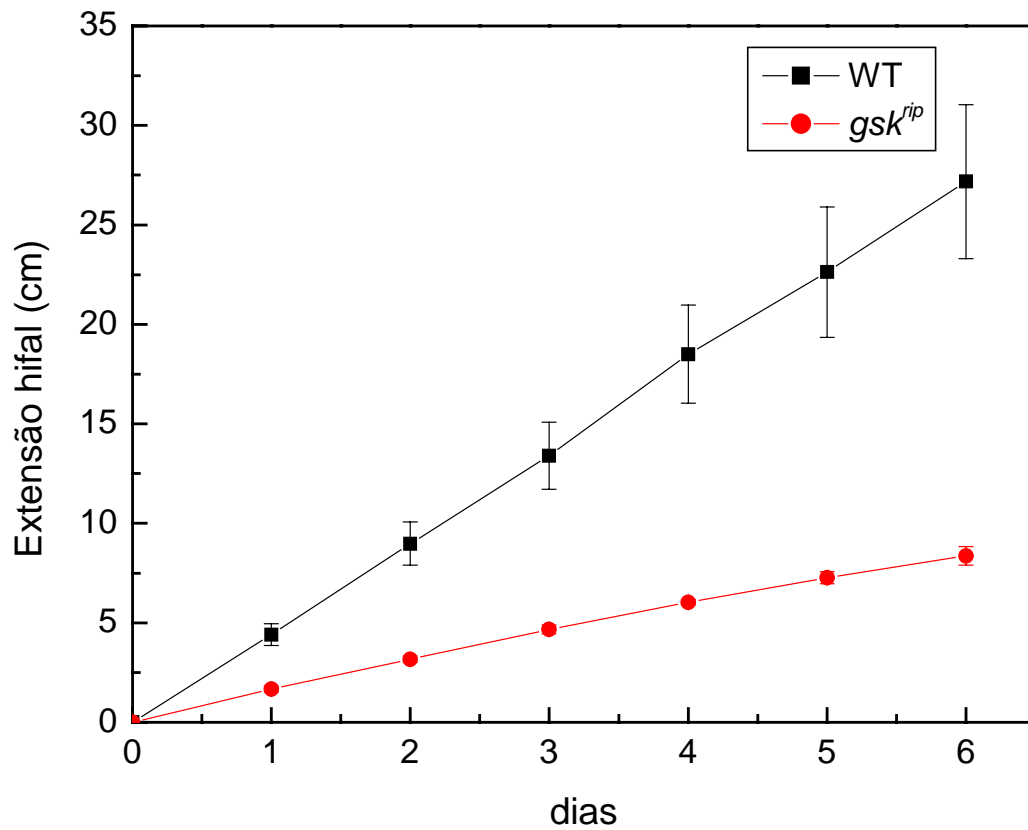


Figura 22- Determinação da velocidade de crescimento da linhagem mutante *gsk^{rip}*. As células foram inoculadas em uma das extremidades de “races tubes”, e a velocidade de crescimento foi medida através da marcação da frente micelial, diariamente.

correspondente a 25% daquele observado na linhagem selvagem. Isso indicou que a proteína NcGSK possui um importante papel no crescimento normal do fungo *N. crassa*.

Uma análise preliminar da atividade glicogênio sintase assim como do conteúdo de glicogênio na linhagem mutante *Ncgs^{krip}* não demonstrou alterações quando comparadas a linhagem selvagem (dados não mostrados).

3.2- Análise morfológica

Uma análise morfológica foi efetuada a partir de células das linhagens selvagem e *Ncgs^{krip}* crescidas em meio líquido, por diferentes períodos de tempo. A figura 23 mostra os resultados obtidos. Em geral, no tempo de inoculação (T=0hs) nenhuma diferença entre as células na forma conidial pode ser observada. A linhagem selvagem apresentou formação de hifas já nas primeiras 4 horas de crescimento e este processo prosseguiu com a formação de uma complexa rede de hifas entrelaçadas ao longo do experimento. Na linhagem *Ncgs^{krip}* o início da formação de hifas foi atrasado, iniciando-se após 8 horas de crescimento. Além disso, as hifas apresentaram significantes constrições dos septos, levando em alguns casos ao estrangulamento da hifa e liberação de conídios. Após 48 horas foi possível observar a formação de conidióforos. Estes resultados mostraram claramente que a linhagem mutante *Ncgs^{krip}* apresentou o processo de conidiação, mesmo em culturas submersas.

4- Produção da proteína NcGSK recombinante em *E. coli*

A proteína NcGSK foi produzida na forma recombinante, fusionada à proteína GST em células de *E. coli*. Culturas de 500 mL de células foram usadas na indução e subsequente purificação da proteína recombinante por cromatografia de afinidade em colunas de glutathione sepharose 4B. A figura 24 mostra as etapas de purificação da proteína recombinante GST-NcGSK. Como pode ser visto, a maior parte da proteína foi expressa na forma insolúvel, embora uma fração considerável da proteína recombinante tenha permanecido na fração solúvel. Podemos também observar uma pequena porção da proteína na fração correspondendo ao filtrado o que indica que a ligação da proteína à coluna não foi totalmente eficiente. A proteína eluída em uma concentração de 10 mM de glutathione reduzida, foi obtida em uma forma relativamente pura e apenas um espécie contaminante com PM abaixo de 70 kDa foi observado. Análises por "Western blot" usando anticorpos anti-GST demonstraram que essa espécie foi imunoreativa e, portanto possivelmente trata-se de uma forma da proteína proteolisada na região C-terminal. A proteína recombinante foi então utilizada nos ensaios funcionais de fosforilação da proteína INc-1 de *N. crassa*.

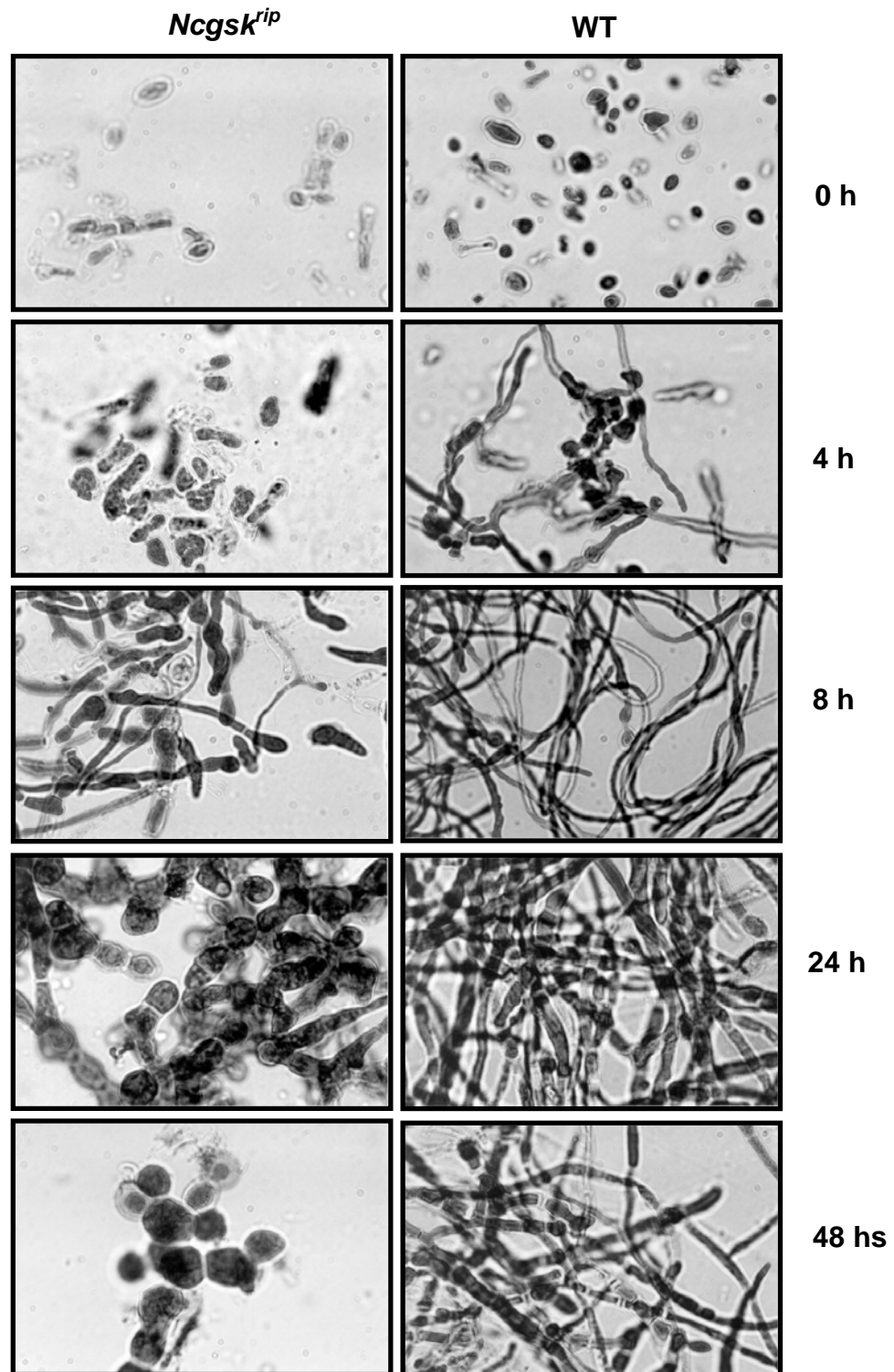


Figura 23- Microscopia ótica da linhagem WT e *Ncgsk^{rip}* durante crescimento vegetativo em culturas líquidas. Amostras celulares foram retiradas nos tempos indicados, coradas com azul de lactofenol e analisadas microscopicamente (aumento de 100X).

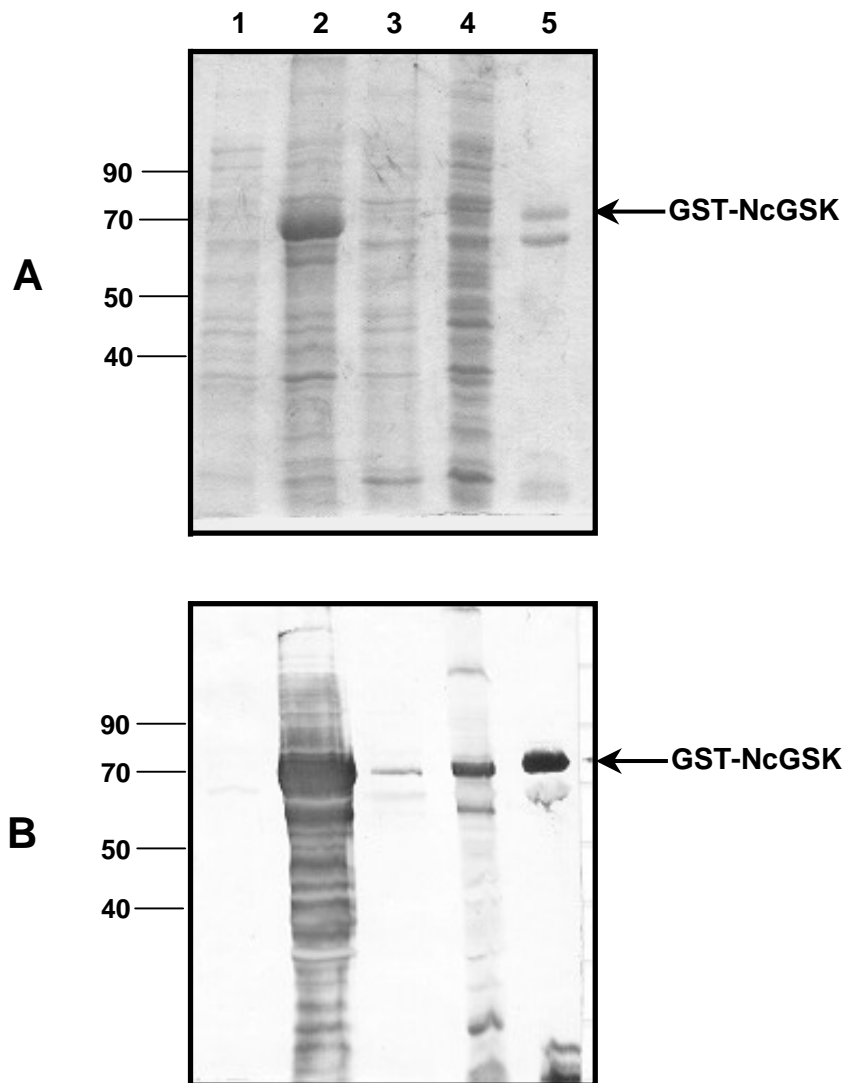


Figura 24- Etapas de purificação da proteína GST-NcGSK recombinante produzida em *E. coli*. O extrato celular de uma cultura de 500 mL foi submetido à cromatografia de afinidade em coluna de glutationa sepharose 4B (GST-Trap) em um aparelho de purificação Äkta Prime (Amersham). **A-** SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 12%, **B-** “Western blot” usando anticorpo anti-GST (diluição 1:2000). **1-** amostra antes da indução com IPTG, **2-** fração do precipitado, **3-** fração do sobrenadante, **4-** fração após passagem pela coluna, **5-** eluato.

5- Ensaio da funcionalidade da proteína GST-NcGSK. Fosforilação do Inibidor-1 de *N. crassa* (INc-1)

A proteína recombinante GST-NcGSK, produzida em células de *E. coli* foi testada quanto a sua funcionalidade através da fosforilação “*in vitro*” da proteína INc-1 de *N. crassa*, a qual corresponde ao inibidor do tipo-2 da proteína fosfatase PP-1. Esta proteína também foi produzida na forma recombinante, em *E. coli*, como uma proteína fusionada a um “tag” de polihistidinas (His6). As reações de fosforilação foram efetuadas na presença de γ -³²P-dATP e os produtos das reações foram analisados por SDS-PAGE. A figura 25 mostra os resultados obtidos neste experimento. Na amostra controle contendo apenas a proteína GST-NcGSK na presença de fosfato radioativo é possível observarmos uma espécie fosforilada correspondendo ao tamanho esperado desta proteína. Isto mostrou que a proteína GST-NcGSK foi capaz de se auto-fosforilar. Numa outra reação controle, onde apenas a proteína INc-1 estava presente, nenhuma incorporação foi observada. Finalmente, quando ambas as proteínas foram incubadas na presença de fosfato radioativo, duas bandas de incorporação foram observadas, as quais corresponderam aos tamanhos exatos de ambas as proteínas. Portanto, a proteína GST-NcGSK além de apresentar auto-fosforilação, também foi capaz de fosforilar a proteína INc-1 de *N. crassa*.

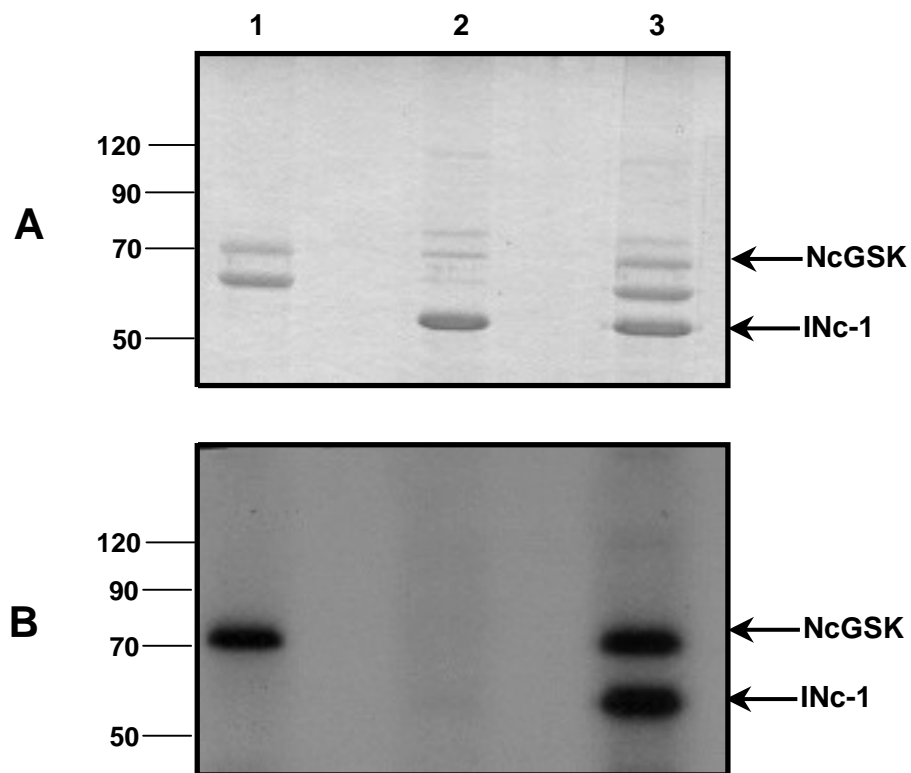


Figura 25- Fosforilação “*in vitro*” da proteína INc-1 por GST-NcGSK. As proteínas recombinantes INc-1 e GST-NcGSK foram incubadas na presença de γ - 32 P-dATP. Posteriormente as proteínas foram separadas por SDS-PAGE, o gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250, descorado, seco e autoradiografado. **A-** Gel de poliacrilamida corado com Coomassie-Blue, **B-** Autoradiografia. **1-** Reação controle contendo apenas a proteína GST-NcGSK, **2-** reação controle contendo apenas a proteína INc-1, **3-** reação de fosforilação na presença de GST-NcGSK e INc-1.

DISCUSSÃO

1- Caracterização dos mecanismos de controle da enzima glicogênio sintase em *N. crassa*.

A clonagem molecular do cDNA codificando para a enzima glicogênio sintase no fungo *N. crassa*, realizada anteriormente em nosso laboratório [65], permitiu que novos estudos enfocando aspectos moleculares e bioquímicos do metabolismo de glicogênio neste modelo pudessem ser realizados. O uso do fungo *N. crassa* têm se mostrado bastante interessante uma vez que o genoma deste organismo modelo foi recentemente determinado e apontou para a presença de um grande número de genes, muitos deles faltando ortólogos em outros organismos. Além disso, a existência de mecanismos de silenciamento genético neste organismo o torna um modelo atrativo na obtenção de mutantes e análises fenotípicas, o que representa uma ferramenta valiosa na identificação de novos genes com funções desconhecidas.

No presente trabalho, iniciamos a caracterização dos mecanismos de fosforilação que controlam a atividade glicogênio sintase e, portanto, definem o acúmulo geral deste carboidrato de reserva. Tais estudos se iniciaram com a inativação do gene *gsn* e conseqüente análise do fenótipo resultante da linhagem mutante. A estratégia utilizada (RIP), o qual se baseia em uma propriedade genética do fungo *N. crassa*, mostrou ser eficiente na inativação deste gene, resultando na introdução de muitas mutações (62 transições G→A) ao longo da seqüência codificadora do gene, sendo uma destas mutações responsável pela inserção de um códon de parada prematuro, na posição 93. A linhagem contendo o gene *gsn* inativo não apresentou atividade glicogênio sintase e os níveis de glicogênio foram extremamente reduzidos, indicando que nenhuma outra isoforma da glicogênio sintase existe no genoma de *N. crassa*. A ausência de qualquer outra deficiência óbvia neste mutante sugere o fato de que glicogênio parece não ser essencial para a fisiologia normal deste organismo, ao menos em condições de laboratório. A linhagem mutante mostrou comportamento normal de crescimento e viabilidade durante uma situação de estresse, demonstrando também que este carboidrato de reserva não é necessário na adaptação das células a situações estressantes. A não essencialidade de glicogênio em microrganismos também foi descrita em células de *S. cerevisiae* [62, 63]. Por outro lado, a deficiência de glicogênio em eucariotos superiores tem sido associada a diferentes doenças (doenças do glicogênio) e um trabalho recente mostrou que camundongos transgênicos contendo o gene da glicogênio sintase de músculo esquelético (isoforma GYS1) nocauteada morreram na primeira semana de vida por deficiência cardíaca [121]. O fenótipo deficiente em glicogênio em *N. crassa* (*gsn^{rip}*) pôde ser completamente revertido pela inserção da cópia

[121] Pederson, B. A.; Chen, H.; Schroeder, J. M.; Shou, W., DePaoli-Roach, A. A.; Roach, P. J. (2004) Abnormal cardiac development in the absence of heart glycogen. *Mol Cell Biol.*16: 7179-87.

genômica do gene *gsn*, embora o mesmo efeito não tenha sido obtido quando somente a ORF, sob o controle de um promotor heterólogo foi introduzido. Isto indicou que possivelmente elementos presentes na região promotora do gene *gsn* possam ser importantes para a expressão normal deste gene. De fato, resultados em nosso laboratório indicaram que a presença de um íntron localizado dentro da região 5'-UTR pode ter um papel no mecanismo de expressão deste gene em condições normais de crescimento [117]. A importância de íntrons na expressão gênica em fungos é conhecida [122]. De qualquer forma, a obtenção da linhagem complementada pela cópia genômica permitirá que estudos adicionais "in vivo" possam ser realizados futuramente.

Posteriormente, a proteína GSN foi produzida na forma recombinante, a qual poderia, se funcional, ser utilizada nos ensaios funcionais destinados à determinação dos sítios de fosforilação regulatórios. Diversos sistemas de expressão, assim como diferentes "tags" fusionados à proteína foram testados, mas todas as tentativas resultaram em uma proteína recombinante, a qual não demonstrou funcionalidade. Apenas uma forma desta proteína, a qual foi truncada em 80 aminoácidos da região C-terminal mostrou uma baixa atividade funcional quando expressa em células em *Picchia pastoris* [123]. A dificuldade de obter uma proteína funcional, em certos aspectos, dificultou nossos estudos com relação à determinação dos resíduos correspondentes aos sítios fosforilados desta enzima e uma nova estratégia foi utilizada para definir uma possível região contendo os sítios regulatórios. Para isso, duas proteínas recombinantes (His6-GSN e His6-GSN Δ 624) foram produzidas e usadas nos ensaios de fosforilação *in vitro* utilizando extratos celulares brutos. De um modo geral, a ligação da proteína His6-GSN à coluna de afinidade foi baixa e o mesmo foi observado quando a proteína foi fusionada a um "tag" de GST. Esta característica, entretanto, não foi observada para a proteína His6-GSN Δ 624, a qual não possui os 80 últimos aminoácidos da região C-terminal. Isso sugeriu a existência de um mecanismo de interação entre as regiões N- e C-terminais. De fato, alguns trabalhos propõem um mecanismo onde a extensão C-terminal apresenta menor constrangimento estrutural e pode regular a atividade da enzima, encobrindo o sítio ativo localizado na região N-terminal [124]. A ausência desta extensão C-terminal na forma truncada da proteína (His6-GSN Δ 624) explicaria a maior afinidade desta durante o processo de purificação.

[122] Xu, J. and Gong, Z. Z. (2003) Intron requirement for APF gene expression in *Trichoderma viride*, *Microbiology* **149**: 3093-3097.

[123] Reis, R. I. (2003) Expressão e Caracterização bioquímica da enzima glicogênio sintase recombinante de *Neurospora crassa*. Dissertação de Mestrado, Instituto de Química – UNESP.

[124] Cohen, P. (1982) The role of protein phosphorylation in neural and hormonal control of cellular activity, *Nature* **296**: 612-620.

Os resultados obtidos nos ensaios de fosforilação "*in vitro*" das proteínas recombinantes com extratos celulares claramente mostraram que a maior parte dos eventos de fosforilação ocorre na extensão de 80 aminoácidos C-terminais, embora uma baixa incorporação de fosfatos foi mostrada ocorrer em outras regiões. Uma análise quantitativa da incorporação por densitometria demonstrou que 30% da incorporação aconteceu fora da região C-terminal. Interessantemente, um único sítio para a proteína quinase dependente de AMP cíclico (PKA) foi localizado na posição entre os aminoácidos 426-429, através de ferramentas de bioinformática. A enzima PKA tem sido amplamente implicada nos mecanismos de controle da atividade da enzima glicogênio sintase de mamíferos em resposta a sinais hormonais [125]. Para analisarmos o papel da via mediada por AMP cíclico no processo de fosforilação global da enzima GSN, realizamos ensaios de fosforilação utilizando o extrato da linhagem *crisp-1*, a qual apresenta deficiência na atividade adenilato ciclase e, portanto, possui baixos níveis de PKA ativa. Estes ensaios demonstraram que a fosforilação da proteína His6-GSN foi grandemente reduzida, sugerindo que a maior parte da fosforilação da enzima GSN são dependentes de AMP cíclico. A fosforilação residual, entretanto, claramente indica que mecanismos independentes de cAMP, envolvidos no controle da atividade GSN por fosforilação, devem existir. Similarmente, a fosforilação na forma truncada His6-GSN Δ 624 também foi observada quando o extrato da linhagem *crisp-1* foi usada, demonstrando que ao menos em parte, os mecanismos que controlam a fosforilação da enzima fora da região C-terminal são independente de cAMP. A determinação de tais mecanismos, assim como a identificação dos resíduos de aminoácidos envolvidos no controle por fosforilação da atividade GS em *N. crassa* requerem estudos adicionais e esforços em nosso laboratório estão sendo feitos para a identificação dos mesmos.

O conteúdo de glicogênio medido na linhagem selvagem, e em linhagens mutantes na via de sinalização de AMP cíclico, demonstrou que na linhagem contendo a via enfraquecida (*crisp-1*), os níveis deste carboidrato foram bastante elevados ao longo do crescimento vegetativo do fungo. Ao contrário, na linhagem apresentando atividade PKA exacerbada (*mcb*), os níveis de glicogênio foram significativamente reduzidos. A análise da atividade GS nestes mutantes durante o crescimento vegetativo demonstrou que a enzima GSN permaneceu praticamente desfosforilada na linhagem *cr-1* (alto índice +/- G6P), e o oposto foi observado na linhagem *mcb*. Estes resultados basicamente concordam com relatos descritos para *S. cerevisiae* [126]. Quando os níveis de expressão do gene *gsn* foram analisados nas linhagens mutantes, variações consideráveis foram observadas. Os níveis do transcrito *gsn* na linhagem

[125] Sheorain, V. S.; Khatra, B. S. and Soderling, T. R. (1982) Hormonal regulation of glycogen synthase phosphorylation in rabbit skeletal muscle, *J. Biol. Chem.* **257**: 3462-3470.

[126] Thevelein, J. M and de Winde, J. H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **35**: 904-918.

cr-1 foram superiores aos observados na linhagem *mcb* durante todo o tempo de crescimento e superiores aos da linhagem WT, em alguns períodos. Além disso, nas linhagens mutantes, os níveis de expressão do gene *gsn* permaneceram aproximadamente constantes durante o crescimento. Diferenças nos níveis de expressão da glicogênio sintase de *S. cerevisiae* (*GSY2*) em resposta à via de AMP cíclico já foi descrita [69] e neste organismo, os níveis do mensageiro *GSY2* foi substancialmente reduzido em células da linhagem mutante *bcy1*, a qual possui a proteína PKA constitutivamente ativa. Portanto, os mecanismos mediados por AMP cíclico, os quais controlam a atividade e expressão da enzima glicogênio sintase em *N. crassa* e *S. cerevisiae* parecem atuar de maneira semelhante.

2- Caracterização da enzima glicogênio sintase quinase-3 em *N. crassa*.

Um outro aspecto abordado neste trabalho foi a caracterização molecular e funcional da enzima GSK-3 no fungo *N. crassa*, analisando seu papel fisiológico na biologia celular e no metabolismo de glicogênio global.

A clonagem molecular do cDNA codificando para esta enzima em *N. crassa* (NcGSK) permitiu a realização de vários estudos os quais trouxeram importantes informações sobre sua função celular. A análise da seqüência de aminoácidos, deduzida a partir da seqüência nucleotídica, mostrou que esta proteína é bastante conservada do ponto de vista evolutivo, evidenciado pelo alto grau de identidade entre proteínas variando desde leveduras até humanos. Uma característica interessante com relação à proteína GSK-3 é o fato da mesma ser ativa na ausência de estímulos externos e ser inibida em resposta a sinais mediados por receptores acoplados a membranas. As proteínas de humanos apresentam dois resíduos de serina (Ser²¹ na isoforma α e Ser⁹ na isoforma β), os quais são fosforilados e levam a inativação da enzima [127]. Estes resíduos, entretanto estão ausentes na proteína de *N. crassa*. Além da fosforilação de tais resíduos, esta quinase também é fosforilada em um resíduo de tirosina (Tyr²⁷⁹ na hGSK-3 α e Tyr²¹⁶ na hGSK-3 β). A fosforilação nestes resíduos é essencial para a funcionalidade da proteína e desfosforilação dos mesmos em resposta a estímulos externos levou a uma inativação da atividade quinase. Este sítio de fosforilação é conservado na enzima NcGSK como Tyr²⁷⁹. Um estudo bastante recente demonstrou que estes resíduos de tirosina nas isoformas humanas são modificados por autofosforilação [128].

[127] Sutherland, C.; Leighton, A. and Cohen, P. (1993) Inactivation of glycogen synthase kinase-3 β by phosphorylation: new kinase connections in insulin and growth-factor signalling. *Biochem. J.* **296**: 15-19.

[128] Cole, A.; Frame, S. and Cohen, P. (2004) Further evidence that the tyrosine phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 (GSK3) in mammalian cells is an autophosphorylation event. *Biochem. J.* **377**: 249-255.

A introdução de mutações no gene *NcgsK* em *N. crassa*, por RIP, resultou em clones apresentando severas alterações morfológicas e em todos eles, apenas poucas mutações pontuais foram observadas. Considerando que o processo de RIP atua eficientemente em seqüências maiores de 1 kb, algumas possíveis explicações poderiam ser dadas para o baixo número de mutações encontradas. Considerando o papel fundamental da proteína GSK na fisiologia e bioquímica celular em outros organismos, uma possível explicação seria que o grande número de mutações levaria à produção de uma proteína totalmente inativa, o que tornaria o mutante letal. Todos os clones obtidos apresentaram crescimento bastante reduzido e isso poderia corroborar a suposição de letalidade de um mutante completamente nulo. Duas das mutações encontradas no mutante 9-7 levaram a trocas de aminoácidos muito conservados (His⁸⁵ e Thr²⁴⁵) entre as proteínas GSKs de diferentes organismos. Além disso, o aminoácido Thr²⁴⁵, o qual foi substituído por Ala, encontra-se dentro do “core” de um domínio em α -hélice, conservado entre as proteínas GSKs, assim como entre outras proteínas quinases dependente de mitógeno (MAPKs) [129]. Tais mutações poderiam explicar os fenótipos observados nos mutantes, embora a extensão exata do papel desta proteína, assim como a verdadeira importância para *N. crassa* só seria possível de ser determinada através da obtenção do mutante nulo. Para isso, novas estratégias de nocaute gênico, através de “gene replacement”, serão realizadas. Uma segunda explicação possível viria a partir de fenótipos observados em mutantes de GSK-3 em *S. cerevisiae*. Células deste organismo expressam quatro isoformas de GSK-3 e mutação de um destes genes (*RIM11*) provocou severas deficiências nos processos de meiose e esporulação [130]. Considerando que o processo de RIP ocorre no período pré-meiótico do cruzamento sexual, mutantes no gene *NcgsK* poderiam não ser obtidos se um papel deste gene no processo meiótico, de fato, existisse no fungo. Entretanto, tal afirmação é, no momento, difícil de ser suportada uma vez que a análise do comportamento dos mutantes obtidos durante o ciclo sexual não foi estudada mais profundamente.

Dentre os fenótipos observados nas linhagens mutantes, o mais pronunciado foi a baixa taxa de crescimento, acompanhada por conidiação precoce em culturas sólidas. A conidiação constitui um processo de diferenciação celular, onde hifas especializadas (hifas aéreas) emanam da hifa basal e sofrem constrições da parede, levando a formação de estruturas de dispersão, denominados conídios. Este processo, em geral, em culturas crescidas em meio

[129] Dajani, R.; Fraser, E.; Roe, S. M.; Young, N.; Good, V.; Dale, T. C. and Laurence, H. P. (2001) Crystal structure of glycogen synthase kinase 3 β : Structural basis for phosphate-primed substrate specificity and autoinhibition. *Cell*, **105**: 721-732.

[130] Zhan, X. L.; Hong, Y.; Zhu, T.; Mitchell, A. P.; Deschenes, R. J. and Guan, K. L. (2000) Essential functions of protein tyrosine phosphatases PTP2 and PTP3 and RIM11 tyrosine phosphorylation in *Saccharomyces cerevisiae* meiosis and sporulation. *Mol. Biol. Cell*. **11**: 663-676.

sólido inicia-se após 2-3 dias de crescimento e é fortemente induzida por luz. Além disso, uma interface água-ar é necessária para a formação das hifas aéreas e, portanto, esse processo é inibido em culturas líquidas. Interessantemente, análises microscópicas das células mutantes demonstraram que as células sofrem constrições das paredes, levando à formação de conídios, mesmo quando crescidas em culturas líquidas. Este resultado, claramente demonstrou que as células mutantes apresentam uma desrepressão do processo de diferenciação celular, o qual levou à formação de conídios. A observação de que a proteína quinase GSK-3 regula processos tais como crescimento e diferenciação, também foi descrita em *D. discoideum*, onde esta proteína foi mostrada definir o destino celular entre esporo e corpo de frutificação [131]. Os nossos resultados mostraram uma alteração global no processo de diferenciação celular nos mutantes da proteína NcGSK, possivelmente envolvendo a participação desta proteína.

Uma outra característica da linhagem mutante 9-7 foi a ausência de alterações no conteúdo de glicogênio, assim como na atividade glicogênio sintase (GSN). Entretanto, estes resultados ainda são preliminares e, é importante considerar que NcGSK pode ter um papel no metabolismo global de glicogênio, atuando em alvos diferentes da proteína GSN. Um exemplo disso, foi a habilidade da proteína recombinante NcGSK fosforilar o inibidor INc-1 de *N. crassa*, o qual controla a atividade da fosfoproteína fosfatase de tipo-1 (PP-1). Estudos adicionais, entretanto, precisam ser feitos para definir com clareza se tal fosforilação tem algum papel relevante no metabolismo de glicogênio. Finalmente, a proteína NcGSK demonstrou ser autofosforilada. Embora exista conservação entre o resíduo Tyr¹⁹⁵ da NcGSK e o resíduo Tyr²⁷⁹ da proteína hGSK-3 α , a identificação do resíduo auto-fosforilável na enzima NcGSK permanece ainda a ser demonstrado. É importante salientar que o mecanismo de auto-fosforilação, demonstrado existir na enzima GSK-3 β de humanos, foi recentemente descrito e, nenhuma evidência de tal evento foi descrita em microrganismos. A auto-fosforilação da enzima de *N. crassa* constitui, portanto, constitui o primeiro relato deste evento em microrganismos.

[131] Plyte, S. E.; O'Donovan, E.; Woodgett, J.; Strutt, H. and Kay, R. R. (1995) Glycogen synthase kinase-3 (GSK-3) regulates cell fate in *Dictyostelium*, *Cell*, 80: 139-148.

MANUSCRITOS

GNN is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*

Author's names: Renato Magalhães de Paula, Wayne A. Wilson[‡], Héctor Francisco Terenzi[§], Peter J. Roach[‡] and Maria Célia Bertolini*

Address: Instituto de Química, UNESP, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, 14800-900, Araraquara, SP, Brazil.

[§]Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, Departamento de Biologia, USP, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

[‡]Indiana University School of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology, 46202-5122, Indianapolis, IN, USA

Running title: *Neurospora crassa* glycogenin

***Corresponding author:** Maria Célia Bertolini

Instituto de Química, UNESP
R. Professor Francisco Degni, s/n
14800-900, Araraquara, SP, Brazil
Phone: 55-16-3301-6675
Fax: 55-16-3322-7932
e-mail: mcbertol@iq.unesp.br

ABSTRACT

The initiation of glycogen synthesis requires the protein glycogenin, which incorporates glucose residues through a self-glucosylation reaction, and then acts as substrate for chain elongation by glycogen synthase and branching enzyme. Numerous sequences of glycogenin-like proteins are currently available in the databases but the enzymes from rabbit skeletal muscle and from *Saccharomyces cerevisiae* are the best characterized. We report the isolation of a cDNA from the fungus *Neurospora crassa*, which encodes a protein, GNN, with the properties of glycogenin. The *N. crassa* protein, 73 kDa, is one of the largest glycogenins but shares several conserved domains common to glycogenins from other organisms. Recombinant GNN produced in *E. coli* was able to incorporate glucose in a self-glucosylation reaction, to trans-glucosylate exogenous substrates, and to act as substrate for the chain elongation by glycogen synthase. Recombinant protein was sensitive to C-terminal proteolysis, leading to stable species of around 31 kDa, which maintained all functional properties. The role of GNN as an initiator of glycogen metabolism was confirmed by its ability to complement the glycogen deficiency of an *S. cerevisiae* strain (*glg1 glg2*) lacking glycogenin and unable to accumulate glycogen. Disruption of the *gnn* gene of *N. crassa* by RIP (Repeat Induced Point Mutation) resulted in a strain that was unable to synthesize glycogen, even though the glycogen synthase activity was unchanged. Northern blot analysis showed that the *gnn* gene was induced during vegetative growth and was repressed upon carbon starvation.

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; GNIP, glycogenin-interacting protein; GS, glycogen synthase; GST, glutathione-S-transferase; MW, molecular weight; ORF, open reading frame; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; TLCK, N-*p*-tosyl-L-lysine chloromethyl ketone; UDPG, uridine diphosphoglucose; VM, Vogel minimum; WT, wild type

INTRODUCTION

Glycogen represents a major storage polysaccharide in a wide range of species and its metabolism is under an intricate regulation by sensing nutrient availability and other environmental conditions. The biosynthesis of glycogen is mediated by the initiator glycogenin (EC 2.4.1.186), glycogen synthase (EC 2.4.1.11) and the branching enzyme (EC 2.4.1.18), catalyzing the formation of α -1,4- and α -1,6-glycosidic bonds, respectively. The role of glycogenin was first studied in mammalian systems and it has been implicated in the initiation step of glucose polymerization, through its self-glucosylation activity (1, 28, 21). Mammalian glycogenin is able to attach glucose to a specific Tyr residue build an oligosaccharide chain that acts as substrate for the elongation by glycogen synthase. Simultaneous action of the branching enzyme leads to the formation of mature branched glycogen molecules.

Due the completion of different genomes sequencing, the number of glycogenin-like proteins in the databases has increased substantially in the last few years. However, most of the biochemical and functional studies have focused on the mammalian and yeast proteins. Rabbit skeletal muscle glycogenin (34), the best studied protein, has residue Tyr194 modified by self-glucosylation reaction (6). In *Saccharomyces cerevisiae*, two genes (*GLG1* and *GLG2*) encoding for glycogenin-like proteins have been identified, the proteins showing 55% identity to each other and around 33% identity to rabbit glycogenin (10). Disruption of either gene caused no defect in glycogen accumulation and deletion of both genes is necessary to abolish glycogen storage. Unlike mammalian glycogenin, Glg proteins have multiple Tyr residues for self-glucosylation (18). Characterization of glycogenin-like proteins from other organisms can add new understanding of this enzyme. In *Neurospora crassa*, the existence of a glycoprotein involved in the initiation of glycogen synthesis was initially reported by Takahara and Matsuda (31), and later, Goldraij and Curtino (13) described the purification of a protein with self-glucosylating activity.

The catalytic mechanism of glycogenin is well studied. It is an unusual enzyme since it catalyses its own modification. The reaction involves the attachment of the first glucose, from UDP-glucose, to a Tyr residue(s) through a glucose-1-O-tyrosine linkage and extension to an oligosaccharide chain of up to ~8 glucose residues, through α -1,4 glycosidic linkages (22), which serves as a substrate for glycogen synthase. Glycogenin is a dimeric protein (8, 29) and a model was proposed for its enzymatic catalysis whereby modification of one subunit is carried out by the other subunit, in an inter-subunit mechanism (15). The three-dimensional structure of the rabbit skeletal muscle glycogenin has provided insight in understanding the catalytic action of this complex enzyme (12). The model confirmed the dimeric nature of the protein but the mechanism of attachment of the first glucose residue is

not yet fully understood. From the structure, it was suggested that transfer of the first residue is via an intermolecular reaction whereas the transfer of subsequent residues may be achieved by an intramolecular reaction. Besides its self-glucosylating activity, glycogenin has been shown to be able to trans-glucosylate exogenous acceptors, such as maltose or maltose derivatives (2).

Little is known about the mechanisms that control glycogenin expression and activity. Control by phosphorylation was proposed by Lomako and Whelan (16) but this assumption has been controversial. Glycogen phosphorylase may control the glucosylation level of glycogenin, modulating its ability to serve as substrate for glycogen synthase (7). More recently, in a two-hybrid screen, a new protein, called GNIP was found to interact with rabbit skeletal muscle glycogenin and to activate its self-glucosylation (26; 38). The function of GNIP remains obscure and, to date, no GNIP ortholog has been identified in microorganisms.

In this study we describe the isolation of a cDNA derived from the *gnn* gene that encodes the *N. crassa* glycogenin, GNN. Both *in vivo* and *in vitro*, GNN has all the expected properties of the better studied glycogenins from mammals and *S. cerevisiae*. Inactivation of the gene completely abolished the glycogen accumulation in *N. crassa*, confirming its role in glycogen biosynthesis and indicating the existence of no other self-glucosylating initiator protein in this organism. In *N. crassa*, GNN regulation is linked to the nutritional status of the organism.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions. *N. crassa* strains FGSC 424 (WT), Bat9-5a (*a nic⁻ cot-1*), and FGSC 3957 (*A aro-9 qa-2*) were purchased from the Fungal Genetics Stock Center (FGSC-University of Kansas, Missouri, Kansas City, USA). The strains were maintained by weekly transfer on slants of Vogel's minimum medium (VM medium) (35) supplemented with 2% sucrose, 10 µg/mL of nicotinic acid (strain Bat9-5a), and 0.15% aromatic aminoacids (phenylalanine, tyrosine, tryptophan and *p*-aminobenzoic acid) (strain FGSC 3957). Liquid cultures were inoculated with 10-days old conidia (1×10^7 /mL final concentration) in minimum Vogel liquid medium supplemented with 2% sucrose and incubated at 30°C at 250 rpm. At different times, aliquots (10 mL) were withdrawn, filtered, frozen in dry ice and stored at -80°C for further processing. For carbon starvation experiments, liquid cultures were grown for 12 h 30°C at 250 rpm. One aliquot was taken and the remaining culture was filtered. The mycelial pad was suspended in fresh Vogel minimal medium in which the sucrose concentration was reduced to 0.1%. Aliquots were withdrawn at different times and after that sucrose was added to 2% final concentration and new samples were taken.

S. cerevisiae EG328-1A (*Mata trp1 leu2 ura3-52*) and CC9 (*Mata trp1 leu2 ura3-52 glg1::LEU2 glg2::URA3*) were maintained in YPD plates. Yeast transformation followed the lithium acetate method (24), and the transformants were grown in selective medium (SD) lacking tryptophan. *E. coli* strain DH5 α was used for plasmid propagation and was grown in Luria-Bertani (LB) medium supplemented with 100 µg/mL ampicillin. Strain XL-1 Blue was used for library screening experiments and strain BNN 132 (λ Kc lysogenic) was used for plasmid excision from λ vector.

cDNA libraries and cloning of the glycogenin cDNA. The *N. crassa* cDNA library λ AD5-Nc was purchased from the FGSC. The plasmid library pYADE5-Nc was constructed according to Brunelli and Pall (5) after plasmid excision of the λ AD5-Nc library. Using the *S. cerevisiae* Glg2p sequence, a search at the *N. crassa* Genome Database was performed in order to find glycogenin homologous. One sequence of approximately 1.0 kb encoding a polypeptide of 340 amino acids was found, showing 32% identity with Glg2p. The sequence was amplified by PCR from pYADE5-Nc plasmid library using the primers NcGN-1F (5'-GGAATTCCATATGATGGCGATCACCAAAGGAGAGGATC-3') and NcGN-1R (5'-ACGCGTCGACTTAATAAACAGCCCACCATCTACCGATC-3') and used to probe the λ AD5-Nc library in order to get the whole cDNA. The 1.0 kb fragment was labelled with [α -³²P]-dATP by random priming. Phages were propagated in *E. coli* XL-1 Blue as host, transferred to nitrocellulose membranes and hybridized with the labelled fragment in 6 X SSPE, 5 X

Denhardt's solution, 1 mM EDTA, 100 µg/mL denatured salmon sperm DNA at 65°C. Membranes were washed in 2 X, 1 X and 0.5 X SSPE plus 0.1% SDS, at 65°C for 30 min, each wash. Positive clones were submitted to plasmid excision through transformation of *E. coli* BNN 132. After restriction analysis, the clone containing the largest insert (2.8 kb) was isolated. The entire nucleotide sequence was determined, in both strands, by the dideoxy chain termination method in an automatic sequencer ABI 377 (Perkin Elmer), and the sequence is available at GenBank under the accession number AY566221. Nucleotide and protein sequences were analyzed by bioinformatic tools from BCM Sequence Launcher. Sequence alignment was performed by the ClustalW 2.0 program and identities and similarities determined by BoxShade 3.21.

Inactivation of *gnn* gene by Repeat Induced Point Mutation. The *gnn* gene was inactivated through the Repeat Induced Point Mutation (RIP) process (25). The glycogenin genomic sequence was amplified by PCR and subcloned into the pMSN1 vector (20) that contains the *qa-2* gene as an auxotrophic marker. This construction was used to transform 8-days old FGSC3957 conidia by electroporation, and selection was in solid VM medium lacking aromatic amino acids. Twenty transformants were selected and transferred to slants containing VM medium containing 2% sucrose. The integration of the exogenous copy into the genome was analyzed by Southern Blot after extraction of genomic DNA (36), and restriction digestion. One transformant containing an additional copy of *gnn* sequence was crossed with the Bat9-5a strain (37). The resulting ascospores were collected after 15 days of crossing, heat-shocked and plated in VM medium containing 2% sorbose. Fifty clones were picked, transferred to slants of VM medium containing 2% sucrose and incubated at 37°C to score for colonial temperature dependent clones. Conidial suspension of colonial clones were spotted in a VM medium plate, allowed to grow for 2 days at 37°C, and assayed for glycogen accumulation by exposing the colonies to iodine vapor. Clones showing low glycogen content were isolated, and the presence of mutations in the DNA sequence was evaluated by DNA sequencing after amplification of the genomic target sequence by PCR. One clone was selected and submitted to another round of crossing in order to enrich the number of point mutations.

RNA extraction and Northern blot analysis. Total RNA from *N. crassa* FGSC 424 was prepared by Sokolovsky *et al.* (30). RNA (15 µg) was separated by electrophoresis on 1,2% formaldehyde-agarose gel (23). The gel was stained with ethidium bromide, photographed and the RNAs were transferred to neutral nylon membranes (Hybond-N, Amersham) in 2 X SSC. The blot was probed with the entire *gnn* ORF (1994 bp), radiolabelled by random priming, in 5 mL of Ultrahyb hybridization solution (Ambion) at 42°C.

After overnight hybridization the blot was washed twice for 10 min in 2 X SSC, 0.1% SDS and twice for 15 min in 0.1 X SSC, 0.1% SDS.

Plasmid constructions and expression of *N. crassa* GNN in *E. coli*. For expression of the entire *N. crassa* glycogenin, the full-length glycogenin ORF was amplified by PCR using the sense primer NcGN-1F and the antisense primer GN-1R (5'-GAATTCTTACGTCTCAAGGACATC-3'). For expression of truncated forms, antisense primers containing stop codon at the amino acid positions 246, 307 and 361 were used in combination with sense primer NcGN-1F. The antisense primers were: GN-2R (5'-GTCGACTTAATAAACAGCCCCACCA-3'), GN-3R (GTCGACTTATGGTGTAGGTGCTATGGG-3'), and GN-4R (5'-GTCGACTTACTTGTACCACATATCCTTGGGCGG-3'), where the underlined codons represent the stop codons. The fragments were amplified using the *pfx* High-fidelity Taq polymerase, cloned into the pMOS-Blue vector (Amersham) and confirmed by DNA sequencing. DNA cassettes *EcoRI-EcoRI* (entire ORF) and *EcoRI-SalI* (truncated proteins) were removed from pMOS-Blue vector and transferred to pGEX-4T1 vector, previously digested with the same enzymes. All the constructs were used to transform BL21 DE3 *E. coli* cells. The recombinant proteins were produced as GST-fusion proteins in 500 mL LB medium, by adding 0.1 mM IPTG as inducer, for 3 h at 30°C. The cells were collected by centrifugation and suspended in homogenizing buffer (1X PBS, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 5 mM DTT, 0.1 mM TLCK, 1 µg/mL pepstatina, 1 µg/mL aprotinin). The cells were broken by two passages through a French pressure cell at 18,000 PSI. The supernatant, after centrifugation at 40,000 X *g* for 20 min, was fractionated by affinity chromatography in the GSTrap column (1 mL) in an Äkta Prime Protein Purification System (Amersham). The recombinant proteins were eluted with 10 mM reduced glutathione and dialyzed overnight against 1 L of homogenizing buffer. When necessary, the presence of proteins was confirmed by Western blot using antibody anti-GST raised in rabbits.

Functional analysis of the *N. crassa* recombinant glycogenin. The self-glucosylation assay (6) was carried out with 1.5 µM protein in 50 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM MnSO₄, 2 mM DTT, and 19 µM UDP-[U-¹⁴C]glucose (263 mCi/mmol) in a 10 µL reaction at 30°C for 20 min. The reaction was terminated by addition of 2.5 µL of sample buffer containing SDS and boiled for 5 min. The samples were subjected to SDS-PAGE, stained with Coomassie Blue R-250, destained, rinsed in water and incubated with Fluoro-Hance for 30 min. The gel was dried and subjected to autoradiography for 30 h. For the elongation assay, a self-glucosylation reaction was performed as described above, and after 20 min of reaction, purified rabbit skeletal muscle glycogen synthase or yeast glycogen synthase

(Gsy2p isoform), glucose-6-phosphate and UDP-glucose were added to final concentrations of 20 µg/mL, 7.2 mM and 0.5 mM, respectively, and the reaction was incubated for additional 120 min. To assay transglucosylation activity, recombinant proteins (0.2 µM) were incubated at 30°C for 10 min in 50 mM HEPES, pH 7.5, 5 mM MnSO₄, 2 mM DTT and 19 µM UDP-[U-¹⁴C]glucose (263 mCi/mmol) with 10 mM *n*-dodecyl α-D-maltoside (Sigma) as the glucose acceptor. An aliquot (3 µL) was spotted on silica gel thin layer plates (G-25, Merck) and subjected to ascending chromatography in acetonitrile:acetic acid:ethanol:water (65:5:10:20). The plate was dried, developed with α-naphthol/H₂SO₄ and subsequent autoradiography.

For *S. cerevisiae* complementation, full-length cDNA *gnn* and truncated forms were transferred from pGEX-4T1 vector to the yeast expression vector pRS424-GPD, where gene expression is under control of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter. The constructs were used to transform EG328-1A and CC9 *S. cerevisiae* strains, and transformants were analyzed by their capacity to accumulate glycogen by qualitative (exposure to iodine vapor) and quantitative (see below) assays.

Glycogen synthase and glycogen assays. Glycogen synthase activity was measured as described by Thomas *et al.* (32). *N. crassa* mycelium was ground in a pre-chilled mortar in liquid nitrogen and extracted in lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 100 mM NaF, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.1 mM TCLK, 1 mM benzamidina, and pepstatin and aprotinin (1 µg/mL). Yeast cells were resuspended in lysis buffer and broken with glass beads. The extracts were clarified by centrifugation at 3,000 X *g*, 10 min, 4°C, and the supernatant was used for enzyme assay. Glycogen synthase activities in the presence and absence of G-6-P were measured.

Glycogen content was measured following the protocol described by Hardy and Roach (14). Briefly, 100 µL of crude extract was precipitated with 20% TCA (final concentration). The supernatant was separated after centrifugation, and precipitated with 500 µL of 95% cold ethanol. The glycogen was collected by centrifugation, washed twice with 66% ethanol, dried and digested with amyloglucosidase (30 mg/mL). Free glucose was measured by the glucose oxidase method.

RESULTS

Cloning of the cDNA encoding a glycogenin-like protein in *N. crassa*. Using the *S. cerevisiae* Glg2p protein sequence, we performed a search of the *N. crassa* Genome Database to find glycogenin-like sequences. One sequence was retrieved and showed homology to the Glg2p N-terminus. Two primers were designed based on the corresponding DNA sequence and used to amplify a cDNA fragment from the pYADE5-Nc cDNA plasmid library. DNA sequencing of the fragment showed that it was part of a cDNA encoding a glycogenin-like protein. The complete cDNA was isolated by screening the λ AD5-Nc library, using the amplified fragment as probe. Three positive clones were isolated, the phages purified and used to infect *E. coli* BNN132 cells for plasmid excision. The plasmids were analyzed by restriction digestion and the clone containing the largest insert (~2.8 kb) was chosen for further characterization. Sequencing of the insert revealed a 2761 bp sequence with an ORF of 1992 bp encoding a 664 amino acids polypeptide. We propose the name *gnn* for the gene and GNN for the corresponding protein. The 5'-untranslated region was 103 bp long and the 3'-untranslated region contained 662 bp with a poly-A tail 28 nucleotides. Comparison between the cDNA and the genomic sequences showed that the ORF was interrupted by five putative introns (I-V). Intron I was the largest, containing 207 bp, and introns II-V were 66, 74, 68 and 88 bp long, respectively. All introns showed the consensus 5' splice-donor site (GTA/GA/CGT/C), and the consensus 3' splice-acceptor site (C/TAG) according to the rule of *N. crassa* splice donors and acceptors (4).

GNN protein has a calculated mass of 73 kDa and a pI value of 6.6. Sequence alignment of the GNN polypeptide with glycogenins from other organisms is shown in Fig. 1. GNN is 38% and 32% identical to the Glg1p and Glg2p isoforms from *S. cerevisiae*, respectively, and 37% to the mammalian orthologs (human GYG1 and 2 and rabbit glycogenin). However, the homology to glycogenin from other filamentous fungi is greater, around 60% and 73% to the proteins from *Aspergillus nidulans* and from the rice pathogen *Magnaporthe grisea*, respectively. It is noteworthy that most of the conserved domains are located in the first 250 amino acids of the N-terminal region. Similar to the Glg1p protein and the orthologs from other filamentous fungi, GNN possesses a long C-terminal extension, which is conserved only within the fungal glycogenins (data not shown).

The residue Tyr194, modified by glucosylation in mammalian glycogenin corresponds to Tyr196 in GNN. This residue aligns with Tyr230 of Glg2p, which is implicated in the self-glucosylation activity in the yeast protein.

Inactivation of the *gnn* gene. To confirm the role of GNN in the glycogen biosynthesis, we inactivated the *gnn* gene by RIP. This process introduces point mutations in

duplicated DNA sequences during the premeiotic phase of the sexual cycle of *N. crassa*, rendering both endogenous and integrated copies inactive. For that, the genomic sequence comprising the entire ORF plus the introns was cloned into the pMSN1 vector and used to transform FGSC3957 cells (*aro-9*, *qa-2*⁻). This strain bears a *qa-2*⁻ mutation that, in the presence of the *aro-9* gene, prevents growth in medium lacking aromatic amino acids. The presence of the exogenous copy of *gnn* was detected by PCR and Southern blot (data not shown). One clone, containing a single ectopic integration event was crossed with the Bat9-5a (*nic-1*⁻, *cot-1*⁻) strain and ascospores were collected and germinated. Fifty ascospores were randomly collected and incubated at 37°C to allow the identification of the colonial temperature dependent clones (*cot-1*⁺). Twenty-two clones showed the colonial phenotype at the restrictive temperature. Conidial suspensions of the clones were spotted on Vogel's minimum medium plates, incubated at 37°C for 48 h and assayed for glycogen accumulation by exposing the cells to iodine vapor. Four colonies showed glycogen accumulation defects as they stained yellow compared to the control strain (Bat9-5a) that stained brown. The genomic sequences from these clones were amplified from genomic DNA, and sequenced. Point mutations were detected in all clones but no stop codon interrupting the coding sequence was found. One clone showing amino acid changing mutations was submitted to another round of crossing, to increase the number of mutations and to identify a null mutant with a premature stop codon. One clone (RP-2) was isolated from the second crossing, which had a stop codon at amino acid residue 55, thus generating a truncated protein (Fig. 2A).

No morphological alteration was apparent in the RP-2 (*gnn*^{rip}) strain. The mutant was viable and grew normally both in solid and liquid media. No defects in the sexual cycle was observed as the cells behaved properly both as male or female parents in mating. Glycogen content was severely reduced in the *gnn*^{rip} strain when compared to the control parental strains (Fig. 2B). The glycogen synthase activity was similar to that of the parental strains, indicating that the glycogen defect was not due to a modulation in the GS activity (Fig. 2C).

GNN expression is induced during vegetative growth and repressed under carbon starvation. In search of regulation of glycogenin in *N. crassa*, we analyzed the expression of the *gnn* gene in liquid cultures during vegetative growth and under carbon starvation. Cells were grown in liquid VM medium and aliquots were withdrawn at different times. RNA samples were processed and subjected to Northern blot analysis. One transcript of approximately 3.0 kb was detected (Fig. 3A), suggesting that the *gnn* cDNA isolated after screening was almost complete. The *gnn* mRNA levels increased around four times in the first 12 h of growth that corresponds to the early logarithmic phase (Fig. 3C). After this time, a strong reduction in the expression was observed. Interestingly, we have previously reported

that the *gsn* gene, which encodes glycogen synthase in *N. crassa*, has maximum expression around 24 h (11). Thus, expression of *gnn* gene is maximally induced 12 h before the expression of *gsn* gene.

When cells were starved for carbon by shifting from medium of high to low sucrose concentration, a strong reduction in the *gnn* transcript levels was observed in the first 30 min (Fig. 4A, lanes 2-4). Moreover, the levels were rapidly recovered when sucrose was added to 2% final concentration (Fig. 4A, lanes 5-7). The gene repression was around six-fold (Fig. 4C). These results clearly showed that *gnn* expression is tightly regulated by the carbon availability.

GNN properties. In order to analyze the properties of GNN, the entire and three truncated proteins, fused to GST were produced in *E. coli*. These proteins were purified by affinity chromatography and assayed by their abilities to incorporate glucose residues from the UDP-glucose in a self-glucosylation reaction. SDS-PAGE analysis showed that the whole protein was highly susceptible to proteolysis leading to lower MW species (Fig. 5A, lanes 1 and 2). The largest species (101 kDa) corresponded to the entire GST-GNN fusion protein and the lower MW bands were products of proteolysis, as confirmed by Western blot using anti-GST antibodies (data not shown). These results demonstrated that the proteolysis was towards the COOH terminus. The GST-GNN Δ 360 protein (~69 kDa), corresponding to the first 360 amino acids, also showed proteolysis leading to a smaller product with a MW around 36 kDa (Fig. 5A, lanes 3 and 4). The proteins GST-GNN Δ 306 and GST-GNN Δ 245 ran as homogeneous species of approximately 63 and 56 kDa, respectively, demonstrating that they were more stable than the longer forms of glycogenin (Fig. 5A, lanes 5 to 8). When the proteins were incubated with radioactive UDP-glucose only the protein GST-GNN Δ 245 was incapable of incorporating radioactivity (Fig. 5B), indicating that this protein was not active. For the other forms, the incorporation of glucose was increased in the presence of Mn²⁺ (Fig. 5B, lanes 2, 4, and 6).

To determine whether the glucosylated forms of the whole and truncated glycogenins could serve as substrates for the glycogen synthase in an elongation reaction, purified mammalian and yeast glycogen synthases were added after the self-glucosylation reaction. We have been unable to obtain an active form of recombinant *N. crassa* glycogen synthase even after testing several different expression systems. Fig. 6 shows the elongation of glucosylated glycogenins by glycogen synthase. Before addition of glycogen synthases, glucosylated species corresponding to GST-GNN, GST-GNN Δ 360 and GST-GNN Δ 306 could be seen, as well as the proteolytic products. The addition of glycogen synthase proteins and an excess of unlabelled UDP-glucose converted all glucosylated species to high MW products with very low mobility that remained at the gel origin. The conversion of all

proteolysis products of the GST-GNN and GST-GNN Δ 360 to high MW products suggested that all species were substrates for glycogen synthase.

We also analyzed the ability of the different glycogenins to transfer glucose residues to another acceptor in a transglucosylation reaction (Fig. 6). For this, we used *n*-dodecyl- β -maltoside as the glucose acceptor. The proteins GST-GNN, GST-GNN Δ 360 and GST-GNN Δ 306 were able to transfer glucose residues to the acceptor.

***N. crassa* glycogenin restores the glycogen deficiency phenotype in *S. cerevisiae*.** We have also evaluated the ability of *N. crassa* glycogenin to restore the glycogen content in a *S. cerevisiae* glycogenin mutant strain (CC9 strain). This strain has deletions in both *GLG* genes encoding the two glycogenin isoforms, and thus is unable to accumulate glycogen. We overexpressed the entire and the truncated *N. crassa* glycogenins in this strain and assessed whether glycogen synthesis was restored. Fig. 8 shows that expression of either Glg1p or Glg2p in the strain (positive control) was sufficient to reinstate the physiological glycogen pools, as described earlier (10). Similarly, overexpression of either Glg1p or Glg2p in a WT strain (EG-328) did not lead to an over accumulation of glycogen, suggesting no limiting role for glycogenin in the glycogen accumulation. Expression of GNN and the truncated forms GNN Δ 360 and GNN Δ 306 was effective in restoring glycogen in the CC9 strain; however, different glycogen levels were obtained with different constructs. GNN Δ 306 was the most effective, resulting in glycogen levels close to the normal physiological values (Fig 7, sample 9).

DISCUSSION

The protein glycogenin acts in the initial step of glycogen biogenesis by self-priming an oligosaccharide chain, that is subsequently elongated by glycogen synthase. Glycogenin is a unique enzyme, since it is the substrate, the catalyst, and the product of the reaction. Although its presence and characterization were first described in mammals and yeast, searching genome databases shows that glycogenin-like proteins are found in many other organisms. The fungus *N. crassa* is a particularly attractive model system because of the high gene diversity and the wide metabolic capabilities (17). In addition, the fact that the database includes a large number of orphans, hypothetical or putative ORFs lacking any ortholog, makes this fungus an ideal system to search for new proteins with different functions.

The existence of a glucosylated protein intermediate in glycogen synthesis in *N. crassa* was initially reported by Takahara and Matsuda (31), and later, this proteoglycan was purified close to homogeneity by Goldraj and Curtino (13). The main purpose of this work was to demonstrate that *N. crassa* possesses a glycogenin-like protein showing similar properties to the rabbit skeletal muscle and yeast proteins. The cDNA isolated encodes a protein, termed GNN, of 664 amino acids, which is larger than the rabbit muscle and human liver glycogenin (34, 19), and the yeast isoforms Glg1p and Glg2p (10). However, GNN is shorter in extension than other fungal glycogenin-like proteins retrieved from the databases. GNN has a calculated pI of 6.67, which is higher than those of yeast (3.95 for Glg1p, 5.6 for Glg2p) and mammalian (4.84 for rabbit muscle) proteins.

Sequence alignment among different glycogenins showed that the most conserved domains are concentrated in the N-terminal region of the molecule, spanning the first 300 amino acids, which contains the glucosyl transferase domain. The overall conservation between GNN and yeast and mammalian glycogenin is low, around 37%; however, glycogenins from filamentous fungi share a higher conservation, reaching values close to 80%. The residue Tyr194 in rabbit skeletal muscle glycogenin, reported to be the target for attachment of glucose residues (6), is conserved in GNN protein as Tyr196. Additional studies are necessary to determine whether this residue is indeed modified in *N. crassa* protein.

The GNN protein possesses a long C-terminal extension, which is observed in other fungal proteins and in the yeast Glg1p protein. In general, this long extension is well conserved among the fungal glycogenins but less so in Glg1p. One of the conserved C-terminal segments, consisting of 47 amino acids in the yeast protein, has been proposed to be involved in physical interaction with glycogen synthase (10). However, in GNN protein this

region does not seem to be essential either for the catalytic properties of glycogenin or the effectiveness of primed glycogenin to serve as substrate for glycogen synthase.

The recombinant GNN produced in *E. coli* was susceptible to C-terminal proteolysis, leading to lower MW species with a predominant species of ~300 amino acids. All the proteolysed forms were active, judged by their ability to incorporate labeled glucose. Glycogenin proteolysis was previously reported for the yeast Glg1p (618 amino acids) produced in *E. coli*, and similarly, occurred towards the C-terminus (10). The proteoglycogen purified from *N. crassa* by Goldraij and Curtino (13) consisted of a 31 kDa polypeptide containing most of the activities related to glycogenin. We can speculate that the previously purified glycogen-conjugated polypeptide represents a proteolytic product of the GNN protein that retained most of the activity, consistent with the results presented here. A minimal polypeptide, containing around 300 amino acids, is necessary and sufficient for activity. Interestingly, endogenous GNN was identified, by Western blot, as a polypeptide of MW around 73 kDa (data not shown), suggesting that GNN might be more stable in the cellular environment, perhaps because of the presence of other proteins that could interact with and stabilize glycogenin. The rabbit skeletal muscle glycogenin was described as able to interact with GNIP protein (26), likely forming multimeric complexes (38), and to interact with actin (3). Thus, the possibility of other proteins interacting with GNN in *N. crassa* must be also considered.

Once glucosylated, all active forms of glycogenin were successfully elongated by yeast and mammalian glycogen synthases, showing that the C-terminus was not crucial for the elongation process. However, we cannot exclude the possibility that the long C-terminal region in GNN might be important for physical interaction with endogenous glycogen synthase (GSN). In this case, the elongation of truncated forms of GNN by the glycogen synthases used in our assay might be explained by the interactions of these proteins with the growing carbohydrate chains in GNN forms. Experiments aimed to determine the importance of the GNN C-terminal region in the interaction with *N. crassa* glycogen synthase (GSN) are underway.

The assumption that GNN is, in fact, the self-glycosylation protein involved in the priming step of glycogen biosynthesis in *N. crassa* came from showing that the inactivation of *gnn* gene by RIP correlated with defects in glycogen accumulation. The glycogen content in this mutant was severely reduced even though the glycogen synthase activity remained unchangeable. Interestingly, Cheng *et al.* (10), reported that glycogenin mutant yeast strain had a +/- G-6-P glycogen synthase activity ratio decreased, suggesting that the yeast glycogen synthase might be more phosphorylated and thus, less active in this mutant strain. The authors suggested that glycogenin might have a role in determining the phosphorylation status of glycogen synthase. This mechanism, however, seems to be absent in *N. crassa*

since the $-/+G-6-P$ activity ratio in the mutant RP-2 was similar to that of parental strains. The absence of glycogen deposits in the GNN mutant strain also suggests that no other protein with glucosyl transferase activity acting in the glycogen synthesis exists in *N. crassa*. The expression of GNN in yeast cells lacking both glycogenin genes (*glg1 glg2* mutant) restored the glycogen pools close to normal levels. This corroborated the result of GNN as a self-priming protein involved in glycogen synthesis. The phenotypic recovery could be achieved by expression of the entire and truncated forms of GNN. All these results provide good evidence for the role of GNN in glycogen biogenesis in *N. crassa*.

Finally, we showed that the glycogenin mRNA levels are regulated by growth conditions. During vegetative growth, the mRNA levels were induced with maximal expression around 12 h of growth, corresponding to early log phase and 12 h ahead of maximum expression of glycogen synthase (11). The expression of human glycogenin-1 was previously reported to be modulated in transfected mouse muscle cells (33), and differential expression of chicken glycogenin during development has also been described (9). Furthermore, mRNA levels were shown to be responsive to carbon availability and cells shifted to a low sucrose concentration medium rapidly decreased the *gnn* expression. This is one of the first reports of modulation of glycogenin expression by nutrient availability. Skurat *et al.* (27) demonstrated a modulation of the glucosylation status of rabbit muscle glycogenin expressed in COS cells in medium containing different glucose concentrations. However, these data demonstrated a post-translation rather than a transcriptional control. Analysis of the promoter region of *gnn* identified several transcriptional factors sites including stress response elements (STREs) and nitrogen regulated sequences (Nit-2). We previously reported the repression of the glycogen synthase gene (*gsn*) under stress conditions, and it would be interesting to investigate whether *N. crassa* glycogenin is under similar controls. Studies of the expression levels of glycogenin during growth conditions known to impact glycogen accumulation are underway, and they would help to clarify whether a control in the glycogenin expression is part of the regulation of glycogen deposition in *N. crassa*.

Acknowledgements

The authors thank Dr. Anna A. DePaoli-Roach (Indiana University School of Medicine, Indianapolis, IN, USA) for helpful suggestions on the work.

We thank FAPESP (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo) for the fellowship (to RMP) and for the financial support (to MCB), and CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico). Some work was supported by National Institutes of Health Grant DK42576 (to PJR).

REFERENCES

1. **Alonso, M. D., J. Lomako, W. M. Lomako, and W. J. Whelan.** 1995a. A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* **9**:1126-1137.
2. **Alonso, M. D., J. Lomako, W. M. Lomako, and W. J. Whelan.** 1995b. Catalytic activities of glycogenin additional to autocatalytic self-glycosylation. *J. Biol. Chem.* **270**:15315-15319.
3. **Baqué, S., J. J. Guinovart, and J. C. Ferrer.** 1997. Glycogenin, the primer of glycogen synthesis, binds to actin. *FEBS Letters* **417**:355-359.
4. **Bruchez, J. J. P., J. Eberle, and V. E. A. Russo.** 1993. Regulatory sequences involved in the translation of *Neurospora crassa* mRNA: Kozak sequences and stop codons. *Fungal Genet. Newslett.* **40**:89-96.
5. **Brunelli, J. P. and M. L. Pall.** 1993. A series of yeast/*Escherichia coli* λ expression vectors designed for directional cloning of cDNAs and *cre/lox*-mediated plasmid excision. *Yeast* **9**:1309-1318.
6. **Cao, Y., A. M. Mahrenholz, A. A. DePaoli-Roach, and P. J. Roach.** 1993a. Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function. *J. Biol. Chem.* **268**:14687-14693.
7. **Cao, Y., A. V. Skurat, A. A. DePaoli-Roach, and P. J. Roach.** 1993b. Initiation of glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* **268**:21717-21721.
8. **Cao, Y., L. K. Steinrauf, and P. J. Roach.** 1995. Mechanism of glycogenin self-glycosylation. *Arch. Biochem. Biophys.* **319**:293-298.
9. **Carrizo, M. E., J. M. Romero, M. C. Miozzo, M. Brocco, P. Panzetta, and J. A. Curtino.** 1997. Biosynthesis of proteoglycogen: modulation of glycogenin expression in the developing chicken. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **240**:142-145.
10. **Cheng, C., J. Mu, I. Farkas, D. Huang, M. G. Goebel, and P. J. Roach.** 1995. Requirement of the self-glycosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **15**:6632-6640.
11. **de Paula, R., C. Azzariti de Pinho, H. F. Terenzi, and M. C. Bertolini.** 2002. Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA. *Mol. Genet. Genomics* **267**:241-253.
12. **Gibbons, B. J., P. J. Roach, and T. D. Hurley.** 2002. Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J. Mol. Biol.* **319**:463-477.
13. **Goldraj, A., and J. A. Curtino.** 1996. M-glycogenin, the protein moiety of *Neurospora crassa* proteoglycogen, is an auto- and transglucosylating enzyme. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **227**:909-914.

14. **Hardy, T. A., and P. J. Roach.** 1993. Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.* **268**:23799-23805.
15. **Lin, A., J. Mu, J. Yang, and P. J. Roach.** 1999. Self-glycosylation of glycogenin, the initiator of glycogen biosynthesis, involves an inter-subunit reaction. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**:163-170.
16. **Lomako, J., and W. J. Whelan.** 1988. The occurrence of serine phosphate in glycogenin; a possible regulatory site. *Biofactors* **1**:261-264.
17. **Mannhaupt, G., C. Montrone, D. Haase, H. W. Mewes, V. Aign, J. D. Hoheisel, B. Fartmann, G. Nyakatura, F. Kempken, J. Maier, U. Schulte.** 2003. What's in the genome of a filamentous fungus? Analysis of the *Neurospora* genome sequence. *Nucleic Acids Res.* **31**:1944-1954.
18. **Mu, J., C. Cheng, and P. J. Roach.** 1996. Initiation of glycogen synthesis in yeast. *J. Biol. Chem.* **271**:26554-26560.
19. **Mu, J., A. V. Skurat, and P. J. Roach.** 1997. Glycogenin-2, a novel self-glycosylating protein involved in liver glycogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **272**:27589-27597.
20. **Nelson, M. A., and R. L. Metzberg.** 1992. A qa2⁺-pGEM vector for *Neurospora* transformations. *Fungal Genet. Newslett.* **39**:59-60.
21. **Roach, P. J., and A. V. Skurat.** 1997. Self-glucosylating initiator proteins and their role in glycogen biosynthesis. *Progr. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* **57**:289-316.
22. **Rodriguez, I. R., and W. J. Whelan.** 1985. A novel glycosyl-amino acid linkage: rabbit-muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **132**:829-836.
23. **Sambrook, J., and D. W. Russell.** 2001. In: *Molecular Cloning. A Laboratory Manual* (3rd ed.) Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
24. **Schiestl, R. H., and R. D. Gietz.** 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* **16**:339-346.
25. **Selker, E.** 1990. Premeiotic instability of repeated sequences in *Neurospora crassa*. *Annu. Rev. Genet.* **24**:579-613.
26. **Skurat, A. V., A. D. Dietrich, L. Zhai, and P. J. Roach.** 2002. GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **277**:19331-19338.
27. **Skurat, A. V., Y. Cao, and P. J. Roach.** 1993. Glucose control of rabbit skeletal muscle glycogenin expressed in COS cells. *J. Biol. Chem.* **268**:14701-14707.
28. **Smythe, C., and P. Cohen.** 1991. The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem.* **200**:625-631.
29. **Smythe, C., P. Watt, and P. Cohen.** 1990. Further studies on the role of glycogenin in glycogen biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **189**:199-204.

30. **Sokolovsky, V., R. Kaldenhoff, M. Ricci, and V. E. A. Russo.** 1995. Fast and reliable mini-prep RNA extraction from *Neurospora crassa*. Fungal Genetics Newsletter **37**:41-43.
31. **Takahara, H., and K. Matsuda.** 1977. Biosynthesis of glycogen in *Neurospora crassa*. Existence of a glucoproteic intermediate in the initiation process. J. Biochem. **81**:1587-1594.
32. **Thomas, J. A., K. K. Shlender, and J. Lerner.** 1968. A rapid filter paper assay for UDP-glucose-glycogen glycosyltransferase, including an improved biosynthesis of UDP-¹⁴C-glycose. Anal. Biochem. **25**:486-499.
33. **Van Maanen, M. H., P. A. Fournier, T. N. Palmer, and L. J. Abraham.** 1999. Characterization of human glycogenin-1 gene: Identification of a muscle-specific regulatory domain. Gene **234**:217-226.
34. **Viskupic, E., Y. Cao, W. Zhang, C. Cheng, A. A. DePaoli-Roach, and P. J. Roach.** 1992. Rabbit skeletal muscle glycogenin. Molecular cloning and production of fully functional protein in *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. **267**:25759-25763.
35. **Vogel, H. J.** 1956. A convenient growth medium for (medium N). Microbiol. Genet. Bull. **13**:42-43.
36. **Weiland, J. J.** 1997. Rapid procedure for the extraction of DNA from fungal spores and mycelia. Fungal Genetics Newsletters **44**:60-63.
37. **Westergaard, M., and H. K. Mitchell.** 1947. *Neurospora*. V. A synthetic medium favoring sexual reproduction. Am. J. Bot. **34**:573-577.
38. **Zhai, L., A. D. Dietrich, A. V. Skurat, and P. J. Roach.** 2004. Structure-function analysis of GNIP, the glycogenin-interacting protein. Arch. Biochem. Biophys. **421**:236-242.

FIGURE LEGENDS

FIG. 1. Sequence alignment of glycogenin from different organisms. The black boxes represent the identical amino acids and the gray boxes represent conservative amino acid changes. The alignment was performed using the program ClustalW 2.0 and the identities and similarities were determined using the program Boxshade 2.2. GNN, *N. crassa* glycogenin; *M. grisea*, *Magnaporthea grisea*; *A. nidulans*, *Aspergillus nidulans*; Glg1p and Glg2p, *S. cerevisiae* isoforms (10); rabbit, rabbit skeletal muscle glycogenin (34); Human, human glycogenin-2 (19).

FIG. 2. Effects of *gnn* inactivation on the glycogen content and glycogen synthase activity in *N. crassa*. A *gnn* null mutant strain was generated by RIP. (A) Schematic comparison between *gnn* sequences from WT and RP-2 strains. The C→T transitions are shown in bold and underlined. Amino acids changes are represented between parentheses. The asterisk represents the stop codon. (B) Glycogen accumulation. (C) Glycogen synthase activity in the absence or in the presence of glucose-6-phosphate. Cells were grown for 24 h in liquid cultures and processed as described in Material and Methods. The results are the average of three independent experiments.

FIG. 3. *gnn* gene expression. (A) Gene expression during vegetative growth by Northern blot. Total RNA obtained from liquid cultures incubated at 30°C at the indicated times were separated by electrophoresis in a denaturing formaldehyde gel, transferred to nylon membrane and probed with [α -³²P] radiolabeled full length *gnn* cDNA. (B) Loading control showing the 28S rRNA after ethidium bromide staining of the same gel. (C) Densitometric analysis of the relative induction.

FIG. 4. *gnn* expression during carbon starvation. (A) Northern blot analysis of *gnn* expression in cells subjected to carbon deprivation. Cells grown in 2% sucrose Vogel minimum medium (lane 1) were shifted to fresh medium containing 0.1% sucrose for 30, 60, and 90 min (lanes 2-4, respectively). After this time, sucrose was added to 2% final concentration and new samples were withdrawn at the same times (lanes 5-7, respectively). RNA samples were extracted and separated by electrophoresis in a denaturing formaldehyde gel, transferred to nylon membrane and probed with [α -³²P] radiolabelled full length *gnn* cDNA. (B) Loading control showing the 28S rRNA after ethidium bromide staining of the same gel. (C) Densitometric analysis of the relative induction.

FIG. 5. Self-glucosylation assay of the entire GNN and truncated proteins. The purified GST-fusion proteins were incubated for 20 min with UDP-[U-¹⁴C]glucose in the presence or in the absence of Mn²⁺ as described in Materials and Methods. 1, 2- GST-GNN; 3, 4- GST-GNNΔ360; 5, 6- GST-GNNΔ306; 7, 8- GST-GNNΔ245. Samples (0.2 μg) were separated by 9% SDS-PAGE gel stained with Coomassie blue (A), and subjected to autoradiography (B). The numbers show the standard molecular masses (in kilodaltons).

FIG. 6. Elongation of self-glycosylated GNN proteins by glycogen synthase (GS). The GNN proteins were allowed to self-glucosylate for 20 min before addition of purified rabbit muscle glycogen synthase (GS) (A) or recombinant yeast Gsy2p (B), as indicated by the plus sign. Unlabeled UDP-glucose and glucose-6-phosphate were added and the reaction continued for 120 min. Lane C represents a control containing only either GS or Gsy2p. The numbers indicate the molecular masses (in kilodaltons).

FIG. 7. Transglucosylation activity of the GNN proteins. Full-length and truncated GNN proteins were incubated with 10mM *n*-dodecyl β-D-maltoside for 10 min at 30°C in the presence or in the absence of 5 mM MnSO₄. Reaction products were separated by TLC and visualized by autoradiography. Lane C represents a control containing no protein. The carbohydrate standards were detected as described in Cao *et al.* (8).

FIG. 8. Functional complementation of *S. cerevisiae* glycogenin mutant strain by *N. crassa* glycogenin. GNN and truncated forms GNNΔ360, GNNΔ306 and GNNΔ245 were expressed in *glg1 glg2* yeast cells (CC9) from high copy number vector pRS424 under the control of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase promoter. Samples 1 and 2, WT and CC9 strains, respectively, harboring pRS424; samples 3 and 5, WT and CC9 cells, respectively, overexpressing Glg1p; samples 4 and 6, WT and CC9 cells, respectively, overexpressing Glg2p; samples 7 to 10, overexpression of GNN, GNNΔ360, GNNΔ306 and GNNΔ245 in CC9 cells. (A) Iodine staining of colonies grown on SD-Trp plate for 2 days at 30°C. (B) Glycogen content. Glycogen was determined enzymatically as described in Materials and Methods.

GNN 1 -----MAITKGEDVYASLLLNDAVLPALVLAHSLR
M.grisea 1 -----MAVRGAEFAVITLLLSDNVLPALVLAHSLR
A.nidul 1 -----MIAPLPSSFDTDPLLLDPGAVVLAHSLR
Glg2p 1 -----MAKKVAICTLLYSRDYLPGALTLAYQLQ
Glg1p 1 -----MSKQTTISQVGAIAIDIGWPD MFNSGVMM LIPDAD
rabbit 1 -----MTDQAFVTLTTNDAYAKGALVLGSSLK
Human 1 MSETEFHHGAQAGLELLRSSNSPTSASQSAGMTVTDQAFVTLATNDIYCOGALVLGQSLR

GNN 32 DSGTHKKLIAILITPEN-----ISNEVVEQLQTVYDYVIPVETIQ
M.grisea 32 DAGTTRKLIAMVTLDT-----VAAKVITQLKAVDYVIPVPRIR
A.nidul 29 DNGTKAKLIVALYTPDT-----LQAATLNELQTVYDELIPVYRMT
Glg2p 29 KLLKHAVVEDEITLCLLIEKKLF-----GDEFKPEQIALIRSLFKEIITIEPLK
Glg1p 34 TASVLQNYIFENTSIDGSDQGILNQFFNQNCCTDELVKDSFSREWVQLSFTYNVTIPNLG
rabbit 28 QHRTSRRLAVLITPQ-----VSDTMRKALEIVFDEVITVDILD
Human 61 RHRLTRKLVVLIITPQ-----VSSLRVLISKVDFDEVIEVNLID

GNN 71 ND-----R PANLFLMNR PDLHSAFTKIN---LWKQTQFRKIVYIDADVAYRAPDELFD
M.grisea 71 NE-----R PANLYLMNR PDLHSAFTKVN---LWKQTQFSKLVYIDADVAYRAPDELFA
A.nidul 68 NH-----T PANLWLMER PDLIATFTKIE---LWRQTQFKRIVYIDSDVVAIRAPDELFD
Glg2p 78 DQEK SIEKNKANLELLKRPELSHTLLKAR---LWELVQFDQVLF LDADTLPLNKEFF EIL
Glg1p 94 YQ--S---SPAMNYFKPSIKLIHF IGKHKPWSLWSQKNFIKNEYHDQWNEVYEEFK EEHQ
rabbit 66 SG-----D SAHLTLMKRPELGVTLTKLH---CWSLTQYSKCVFMDADTLVLANIDDLFE
Human 99 SA-----D YIHLAFLKRPELGLTLTKLH---CWTLTHYSKCVFLDADTLVLSNVDELFD

GNN 122 I PHA-----F SAAPDIGWPD LFNTGVMVLS PNMGDYYAMLAMAERGISFDGADQGLLNM
M.grisea 122 I AHP-----F SAAPDIGWPD LFNTGVMVLT PNMGDYYAMMAMAERGISFDGADQGLINM
A.nidul 119 M DVD-----F AAAPDVGW PDCFN SGVMVLRPNMQDYFALKALAE RGT SFDGADQGLLNM
Glg2p 135 RLYPEQTRFQIAAVPDI GWPDMFNTGVLL LIPDLDMATSLQDFLIKTVS IDGADQGITFNQ
Glg1p 149 I NNEVS---K PKISDSDKTE TPETITPVDAPPSNEPTTNOEIDTISTVEENVDNQNAEP
rabbit 117 R EE-----L SAAPDPGW PDCFN SGVVFVYQPSVETYNQLLHVASEQGSFDGGDQGLLNT
Human 150 R GE-----F SAAPDPGW PDCFN SGVVFVQPSLHTHKLL LQHAMEHGSFDGADQGLLNS

GNN 176 HFR-----N TYNRLSFTYNVTP-SAHYQYIPAYKHFQSSINLIHF IGSE
M.grisea 176 HFR-----H TYNRLSFTYNVTP-SAHYQYVPAYRHFQSSINMVHF IGSE
A.nidul 173 HFR-----D WHRLSFTYNCTP-SASYQYIPAYKHFQMSPF DSPYNQLL
Glg2p 195 F ENPICNYSKEVLHKVSPLMEWIRLPFTYNVTMPNYGYQSSPAMNFFQQHIRLIHF IGTF
Glg1p 205 V PNS-----D HSPAPNPVPLDFTKWLTTFINKDHLTNQPVNESREYSKEND
rabbit 170 F ENSWA---T TDIRKHL PFIYNLSS-ISIYSYLP AFKAFGANAKVVHFLGQT
Human 203 F ERNWS---T TDIHKHL PFIYNLSS-NTMYTYS PAFKQFGSSAKVVHFLGSM

GNN 219 K PWVQGR TQTGSST--YDEMIGRWWAVYDRHYRG-----NSNKT TDVVQKFVKG EQQ-
M.grisea 219 K PWIQGR NSTAGGGA--FDEMVG RWWAVYDRHYRAPT VYEPQVQRPEIVQKFV R GKYQP
A.nidul 215 G RWWTVYDRHYHSVANETIEPSSH SVPPHVQHAE EPM LDMHIHNF PVTAPQQHIGRQTPL
Glg2p 255 K PWSRN-----T TDYDDHY YQ-----LWRSTQR-
Glg1p 251 N NIINS-----S SNRDQESPP-----NSTQELNS
rabbit 218 K PWN-----Y TYDTKT-----KSVRSEG--
Human 251 K PWN-----Y KYNPQS-----GSVLEQGS-

GNN 270 -----
M. grisea 277 PSTYTVAVGQQPQ----ISLQPPSPTPESQQSSIHNSQQYQQQHIYDNGQHSLSNYGT
A. nidul 275 LPGSETTSRHPALGHEVPSDQHPDYHPPEEASNNSVQASHYAERSVAPLPVKDLSHEIHA
 Glg2p 278 -----
 Glg1p 275 -----
 rabbit 236 -----
 Human 270 -----

GNN 270 -----QQQQQQQRNVSFQLPSSQSHKTQSHQTQSQNTHSTYTSHG----
M. grisea 333 EHSPTQEHRHRESHHHHRQDEHNRYGHI PGSPGTSHAHVPQVEESHTSPCFFSTASP
A. nidul 335 EYQSEKPSHEPVFSVVPQYVRGEEHVRAIQQQPVQEHSHDLQPPPQEPSVPTEPAHP
 Glg2p 278 -----
 Glg1p 275 -----
 rabbit 236 -----
 Human 270 -----

GNN 310 -----ASWDASRHSPPAGSKPEAANF
M. grisea 393 ASSSGANAPQGHYQEHQQDQAPHQAHEPEPEKPPPPMEPSWDAQRQPPPPESKPEALNF
A. nidul 395 FEQNDSTRTRAPAPIG--TQRAPSPQPASQEEPIFEAPKAEWASREPPPLNSKPEGIAL
 Glg2p 278 -----
 Glg1p 275 -----
 rabbit 236 -----
 Human 270 -----

GNN 331 PQTHYTMSNTQQFVPPARYPSPPKDMWYKVPEAAPT---QKPAPIFPWEKQAPEPTRVF
M. grisea 453 PKMHYEMSSDTSFAFVPPQRYPSPPKNMYEVPQHPPAPPEQKPPAIFPWEMNRPQASRVF
A. nidul 453 ESKTYTMSDDRKLFPQPSYPEAPKNMYQVPETKPKP--QKLRQIFPWETNAPKPTRVF
 Glg2p 278 -----ELYSECHLSNYFTHLQLGNIETETN-----
 Glg1p 275 -----SYSVNSTQADSDEHQNAEEEDSTTDNAS-----
 rabbit 236 -----HDPMTTHPQFLNVWWDIFTISVVP-----
 Human 270 -----VSSSQHQAFLHLWWTVYQNNVLP-----

GNN 388 PEPPPEQGKLSAASTATPSAVASATASPTLE-PKSEAVTPTTPASANPWTSTFTTRGN--A
M. grisea 513 INDDVGPVEAEKSPTAEETAAFQESVEPASEEPRPIPTSPPIQQTSNPWESFSLTN---A
A. nidul 511 ADDAS-----QHQPMSLTPTEEDSQIFKSTQPTFWKSEAPSLPSESFDSYSRSNA
 Glg2p 303 -----FYHEPPCLQDLLNHCKR---E---NQKHVDLDITSVDRNASQKS
 Glg1p 303 -----NSGEESHLDLSTAASS---NNVSNQPDGKNFNSKENNISVES
 rabbit 260 -----LLQQFGLVQDTC SYQH-----VEDVSGAVSHLSLGET--P
 Human 294 -----LYKSVQAGEARASPCHT-LCHSDVGGPCADSASGVGEPCENST--P

GNN 445 WDDVPEINRYVDALQKHRRSG-----SKGSAAATSRPTSPGRAQSRSRKS-----
M. grisea 570 WDDVPGINRYVGAIQKSQQRNLSKSAGLSLGNLDDTREAQKELEAALSRRGS-----
A. nidul 562 WDEVPEIQKYIRSIQQARRARVQVLSGAPNQQAAPSKSSRQHQPPTTTTIGSKGPNY
 Glg2p 341 TAEKHDIEKPTS-----
 Glg1p 345 SPSNPEQKRSTDNIQKPSVSTN-----DLPDDVEPHTSVDDNIQYLEKDKE-----
 rabbit 293 ATTQPFVSS-----
 Human 337 SAGVPCANSPIGSNQPAQGLP-----EPTQIVDETLSPGRRS-----

```

GNN      490  -SRVTDFPTEDDRPSLTVTPAPIQGRSS-----RGENERQFPAAAGV
M.grisea 623  -TKLTDFPVD--RPSLPVTPAPVRRSNFWGGAADSPKNGGSSVGAVPEGGRRQLFPAAEGV
A.nidul  622  GTRITDFPSEIERPSLPVTPAPIRRGPAVG-----N----PDDYTTPQFPAAKGV
Glg2p    353  -----
Glg1p    391  --GYEEFLPDVYESNAIDNEEEFFDDDDAR-----DATEGE
rabbit   302  -----
Human    376  -EDMIACPET--ETPAVITCDPLSQSPSQ-----P----ADFT

GNN      532  PAQSEWNPAVQLEKLAIHQQETLQKLG-----ERPAFGGLAIGTAGKEIPARALP
M.grisea 680  PGQSDWDPVAQLHKLAKQQSELLLQKLGDSLKSEDDGDDGSDGRSVRSQKGGKATMEQV
A.nidul  668  PNQEDWNPTVRL EELR-----
Glg2p    353  -----
Glg1p    424  TKTSAVADKQEDMKLTAEETNQ-----
rabbit   302  -----
Human    407  ETEIILQPAKVESVSSEETFEPSQEL-----PAEA

GNN      582  FGSEDARSPTYVTQY--PSVLSPKPLRAN-----TTGTNSTPSPLPTQP
M.grisea 740  YQDGPVKSPTYIMHASVPTVHSPMPVVRKSPVQSILGEGEAAPRTRRHSRLSTTTTEYG
A.nidul  684  -----
Glg2p    353  -----
Glg1p    446  -----
rabbit   302  -----
Human    438  LRDPSLQDALEVDLA-----VSVSQISIEE-

GNN      624  SVTTAPPSYQGPVAFKCEDFPTHETPALPTEEERDVLET--
M.grisea 800  TDDIERASYNGPGAAWDKCEDIPLRETPMPPTDEL DVLET--
A.nidul  684  -----RRQNIVLDNPNLLIERITRALEDGRDCADLD--
Glg2p    353  -----KPQSAFKFDWEDSTDYLDREVQRAFPKPD T-----
Glg1p    446  -----P--QQEMPNFKFDWEDSDYLSKVERCFPDDIFEYAVE
rabbit   302  -----EERKERWEQQADYMGADSFDNIKKLD TYLQ--
Human    463  --KVKELSP EEERRKWE EGRIDYMGKDAFARIQEKLDRFLQ--

```

Fig. 1, de Paula et al.

A

Intron I

gnn *cgcaaccagacc**cagacactcttcg**cgagaatcgcaacag**ctgacatccccctttcgaa*
 RP-2 *t* *t*

(V)

13 L L L N D A Y L P G A L V L A H S L R D
gnn *tagCTTCTCTTGAATGACG**C**CATACCTTCCCGGTGCTCTGGTTCTTGC**C**CACTCGCTGCCT*
 RP-2 *T*

(L)

(Y)

33 S G T H K K L A I L I T P E N I S N E V
gnn *GATTCGGCACCC**C**ACAAGAAGCTCGCTATCTTGAT**C**ACCCCCGAAAATATCTCCAACGAG*
 RP-2 *T* *T*

(*)

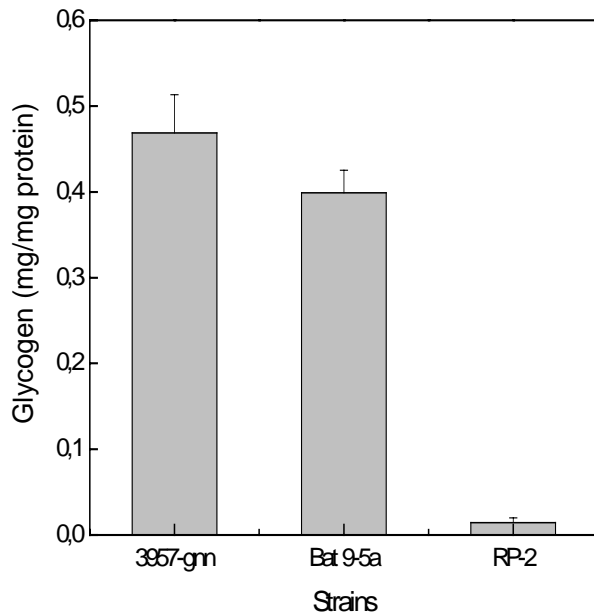
Intron II

53 V E Q L Q T
gnn *GTTGTGGAAC**C**AGCTCCAAAgtaagcctgtccacc**c**cagctccagacttcaatctccaaag**ca*
 RP-2 *T* *t* *t*

(V)

59 V Y D Y V I P V E T I
 WT *aaacgcatggctaactcccgacaagac**C**CGTTTATGACTATGT**C**ATTCCCCTCGAAACCA*
 RP-2 *T*

B



C

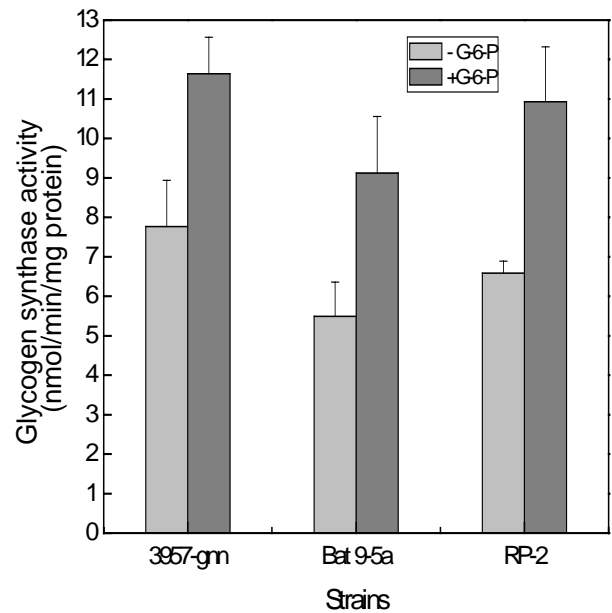


Fig. 2, de Paula et. al.

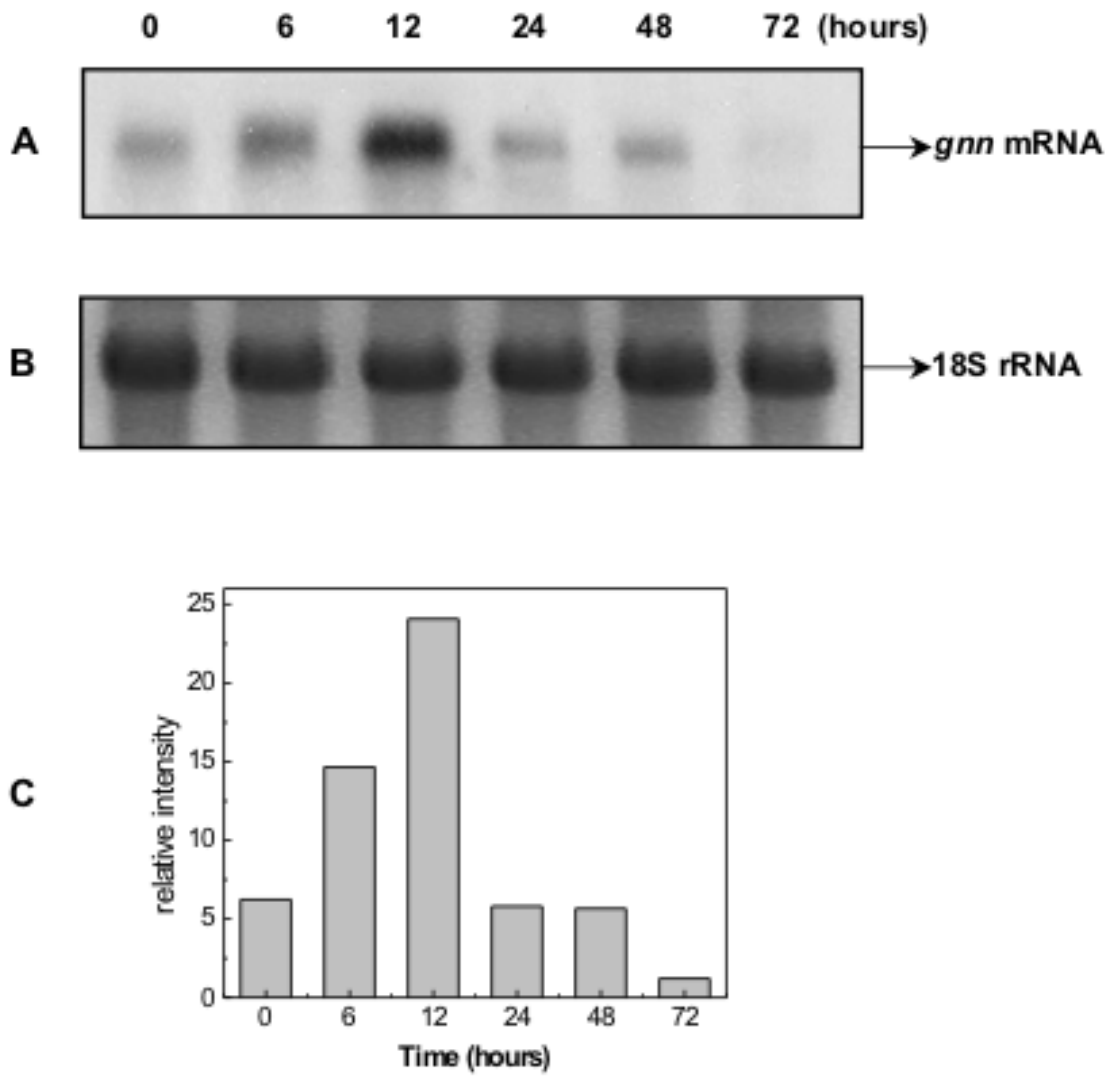


Fig. 3, de Paula *et al.*

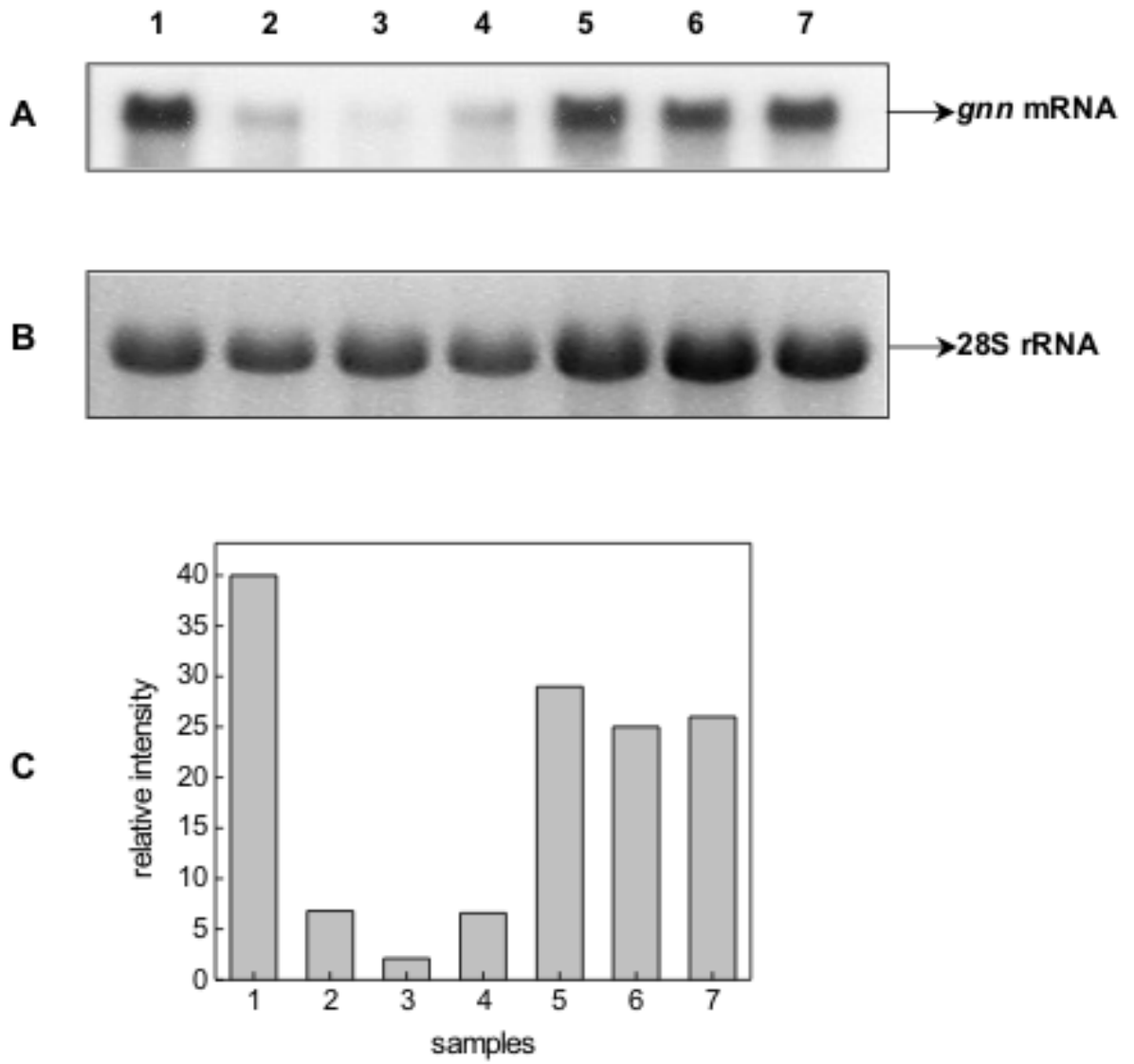


Fig. 4, de Paula *et al.*

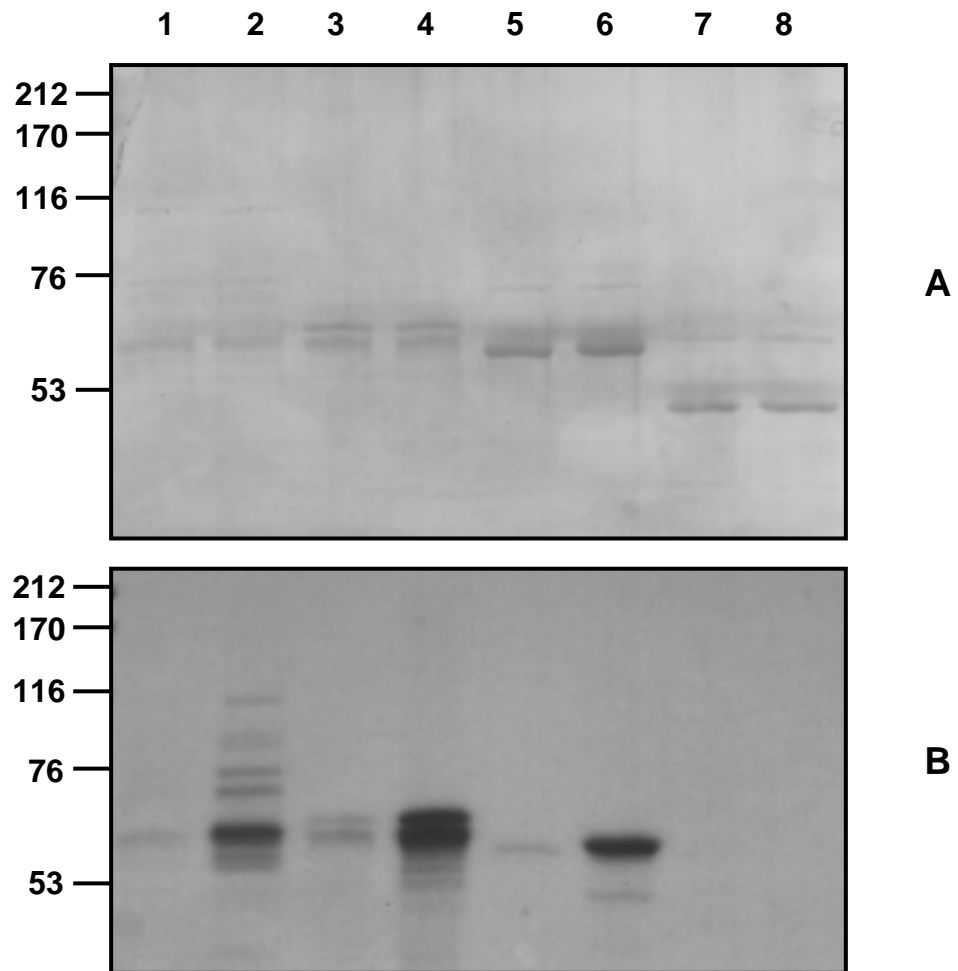


Fig. 5, de Paula *et al.*

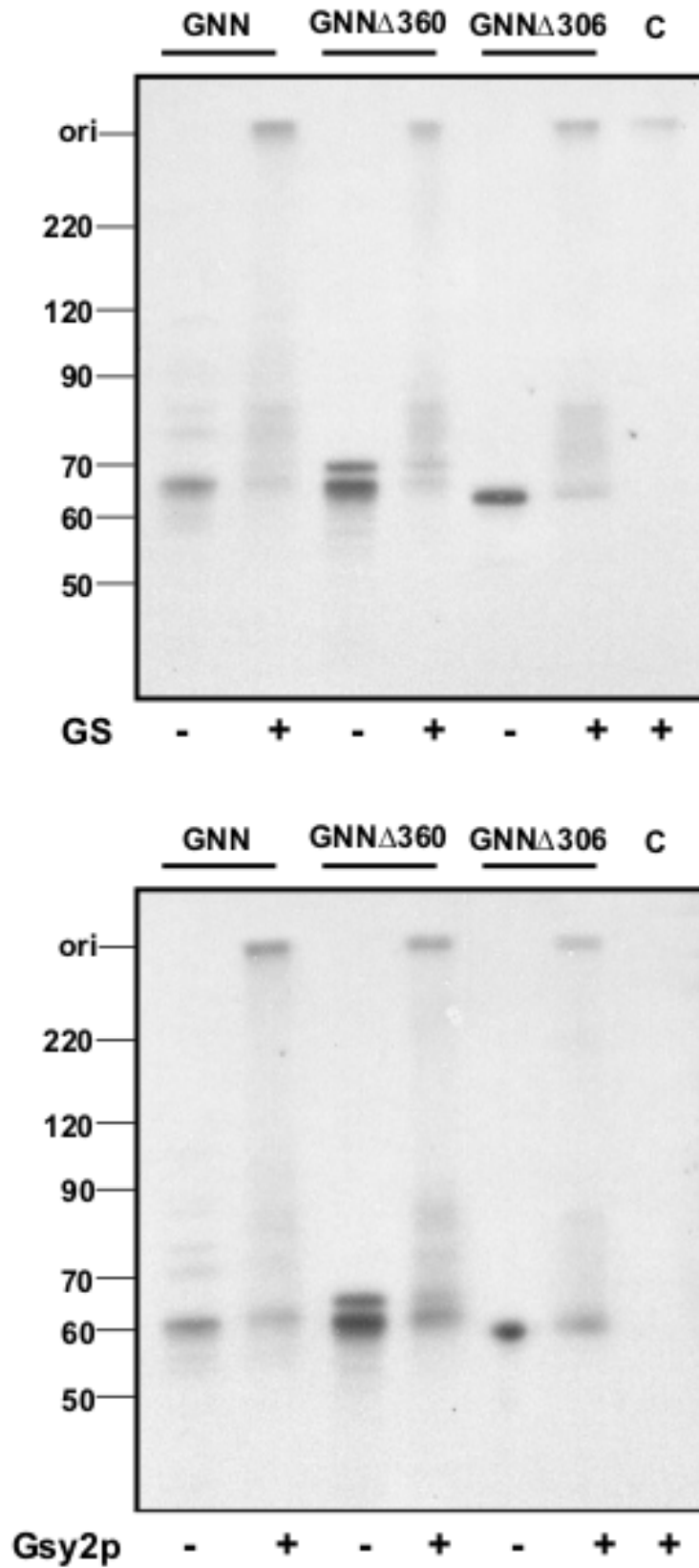


Fig. 6, de Paula *et al.*

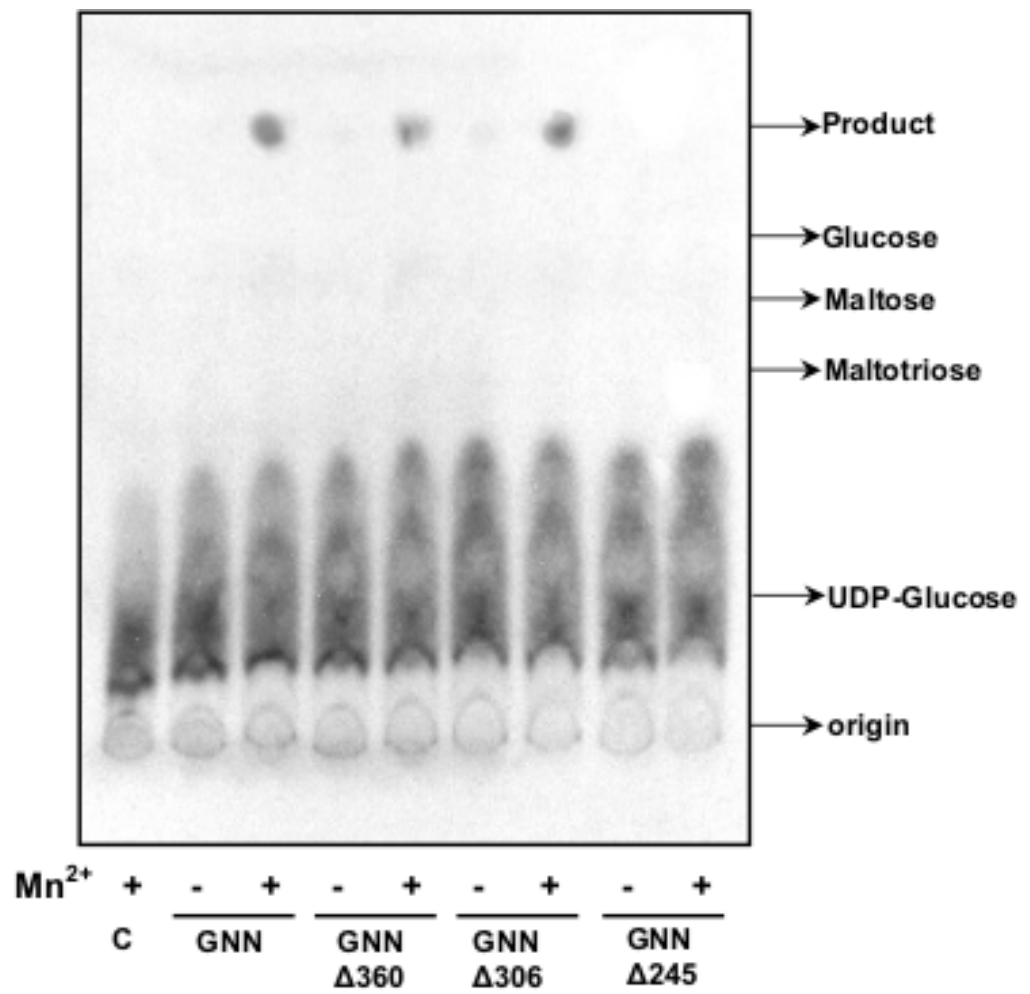


Fig. 7, de Paula *et al.*

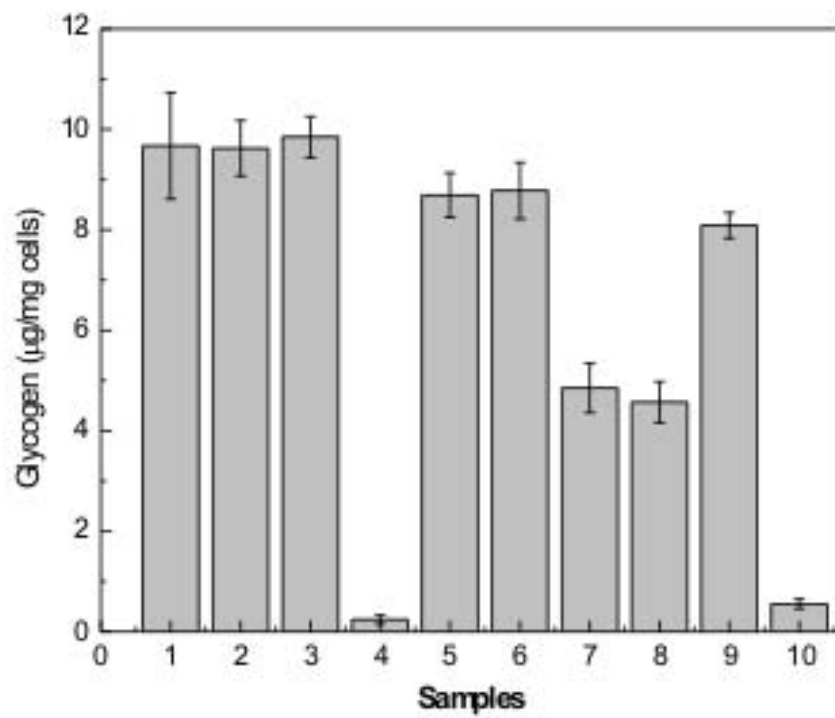
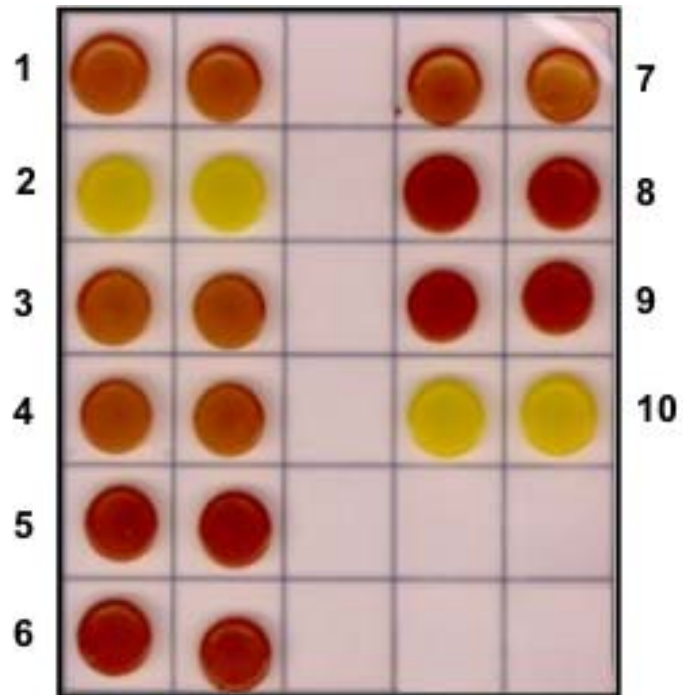


Fig. 8, de Paula *et al.*

Biochemical characterization of the GNN, the protein involved in the initiation of glycogen synthesis in *Neurospora crassa*

Author's names: Renato Magalhães de Paula, Wayne A. Wilson[‡], Peter J. Roach[‡], Héctor Francisco Terenzi[§] and Maria Célia Bertolini

Address: Instituto de Química, UNESP, Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química, 14800-900, Araraquara, SP, Brazil

[§]Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras, USP, Departamento de Biologia, 14040-901, Ribeirão Preto, SP, Brazil.

[‡]Indiana University School of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology, 46202-5122, Indianapolis, IN, USA

Running title: *Neurospora crassa* glycogenin

Corresponding author: Maria Célia Bertolini

Instituto de Química, UNESP
Departamento de Bioquímica e Tecnologia Química
R. Professor Francisco Degni, s/n
14800-900, Araraquara, SP, Brazil
Phone: 55-16-201-6675
Fax: 55-16-222-7932
e-mail: mcbertol@iq.unesp.br

ABSTRACT

In a previous work we described the isolation of the cDNA *gnn*, which encodes the protein glycogenin in *Neurospora crassa* (GNN). Glycogenin protein acts in the initiation step of glycogen biosynthesis by catalyzing the self-glucosylation reaction to generate an oligosaccharide primer needed for growing the glycogen molecule, through the action of the glycogen synthase enzyme. GNN is one of the largest glycogenin already isolated (664 amino acid residues, MW of 73 kDa), and was shown to exhibit high proteolysis towards C-terminus leading to a stable, and still active, specie of around 36 kDa. This work presents more detailed studies on this protein confirming its role in the glycogen biosynthesis. Similar to the rabbit protein, GNN showed a very low K_m (4.41 μ M) towards the substrate UDP-glucose. GNN was produced in *E. coli* and analysis by mass spectroscopy, after trypsin digestion, identified a peptide containing an oligosaccharide chain attached to Tyr196 residue. Site-directed mutagenesis to Phe confirmed the participation of this residue in the GNN self-glucosylation and indicated the Tyr198 residue as an additional, although less active, glucosylation site. The importance of these residues in the GNN activity was confirmed by complementation of a yeast mutant strain lacking both *glg1* and *glg2* genes, and thus, unable to accumulate glycogen. GNN was capable to restore the glycogen levels very close to the wild-type strain, and mutation in both Tyr residues (GNNY196/198F) completely eliminated the glycogen accumulation in the mutant strain. The physical interaction between GNN and glycogen synthase (GSN) was analyzed through the two-hybrid assay. While the entire GSN was required for full interaction, the C-terminus in GNN was more implicated in the interaction. Furthermore, mutation in the GNN glucosylation sites did not impair the interaction with GSN.

Abbreviations: DTT, dithiothreitol; GPD, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; GNIP, glycogenin-interacting protein; GS, glycogen synthase; GST, glutathione-S-transferase; HEPES, N-(2-Hydroxyethyl) piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid); MW, molecular weight; ORF, open reading frame; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; PBS, phosphate buffered saline; PCR, polymerase chain reaction; PMSF, phenylmethylsulfonyl fluoride; SDS, sodium dodecyl sulfate; TLCK, N-*p*-tosyl-L-lysine chromomethyl ketone; UDPG, uridine diphosphoglucose; VM, Vogel minimum; WT, wild type

INTRODUCTION

Glycogen, a polymer of glucose, is one of the most important storage carbohydrates in a wide range of species. Its biosynthesis involves three enzymes: glycogen synthase (EC 2.4.1.11), branching enzyme (EC 2.4.1.18), and glycogenin (EC 2.4.1.186), a self-glucosylating protein, which acts in the first step of glycogen biogenesis (Alonso *et al.*, 1995a). Glycogenin has the ability to self-glucosylate, via a 1-O-tyrosil linkage (Rodriguez and Whelan, 1985), and to polymerize an oligosaccharide up to 10 residues (Smythe and Cohen, 1991). Once glucosylated, glycogenin acts as the substrate for elongation by glycogen synthase (Lomako *et al.*, 1988), which catalyses the formation of α -1,4-glycosidic bonds. Both enzymes require the sugar-nucleotide UDP-glucose as substrate. The bulk synthesis of glycogen is completed by the action of the branching enzyme, which introduces branch points, through the formation of α -1,6-glycosidic bonds (Caudwell and Cohen, 1980).

The mechanisms that control glycogen synthesis have been extensively studied and most of the knowledge has been accomplished by studies on mammalian and yeast cells. Rabbit skeletal muscle glycogenin is self-glucosylated in the residue Tyr194, and mutation of this residue led to a protein unable to attach glucoses to itself (Cao *et al.*, 1993a). In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, two genes, *GLG1* and *GLG2* encoding the glycogenin like-proteins, Glg1p and Glg2p were identified (Cheng *et al.*, 1995). In contrast to mammalian glycogenin, Glg proteins possess multiple tyrosine residues involved in self-glucosylation and mutation in all are necessary to inactivate the self-glucosylation, and therefore, for complete abolishment of glycogen accumulation (Mu *et al.*, 1996).

The tri-dimensional structure for rabbit skeletal muscle glycogenin, recently solved to 1.9 Å, has provided insights into catalytic mechanism of this enzyme (Gibbons *et al.*, 2002). The overall fold is very similar to structures of glycosyltransferase family proteins to which glycogenin belongs. The glycogenin behaves as a dimer in solution (Smythe *et al.*, 1990) existing as a pentamer of dimers in the crystals, although the biological relevance of such arrangement may be discussed. The dimeric form of the enzyme is important for function, since mutational studies support a model involving dimeric molecules, that is, within a dimer one subunit transfer glucose to another in a intersubunit reaction (Cao *et al.*, 1995). However, the structure model proposed by Gibbons *et al.* (2002) does not support the intersubunit reaction because of the distance between the residue Tyr194 and UDP-glucose in the active site. Thus, the catalytic mechanism is still unsolved. Besides the ability to self-glucosylate, glycogenin is also able to transfer glucose residues to other small acceptors, in a trans-glucosylation reaction (Alonso *et al.*, 1995b). However, there are no reports describing the physiological relevance of this activity. Both self- and trans-glucosylation activities are strongly enhanced by the presence of Mn^{2+} ions (Lomako *et al.*, 1988).

In a previous study we described the isolation and characterization of the *gnn* cDNA, which encodes the glycogenin-like protein GNN in the filamentous fungus *Neurospora crassa* (de Paula *et al.*, 2004). Expression of GNN in *E. coli* cells resulted in a protein very susceptible to proteolysis leading to lower MW species that remained mostly the glycogenin-related activities, such as the self- and trans-glucosylation activities and the ability to act as substrate for glycogen synthase. Different forms of recombinant GNN, truncated at their C-terminal ends were more stable against proteolysis and were still active. We have also demonstrated that the full-length and truncated proteins were capable to recover the glycogen defect phenotype of a *S. cerevisiae* mutant strain, lacking both *GLG1* and *GLG2* genes. Our results indicated that the GNN C-terminus region was not required for most of the glycogenin activity.

In the present work we have extended the functional characterization of the GNN protein by studying its biochemical properties. We have identified the tyrosine residues Tyr196 and Tyr198 as the glucosylation sites and determined the contribution of each residue in the self-glucosylation activity. We also analyzed the physical interactions between GNN and glycogen synthase (GSN) (de Paula *et al.*, 2002) by the yeast two-hybrid assay, to identify the regions in glycogenin important for interaction with glycogen synthase. Our results demonstrate that the C-terminus extension of GNN contributes to the interaction with glycogen synthase, although the same region was not important for functional activities, as we previously demonstrated (de Paula *et al.*, 2004). Furthermore, the glucosylation status of GNN seems not to interfere in the interaction with glycogen synthase.

MATERIALS AND METHODS

Yeast strains, plasmid constructions and site-directed mutagenesis

Saccharomyces cerevisiae strains EG328-1A (*MAT α trp1 leu2 ura3-52*) and CC9 (*MAT α trp1 leu2 ura3-52 glg1-2::LEU2 glg2::URA3*) were used in the complementation assays, and strain pJ64-4A (James *et al.*, 1996) was used in the two-hybrid assay. Plasmid pRS424-GPD was used for expression of the Glg1 and Glg2 proteins (Cheng *et al.*, 1995), and the GNN Δ 306, GNN Δ 306Y196F and GNN Δ 306Y196/198F proteins (de Paula *et al.*, 2004) in yeast cells. The plasmids were transformed into yeast cells by lithium acetate method (Schiestl and Gietz, 1989) and clones were selected by growth on synthetic medium lacking tryptophan (SD-Trp). The plasmids pGBT9 and pGAD424 were used for expression of the whole and truncated forms of GSN and GNN, respectively, in the yeast two-hybrid assay. Plasmid pGEX-4T1 was used for production of GNN Δ 360 and GNN Δ 306 proteins in *E. coli*.

Two-step PCR (Ausubel *et al.*, 1996) was used to mutate Tyr196 and Tyr198 to Phe in GNN Δ 360 and GNN Δ 306. The plasmid pMOS-GNN (Amersham) containing the whole cDNA sequence encoding GNN was used in the first PCR reaction. To perform Tyr196Phe mutation two DNA fragments were initially amplified by the primers T7 promoter (5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3')/GNNY196F-R (5'-GGCCGGGATGTACTGGAAGTGGGCGGAGGGCGT-3') and GNNY196F-F (5'-ACGCCCTCCGCCCACTICCAGTACATCCCGGCC-3')/U18 (5'-GTTTTCCAGTCACGACG-3'). For the double mutation Tyr196/198Phe, the two fragments were amplified by the primers GNNY196/198F-F (5'-CTCCGCCCACTTCCAGTICATCCCGG-3')/U18 and GNNY196/198F-R (5'-CCGGGATGACTGGAAGTGGGCGGAG-3')/T7. The mutant nucleotides are underlined. The second PCR used the primers GNN-EcoF (5'-GAATTCATGGCGATCACCAAAGGA-3') and GNN Δ 3-R (5'-TGGTGTAGGTGCTATGGG-3'), and the amplified products were digested with *Cla*I and *Sac*II. The resulting 400 bp fragments were ligated into pGEX-GNN Δ 360 and pGEX-GNN Δ 306, previously digested with *Cla*I and *Sac*II, generating pGEX-GNN Δ 360Y196F, pGEX-GNN Δ 360Y196/198F, pGEX-GNN Δ 306Y196F and pGEX-GNN Δ 306Y196/198F plasmids.

Production, purification and analysis of mutant GNN proteins

The GNN proteins were expressed in *E. coli* BL21 as GST-fusion proteins in 500 mL LB medium. Cells were grown at 37 °C to an OD~7.0 and induced by addition of 0.1 mM final concentration IPTG for 3 h at 30 °C. Cells were collected by centrifugation and resuspended in homogenizing buffer (1 x PBS, 1 mM PMSF, 1 mM benzamidine, 5 mM DTT, 0.1 mM TLCK, 1

µg/mL pepstatin and aprotinin). Cells were broken by two passages through a French Pressure cell at 18,000 psi. The supernatant was clarified by centrifugation at 18,000 rpm for 20 min and subjected to affinity chromatography in GSTrap column (1mL) in an Äkta Prime Protein Purification System (Amersham). The recombinant proteins were eluted with 10 mM reduced glutathione and dialyzed against 1L of homogenizing buffer. Self-glucosylation reaction was carried out using 0.8 µg of protein in 50 mM HEPES, pH 7.6, 5 mM MnSO₄, 2 mM DTT, and 19 µM UDP-[U¹⁴C]glucose (263 mCi/mmol) at 30 °C. An aliquot (3 µL) was removed from the reaction, spotted onto 2 x 2cm square P81 chromatography paper and submitted to three washes (30 min each) in 0.5% phosphoric acid and once in ethanol. The papers were dried and counted in a liquid scintillation counter. The remaining reaction was stopped by addition of 4X SDS-PAGE sample buffer and subjected to SDS-PAGE. The gel was stained, destained, rinsed in water and then in Fluoro-Hance. The gel was dried and autoradiographed.

The mutant proteins (GNNΔ306, GNNΔ306Y196F, and GNNΔ306Y196/198F) were also analyzed by the ability to complement the *S. cerevisiae* strain CC9 lacking both *GLG* genes. Expression of either *GLG1* or *GLG2* genes was used as positive control and complementation was followed by analysis of glycogen content. Qualitative glycogen measurement was performed by spotting 5 µL of a stationary phase culture on SD-Trp plates. Patches were grown for 2 days at 30 °C and then inverted over iodine crystals for detection of glycogen accumulation. Quantitative glycogen measurement was performed as described by Hardy and Roach (1993).

Mass spectrometry analysis

Recombinant GNNΔ360 protein was produced in *E. coli* fused to GST and purified by affinity chromatography. Purified GST-GNNΔ360 was allowed to self-glucosylate (de Paula *et al.*, 2004) and subjected to SDS-PAGE. The corresponding band was excised from the gel and subjected to in-gel trypsin digestion. The resulting peptides were recovered from the gel slices and analyzed by MALDI-TOF mass spectrometry.

GSN and GNN plasmid constructions for two-hybrid assays

The entire coding sequence of *gnn* cDNA (de Paula *et al.*, 2004) was amplified and inserted into pGAD424 vector leading to the pGAD424-GNN plasmid. The truncated GNN proteins GNNΔ613, GNNΔ545, GNNΔ360, GNNΔ306, and GNNΔ245 were prepared by amplifying the DNA fragments with the sense primer GNN-EcoF (sequence above) and antisense primers containing stop codon at internal positions of the cDNA, and then, insertion of

the fragments into pGAD424 plasmid. The pGAD424-GNN490-664 and pGAD424-GNN337-664 plasmids were constructed by amplification of the sequences using internal primers in the *gnn* cDNA sequence and the antisense primer NcGN-3R (sequence above). *EcoRI/SacII* DNA cassettes from pGEX-GNN Δ 360Y196F and pGEX-GNN Δ 360Y196/198F were exchanged into pGAD424-GNN to generate the pGAD424-GNNY196F and pGAD424-GNNY196/198F plasmids, respectively. *EcoRI/SacI* DNA cassettes from pGEX-GNN Δ 360Y196F and pGEX-GNN Δ 360Y196/198F were exchanged into pGAD424-GNN Δ 306 to construct the pGAD424-GNN Δ 306Y196F and pGAD424-GNN Δ 306Y196/198F plasmids, respectively. The pGBT9-GSN plasmid resulted from insertion of the entire ORF of the *gsn* cDNA, amplified with the oligonucleotides GSNth-F (5'-GAATTCATGGCCCACGACAACCGTG-3')/GSNth-R (5'-CTGCAGTTACCTGGTGCCGTTG-3') (de Paula *et al.*, 2002), into pGBT9 vector. cDNAs encoding the truncated GSN proteins GSN Δ 387 and GSN Δ 624 were constructed by PCR amplification using the oligonucleotide GSNth-F and antisense oligonucleotides containing stop codon, and inserting the fragments into pGBT9 plasmid. Sense oligonucleotides hybridizing at internal sequences of the *gsn* cDNA and the antisense oligonucleotide GSNth-R were used to amplify DNA fragments encoding the proteins GSN150-706 and GSN347-706, and insertion of the DNA fragments into pGBT9 vector.

Yeast two-hybrid assay

To analyze the interactions between GSN and GNN proteins, pGBT9-GSN plasmid was co-transformed with all the pGAD424-GNN constructions in the yeast strain PJ69-4A. In the same way, pGAD424-GNN plasmid was co-transformed with all the pGBT9-GSN constructions. The transformants were selected by plating on the selective medium SC-Trp-Leu and after on SC-Trp-Leu-His+5mM 3 aminotriazol (3-AT) plates. Quantitative analysis was performed by liquid β -galactosidase assay from cells collected after 24 h of growth in liquid cultures.

RESULTS

Kinetics of GNN

In a previous work we described the isolation of the *N. crassa gnn* cDNA and demonstrated that the protein (GNN) had several properties associated to glycogenin-like proteins (de Paula *et al.*, 2004). Here, we have extended the biochemical and functional characterization of GNN. Initially, we determined the kinetic properties of GNN by using a truncated protein, which lacks 358 amino acid residues from the C-terminal region (GNN Δ 306). This protein was produced in *E. coli* as a GST-tagged protein. Fig. 1A shows the time course of the self-glucosylation reaction when the recombinant protein was incubated in the presence of UDP-[U- 14 C]glucose and subsequently analyzed by SDS-PAGE. The reaction progressed linearly up to 20 min reaching a constant incorporation rate after this time. A slightly reduction in mobility was observed as function of the incorporation of glucose residues. Moreover, the recombinant protein self-glucosylated with a K_m towards the substrate UDP-glucose of about 4.41 μ M (Fig. 1B). This value is similar to that observed for rabbit muscle glycogenin (4.5 μ M) (Cao *et al.*, 1993a).

Analysis of GNN self-glucosylation site

To determine the acceptor site of glucose in the self-glucosylation reaction, we used the GNN Δ 360 protein fused to GST. This protein still shows a proteolytic degradation resulting in an additional specie of lower MW. The GST-GNN Δ 360 was allowed to self-glucosylate and the band corresponding to the non-proteolysed protein was excised from the SDS-PAGE gel, and analyzed by MALDI-TOF mass spectroscopy after trypsin digestion. A peptide corresponding to amino acid residues 179-203 (NTYNRLSFTYNVTPSAHYQYIPAYK) was identified in GNN to be modified by addition of glucose residues. This peptide still contains an arginine residue (Arg183) that is, most likely, a missed site for trypsin cleavage. This peptide contains the Tyr196 residue that aligns with Tyr194 and Tyr232, which were demonstrated to be the glucosylation sites in the rabbit skeletal muscle glycogenin (Cao *et al.*, 1993a) and in the yeast Glg2p (Cheng *et al.*, 1995) proteins, respectively. The mass spectrum (Fig. 2) indicated the presence of a peak corresponding to the parent peptide (3013.38 atomic mass observed) and seven additional ions of higher mass. The peaks represented a successive increase of 162 mass units, what corresponds to the mass difference of one additional glucose residue. The signal corresponding to +7 glucoses is considerably weak and the most prominent peak corresponded to the parent peptide plus two glucose residues. Sequencing of the peptide showed that the Tyr196 residue was the modified residue.

Analysis of mutant GNN proteins

Site-directed mutagenesis was used to generate GST-GNN Δ 360 and GST-GNN Δ 306 proteins containing both residues Tyr196 mutated to Phe. Self-glucosylation assay of both mutant forms revealed a residual incorporation of ^{14}C -radiolabelled glucose in the GST-GNN Δ 360Y196F protein (Fig. 3A, lane 4), not present in the GST-GNN Δ 306Y196F protein (Fig. 3B, lane 4). This result suggested the existence of other residue that could be a secondary glucosylation site in GNN and prompted us to look for it. The double mutant GST-GNN Δ 360Y196/198F and GST-GNN Δ 306Y196/198F proteins were generated by site-directed mutagenesis and produced in *E. coli*. The additional radiolabelling incorporation observed in the mutant GST-GNN Δ 360Y196F was missed in the double mutant GST-GNN Δ 360Y196/198F (Fig. 3A, lane 6). As expected, no incorporation was seen in the double mutant GST-GNN Δ 306Y196/198F (Fig. 3B, lane 6). Quantitative analysis of incorporation revealed that the rate of self-glucosylation of GST-GNN Δ 360 and GST-GNN Δ 306 proteins were approximately 16.81 and 9.95 nmol/min/mg, respectively, while in the mutant GST-GNN Δ 360Y196F this value was approximately 1.42 nmol/min/mg (Fig. 3C). Double mutants containing both Tyr196Phe and Tyr202Phe mutations were also generated, but analysis of the mutants showed no incorporation at the Tyr202 residue (data not shown). These results showed that GNN contains two glucosylation sites, which explain for different levels of glucosylation.

The existence of two glucosylation sites in GNN was also analyzed *in vivo*, by expression of the mutant forms of GNN Δ 306 in a yeast strain (CC9) lacking both glycogenin genes (*glg1 glg2*). Figure 4 shows the glycogen accumulation by the cells complemented with GNN Δ 306 and the mutant proteins GNN Δ 306Y196F and GNN Δ 306Y196/198F (Fig. 4A). Expression of the truncated protein GNN Δ 306 was able to restore the glycogen pools close to the physiological levels when compared to both WT and CC9 cells expressing either *GLG1* or *GLG2* genes. Expression of the single mutant GNN Δ 306Y196F correlated to a reduced but substantial glycogen accumulation, corresponding to 30% of the glycogen content in the cells complemented with the WT GNN (Fig. 4B, lane 6). Moreover, no glycogen accumulation was detected when the double mutant protein GNN Δ 306Y196/198F was expressed in the mutant cells. This result confirmed that both Tyr196 and Tyr198 residues in GNN protein are the physiological glucosylation sites *in vivo*.

Physical interactions between glycogenin and glycogen synthase

We have performed an extensive study to map the regions that might be important for physical interaction between glycogenin (GNN) and glycogen synthase (GSN). For this purpose, we generated deletions in both proteins and used the yeast two-hybrid assay to evaluate the possible domains involved in the GNN-GSN interaction. Figure 5A shows a schematic representation of the truncated forms that were assayed. In one set of assays, GSN protein was used as bait with a series of truncated GNN proteins as the catch, and the interactions were evaluated by quantifying the β -galactosidase assay (Fig. 5B). Entire GNN and GSN proteins interacted strongly to each other, as expected. In GNN, deletion of the 51 (GNN Δ 613) and 119 (GNN Δ 545) C-terminal amino acids reduced the interaction between the two proteins to about 82 and 69%, respectively. Moreover, truncated proteins GNN Δ 360, GNN Δ 306, and GNN Δ 245 showed lower interaction, about 10% of the total activity. On the other hand, a polypeptide comprising only the C-terminus of GNN (GNN490-664), showed very low activity, but the activity was slightly increased when this region was enlarged, spanning from residue 337 to 664 (GNN337-664). All these results suggested that the GNN C-terminal region is necessary, and is the most important region in GNN involved in the interaction with GSN. Finally, the interaction between the two proteins was barely affected by mutations in one or both glycosylation sites, demonstrating that the glycosylation status of glycogenin must not be important in the interaction with GSN.

In another set of experiments, GNN was used as bait and four deletions in GSN were assayed. N- and C-terminal regions (GSN Δ 387 and GSN347-706) were individually assayed and both were very important for the interaction with entire GNN. None interaction was observed with each region individually. Similarly, no interaction was detected when the first 149 were removed. However, a good interaction was detected with the protein truncated in the last 82 C-terminal amino acids (around 30% of the total activity). All results together suggest that the whole GSN protein might be important in the interaction, having the C-terminal end an important role. The presence of all proteins were confirmed by Western blot analysis using either anti-GNN or anti-GSN antibodies (data not shown), in order to exclude the possibility of lacking of either bait or catch proteins.

DISCUSSION

Glycogenin proteins have an important role in the initiation step of glycogen biogenesis in a wide range of organisms. In a previous study, we described the cloning of a cDNA, called *gnn*, which encodes for a glycogenin-like protein (GNN) in the fungus *Neurospora crassa* and demonstrated that the protein had several activities related to glycogenin (de Paula *et al.*, 2004). The main objective of the present study was to extend our earlier characterization of the protein GNN. The recombinant GNN protein was very susceptible to proteolysis toward C-terminus, resulting in smaller polypeptides that retained most of the activities. Since GNN is one of the largest glycogenin-like protein already isolated, we hypothesized that the long C-terminal region might not be important for the glycogenin activities. To confirm this hypothesis, we extended the biochemical analysis of GNN and performed an accurate mapping on the regions important for the interaction between glycogenin and glycogen synthase.

The kinetic data on the self-glucosylation activity of GNN are in agreement with data described for rabbit muscle (Cao *et al.*, 1993a) and yeast (Cheng *et al.*, 1995) glycogenins. The K_m value is low (4.41 μ M), similar to the rabbit protein (4.5 μ M), and the self-glucosylation reaction is activated by Mn^{2+} ions. In order to determine the possible glucosylation sites in GNN, we performed mass spectrometry analysis after GNN self-glucosylation. Due to the high proteolysis of the entire protein, we used a truncated form of GNN (GNN Δ 360), which lacks 304 amino acids from the C-terminal region (de Paula, *et al.*, 2004). This form still proteolyzes, showing an additional band as proteolysis product that did not interfere in the stoichiometry of the self-glucosylation reaction. The mass spectrometry analysis of glucosylated protein revealed basically one peptide (amino acid residues from 179 to 202) bearing 7 glucose residues attached. Within this peptide, five tyrosines residues were present (Tyr181, Tyr188, Tyr196, Tyr198 and Tyr202), and the Tyr196 residue was demonstrated to be the site for the oligosaccharide chain linkage. This residue aligns with Tyr194 in rabbit muscle glycogenin and with Tyr232 in the yeast Glg2p isoform, the physiologically modified residues in these organisms.

Mutation of Tyr196 to Phe both in GNN Δ 360 and GNN Δ 306 (a shorter polypeptide, no susceptible to proteolysis) was not enough to abolish the glucose incorporation. Mutant proteins still retained very low incorporation that was more evident in GNN Δ 360 form, and accounted for 10% of the total incorporation. All other Tyr residues, in the peptide 179-202 were possible candidate sites for glucosylation. Thus, the double mutant proteins (GNN Δ 360Y196/198F and GNN Δ 360Y196/202F) were constructed and analyzed for self-glucosylation. Mutations in both Tyr196 and 198 residues completely abolished the ability to self-glucosylate, suggesting these residues as the sites for glucose attachment in GNN. The yeast Glg2p isoform presents two glucosylation sites (Tyr230 and Tyr232), which are very close apart, but in this protein both sites

contributed equally to the self-glucosylation (Cheng, *et al.*, 1995). The data were corroborated by *in vivo* analysis on glycogen deposition in yeast cells, confirming both residues as physiological sites for self-glucosylation. While expression of GNN Δ 306 protein in glycogenin mutant cells was effective to recover the glycogen pools very close to WT cells, expression of the single mutant GNN Δ 306Y196F correlated to approximately 30% of the amount observed with the WT protein. Furthermore, glycogen was not accumulated upon expression of the double mutant GNN Δ 306Y196/198F protein. Interestingly, the contribution of the Tyr198 to the self-glucosylation reaction was more evident when *in vivo* analysis was performed. Thus, in *S. cerevisiae*, other determinants might contribute for the glycogen biogenesis initiated by GNN proteins. In both analyses the results clearly imply that the two Tyr residues in GNN may function as glucose acceptor, although Tyr196 is the preferred site.

In this work we were interested in determining, in a more accurate way, the regions involved in the interactions between GSN and GNN. This issue was pursued by analyzing the physical interaction between the proteins by two-hybrid experiments. Little information concerning this issue is available from studies on yeast proteins (Cheng *et al.*, 1995). Our results clearly indicated that truncation of the long C-terminal region of GNN had a destructive effect on the interaction with GSN. Interestingly, Cheng *et al.* (1995) have proposed that the C-terminus domain in Glg2p was required for interaction with Gsy2p since this fragment was isolated in a two-hybrid screening using Gsy2p as bait. Indeed, the C-terminal domain in GNN shares very low homology to Glg2p, but in contrast, deletion of this domain was not correlated to total absence of interaction with GSN. A more severe impairment in the interaction was only observed when a larger C-terminal region was missing in the GNN. One might say that the low interaction between GSN and GNN truncated at C-terminus would be due the ability of glycogen synthase to interact with the oligosaccharide chain in glycogenin. Even though the interactions take place in the nucleus in the two-hybrid analysis, GNN must be translated in the cytosol, readily glucosylated and translocated to the nucleus carrying an oligosaccharide chain attached to it. In fact, the extension of the oligosaccharide chain has been proposed to play a role in the ability of glycogen synthase to elongate self-glucosylated glycogenin in mammals (Cao *et al.*, 1993b). However, our results using single or double mutant proteins have argued that GNN-GSN interaction does not depend on the glucosylation status of glycogenin. In this case, other protein-protein determinants would explain for the low, but effective capacity, of those two proteins to interact to each other. When GNN was used as bait and assayed with truncated forms of GSN, lower interaction was only detected with a truncated form lacking the last 82 amino acids from the C-terminus. In general, the N- and C-terminus of glycogen synthases contain the regulatory sites for reversible phosphorylation. Recent reports describing the existence of a protein called GNIP (Skurat *et al.*, 2002), which interacts with mammalian glycogenin, suggest that multimeric complexes may involve glycogenin and glycogen synthase

(Zhai *et al.*, 2004). Although no GNIP counterpart has been identified in microorganisms, we cannot exclude the possibility that other proteins may exist, and to be implicated on the physical interactions and activity of both glycogenin and glycogen synthase.

The structural model available for the rabbit glycogenin (Gibbons *et al.*, 2002) could shed light into GSN-GNN interaction results. However, the low identity of GNN to rabbit glycogenin and the presence of a long C-terminal extension in GNN, not present in the rabbit counterpart, make the model a non-useful tool in this type of analysis. A structural model for longer glycogenins, such as those found in most microorganisms, would be therefore very interesting. In addition, the fact that glycogenin and glycogen synthase proteins can form multimeric complexes in solution must be considered.

REFERENCES

- Alonso, M. D.; Lomako, J.; Lomako, W. M. and Whelan, W. J. (1995a) A new look at the biogenesis of glycogen. *FASEB J.* 9: 1126-1137.
- Alonso, M. D.; Lomako, J.; Lomako, W. M. and Whelan, W. J. (1995b) Catalytic activities of glycogenin additional to autocatalytic self-glucosylation. *J. Biol. Chem.* 270: 15315-15319.
- Ausabel, F., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G. Smith, J. A. & Struhl, G. (1996) *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley and Sons, Inc., New York.
- Cao, Y.; Mahrenholz, A. M.; DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (1993a) Characterization of rabbit skeletal muscle glycogenin. Tyrosine 194 is essential for function. *J. Biol. Chem.* 268: 14687-14693.
- Cao, Y.; Skurat, A. V.; DePaoli-Roach, A. A. and Roach, P. J. (1993b) Initiation of glycogen synthesis. *J. Biol. Chem.* 268: 21717-21721.
- Cao, Y.; Steinrauf, L. K. and Roach, P. J. (1995) Mechanism of glycogenin self-glucosylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 319: 293-298.
- Caudwell, F. B. and Cohen, P. (1980) Purification and subunit structure of glycogen-branching enzyme from rabbit skeletal muscle. *Eur. J. Biochem.* 109: 391-394.
- Cheng, C.; Mu, J.; Farkas, I.; Huang, D.; Goebel, M. G. and Roach, P. J. (1995) Requirement of the self-glucosylating initiator proteins Glg1p and Glg2p for glycogen accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 15: 6632-6640.
- de Paula, R. M.; Wilson, W. A.; Terenzi, H. F.; Roach, P. J. and Bertolini, M. C. (2004) GNN is a self-glucosylating protein involved in the initiation step of glycogen biosynthesis in *Neurospora crassa*. (submitted).
- de Paula, R.; Azzariti de Pinho, C.; Terenzi, H. F. and Bertolini, M. C. (2002) Molecular and biochemical characterization of the *Neurospora crassa* glycogen synthase encoded by the *gsn* cDNA. *Mol. Genet. Genomics* 267: 241-253.
- Gibbons, B. J.; Roach, P. J. and Hurley, T. D. (2002) Crystal structure of the autocatalytic initiator of glycogen biosynthesis, glycogenin. *J. Mol. Biol.* 319: 463-477.
- Hardy, T. A. and Roach, P. J. (1993) Control of yeast glycogen synthase-2 by COOH-terminal phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 268: 23799-23805.
- James, P., Halladay, J and Craig, E. A. (1996) Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144: 1425-1436.
- Lomako, J.; Lomako, W. M. and Whelan, W. J. (1988) A self-glucosylating protein is the primer for rabbit muscle glycogen biosynthesis. *FASEB J.* 2: 3097-3103.
- Mu, J.; Cheng, C. and Roach, P. J. (1996) Initiation of glycogen synthesis in yeast. Requirement of multiple tyrosine residues for function of the self-glucosylating Glg proteins *in vivo*. *J. Biol. Chem.* 271: 26554-26560.

- Rodriguez, I. R. and Whelan, W. J. (1985) A novel glycosyl-amino acid linkage: rabbit muscle glycogen is covalently linked to a protein via tyrosine. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 132: 829-836.
- Schiestl, R. H. and Gietz, R. D. (1989) High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16:339-346.
- Skurat, A. V.; Dietrich, A. D.; Zhai, L. and Roach, P. J. (2002) GNIP, a novel protein that binds and activates glycogenin, the self-glucosylating initiator of glycogen biosynthesis. *J. Biol. Chem.* 277: 19331-19338.
- Smythe, C. and Cohen, P. (1991) The discovery of glycogenin and the priming mechanism for glycogen biogenesis. *Eur. J. Biochem.* 200: 625-631.
- Smythe, C.; Watt, P. and Cohen, P. (1990) Further studies on the role of glycogenin in glycogen biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* 189: 199-204.
- Zhai, L.; Dietrich, A. D.; Skurat, A. V. and Roach, P. J. (2004) Structure-function analysis of GNIP, the glycogenin-interacting protein. *Arch. Biochem. Biophys.* 421: 236-242.

FIGURE LEGENDS

Fig. 1 – Kinetics of GNN Δ 306. **A-** Time course of glycogenin self-glucosylation reaction. Purified GST-GNN Δ 306 (0.8 μ g) was incubated with UDP-[14 C]glucose at 30°C, as described in Material and Methods. At the indicated times, aliquots were withdrawn and analysed by SDS-PAGE (upper panel) followed by autoradiography (lower panel). **B-** K_m determination of glycogenin for the substrate UDP-glucose. GST-GNN Δ 306 (0.8 μ g) was allowed to self-glucosylate in the presence of the indicated amounts of UDP-[14 C]glucose at 30°C for 20 min. After that, aliquots were removed and spotted on P81 chromatography papers, washed in 0.5% phosphoric acid and quantified by scintillation counting.

Fig. 2 – Analysis of glycogenin glucosylation by mass spectrometry. The peptides generated by trypsin digestion of glucosylated GST-GNN Δ 360 were analyzed by MALDI-TOF. The ion spectrum is shown in the mass range 3000-4000. The peak masses are shown along the spectrum and refer to the additional glucose units added to the unmodified peptide (mass 3013.38).

Fig. 3 – Self-glucosylation of WT and mutant glycogenins. WT proteins (GNN Δ 360 and GNN Δ 306) and mutant proteins (GNN Δ 360Y196F, GNN Δ 360Y196/198F, GNN Δ 306Y196F and GNN Δ 306Y196/198F) were analysed by the ability to self-glucosylate. The proteins (0.8 μ g) were incubated with UDP-[14 C]glucose at 30°C for 20 min. Aliquots were removed and spotted in P81 papers and counted by liquid scintillation (**C**). The remaining reaction was stopped by adding sample buffer (4X) and boiling. Samples were analysed by SDS-PAGE (lower panels), followed by autoradiography (upper panels). **A-** Self-glucosylation of GNN Δ 360, GNN Δ 360Y196F and GNN Δ 360Y196/198F proteins, **B-** Self-glucosylation of GNN Δ 306, GNN Δ 306Y196F and GNN Δ 306Y196/198F proteins.

Fig. 4 - Functional complementation of *S. cerevisiae* glycogenin mutant strain by *N. crassa* glycogenin. GNN Δ 306 and mutant proteins GNN Δ 306Y196F and GNN Δ 306Y196/198F were expressed in *glg1 glg2* yeast cells (CC9) from high copy number vector pRS424 under the control of the GAPD promoter. Samples 1 and 2, WT and CC9 strains, respectively, harboring pRS424; samples 3 and 4, CC9 cells overexpressing Glg1p and Glg2p, respectively; samples 5, 6, and 7, CC9 cells overexpressing GNN Δ 306, GNN Δ 306Y196F and GNN Δ 306Y196/198F, respectively. (**A**) Iodine staining of colonies grown on SD-Trp plate for 2 days at 30 °C. (**B**) Glycogen content. Glycogen was determined enzymatically as described in Materials and Methods.

Fig 5 –Two-hybrid assay of GNN and GSN interactions. Plasmid constructions were described in Materials and Methods. A schematic representation of the plasmid constructions is shown. Interactions analysis was measured by liquid β -galactosidase of yeast crude extracts expressing the indicated proteins. The results are the average of three independent experiments.

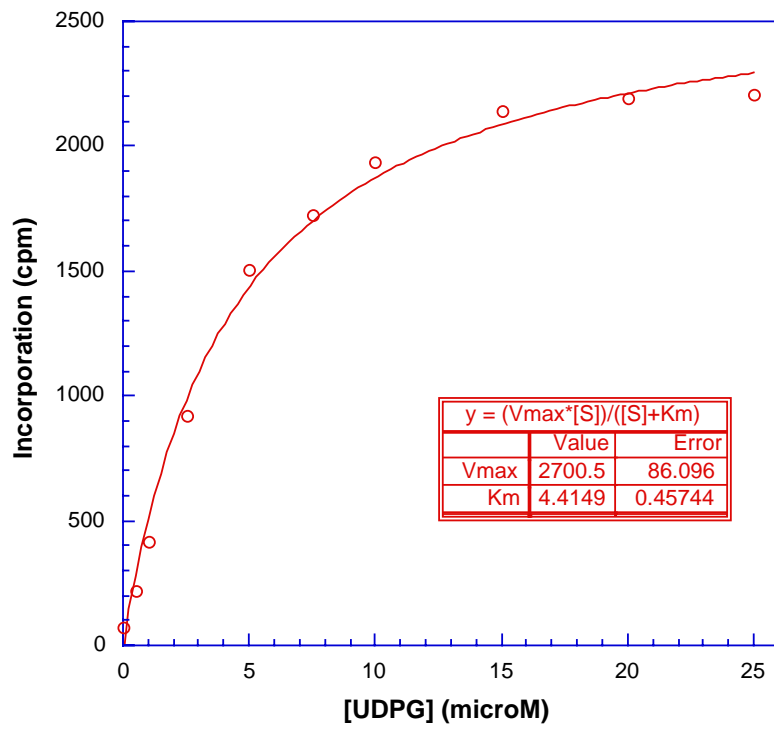
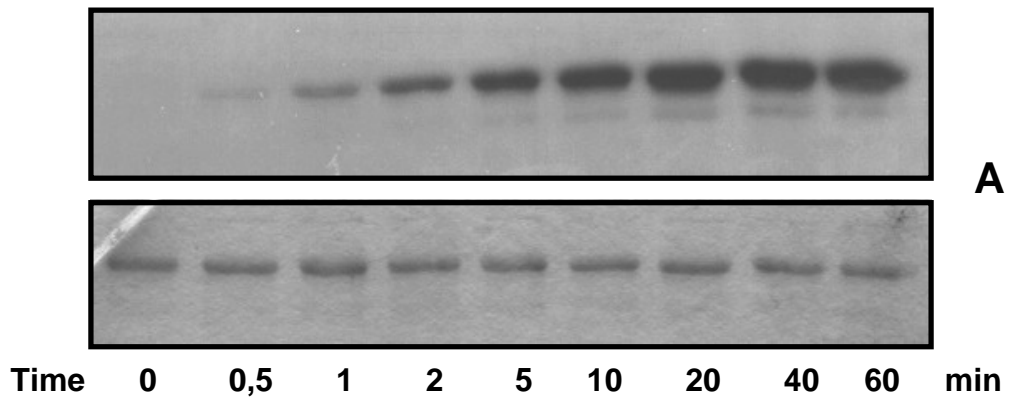


Fig. 1, de Paula *et al.*

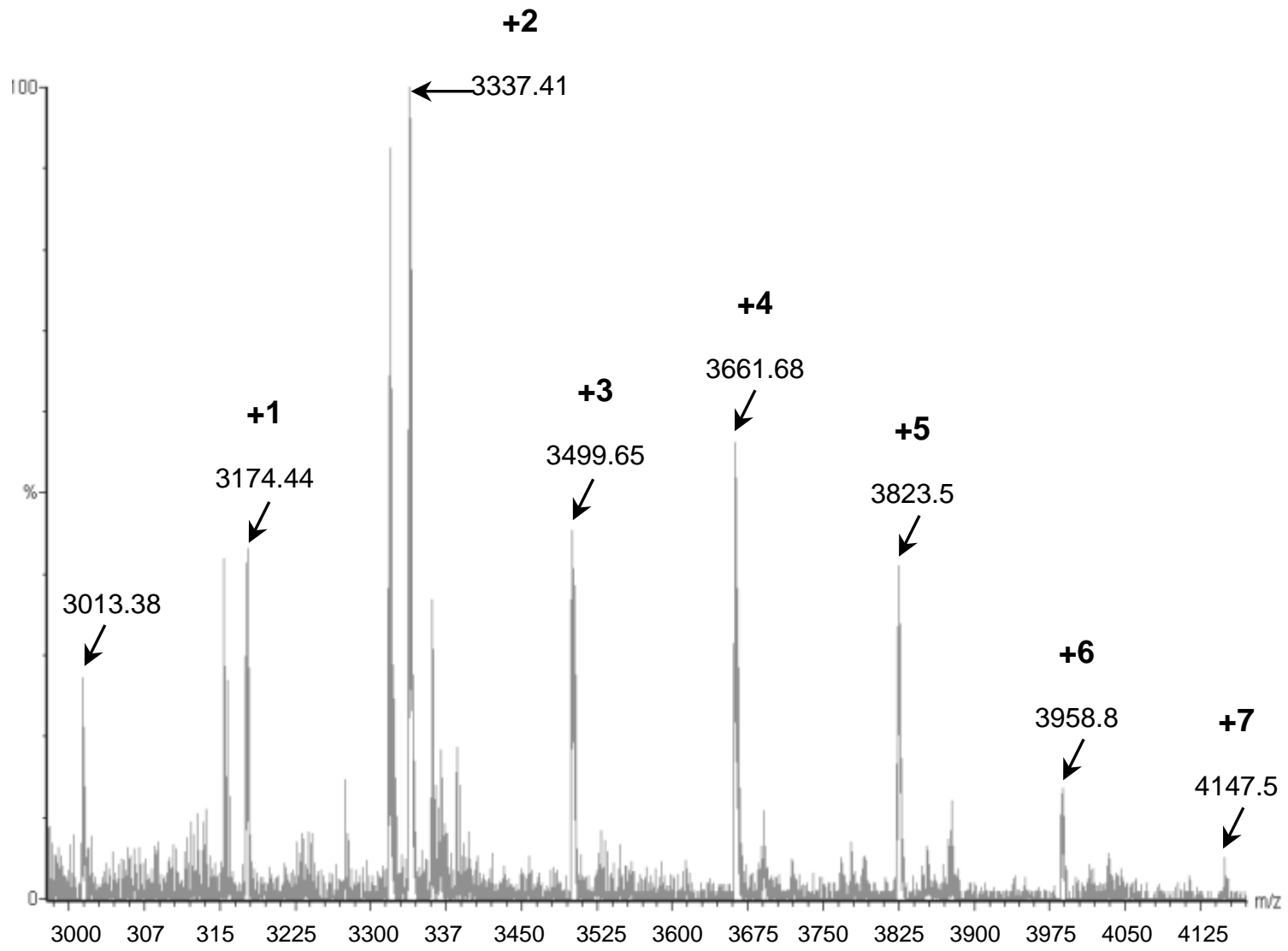


Fig. 2, de Paula *et al.*

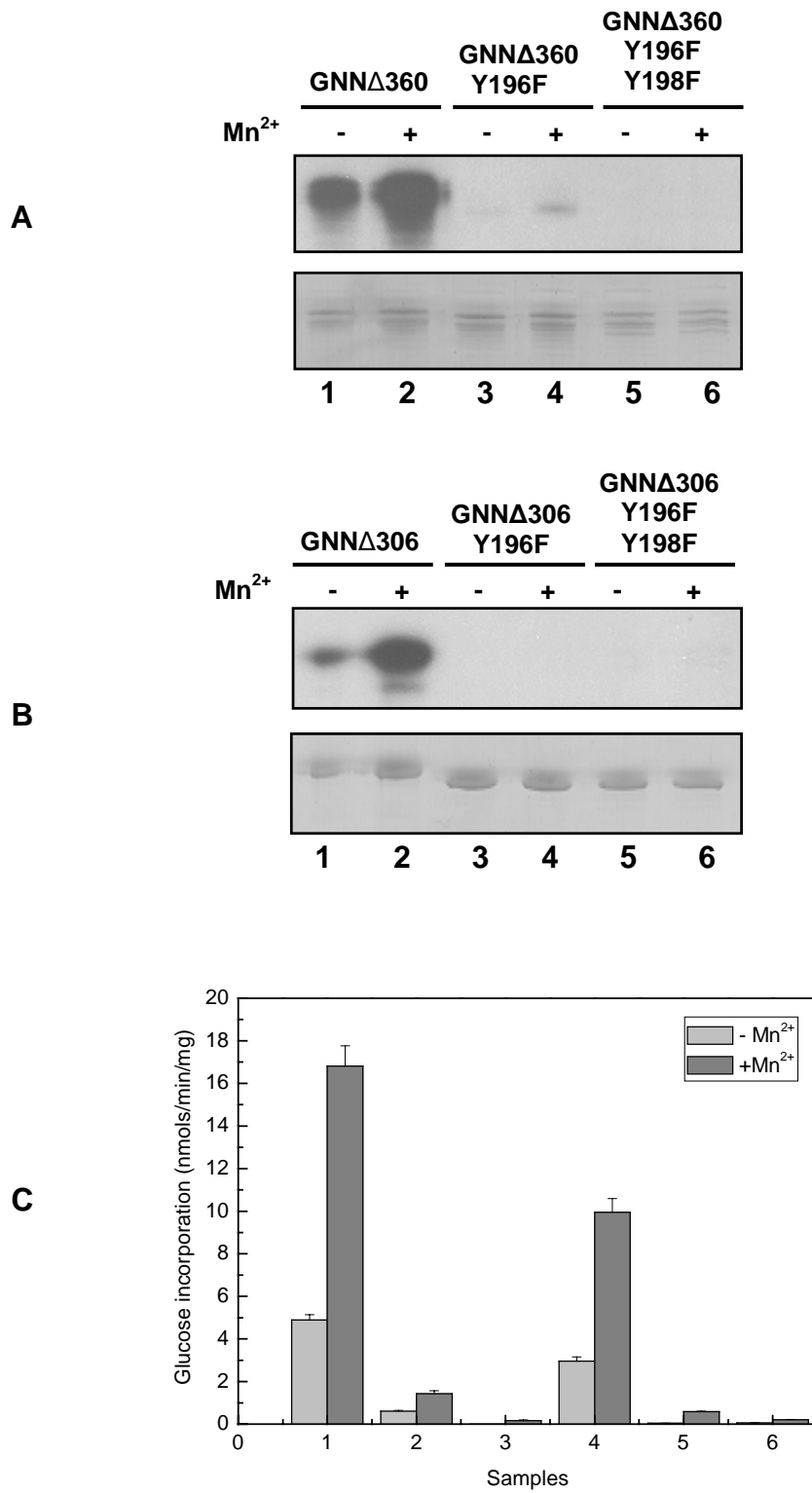


Fig. 3, de Paula et al.

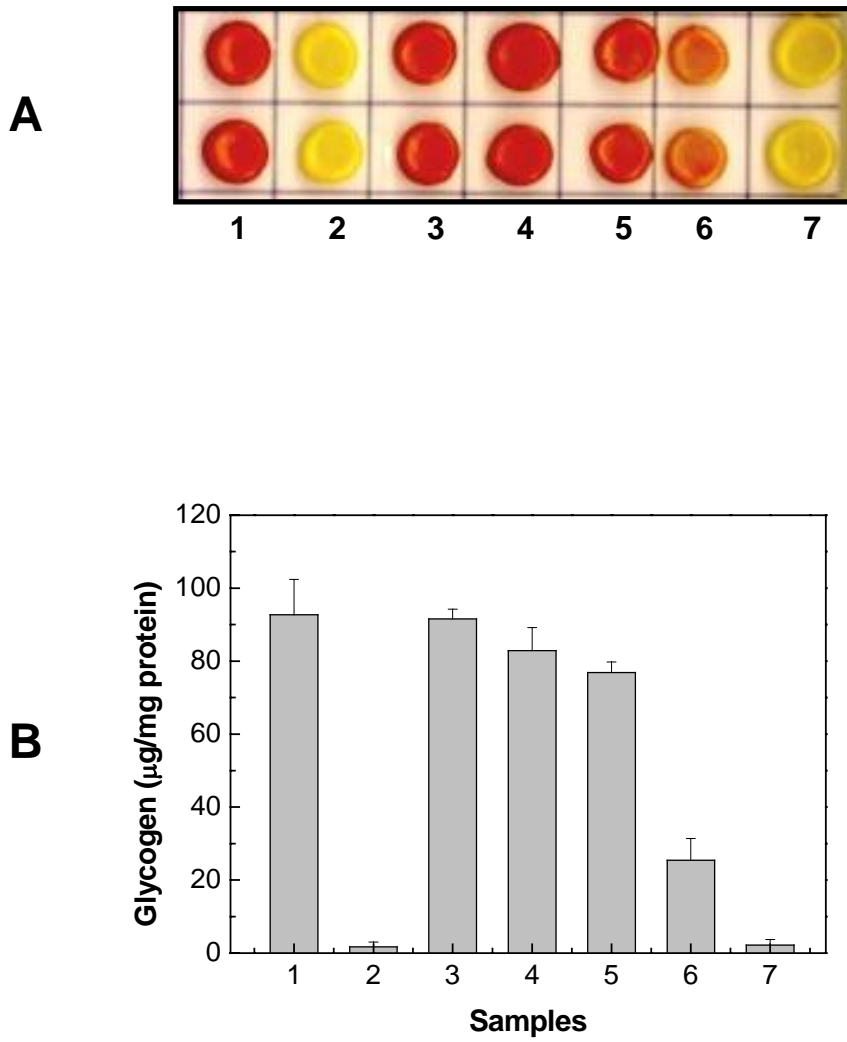


Fig. 4, de Paula *et al.*

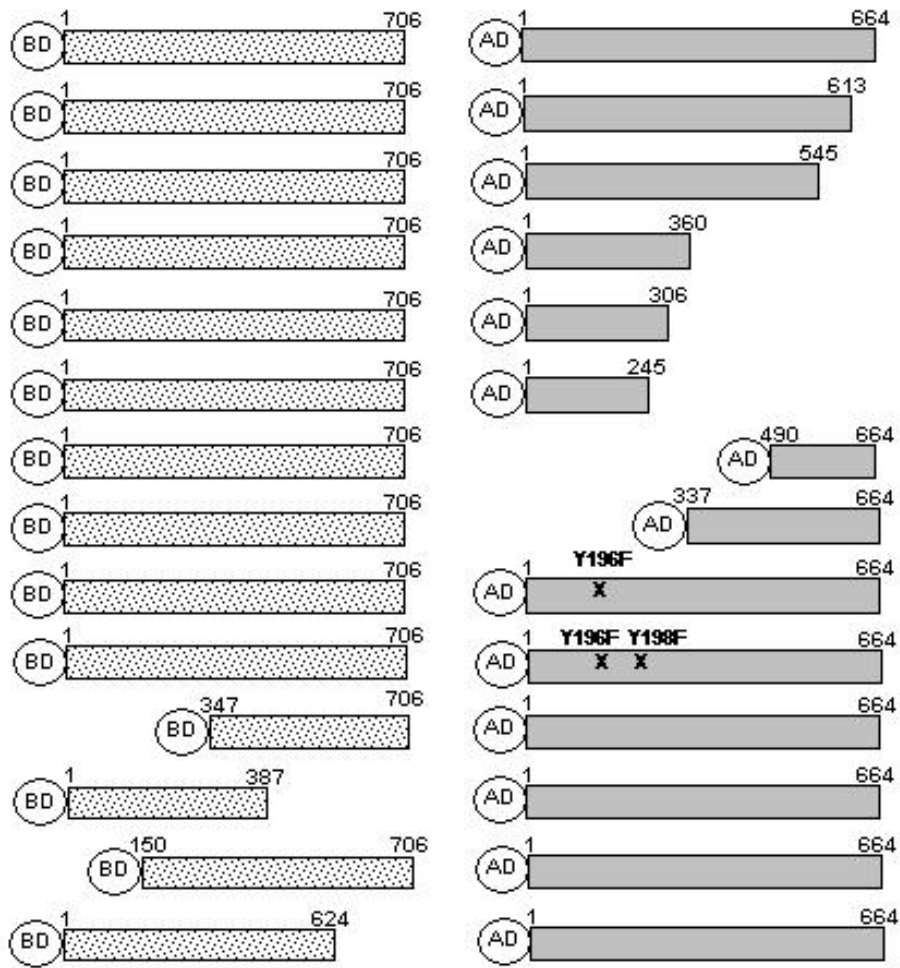


Fig. 5, de Paula *et al.*

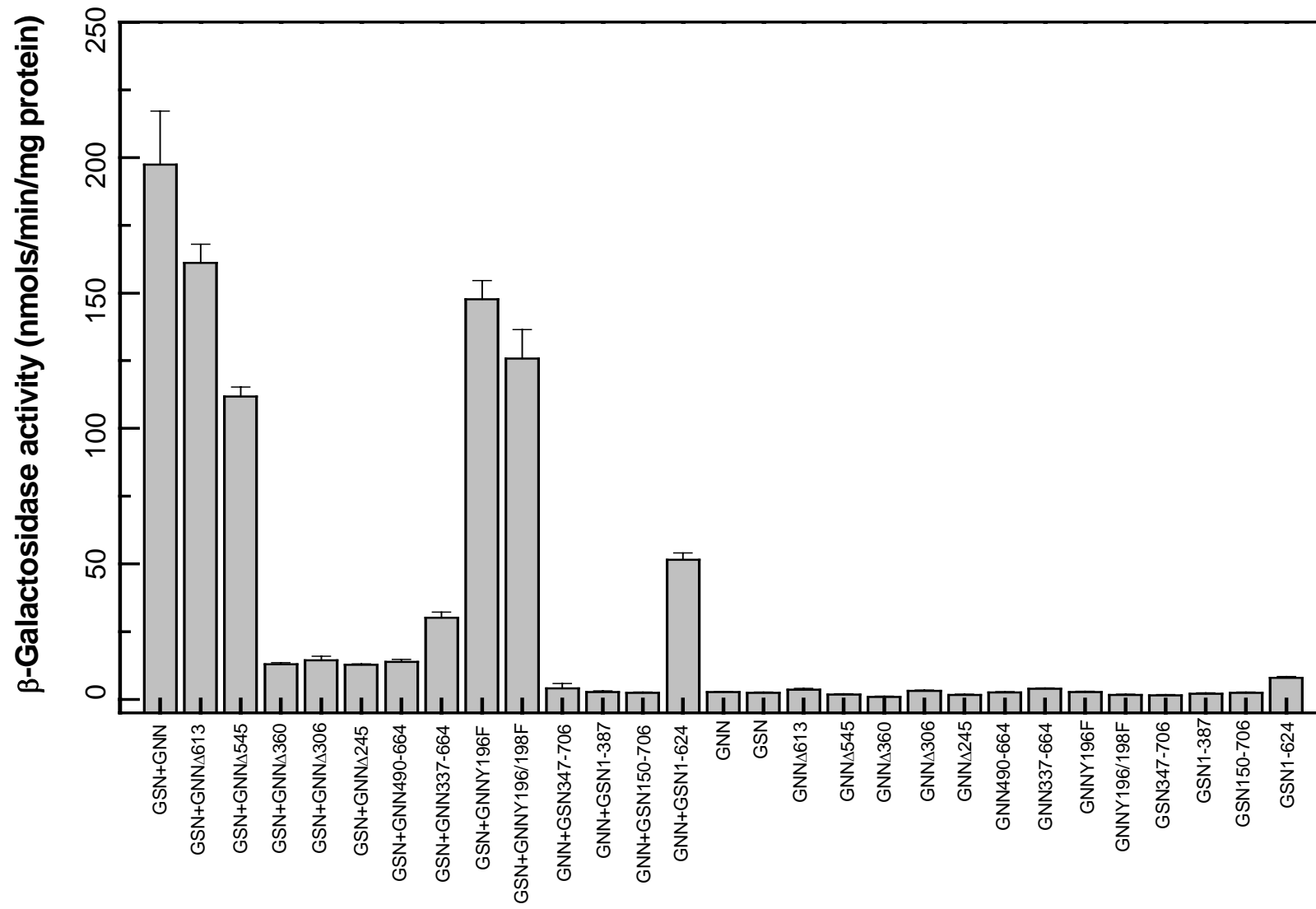


Fig. 5, cont.