

Téma a sylaby inauguračnej prednášky

Amylolytické enzýmy: tisíce sekvencií, stovky štruktúr, desiatky špecificít – a čo evolúcia...?

Amylolytické enzýmy predstavujú veľkú skupinu škrobových hydroláz a im príbuzných enzýmov, ktoré katalyzujú hydrolýzu alfa-glukozidových väzieb v škrobe, glykogéne a ďalších alfa-glukánoch. Okrem hydrolýzy však tieto väzby aj tvoria, prípadne modifikujú, t.j. okrem hydroláz (EC 3) k nim patria aj transferázy (EC 2) a izomerázy (EC 5) [1]. V CAZy systéme klasifikácie enzýmov aktívnych voči sacharidom (<http://www.cazy.org/>; [2]), založenom na podobnosti aminokyselinových sekvencií, sú amylolytické enzýmy zaradené do viacerých rodín glykozidových hydroláz (GH). Tieto enzýmy uplatňujú pri svojom pôsobení dva typy reakčných mechanizmov [3]: (i) retenujúci – zachovanie konfigurácie produktu; a (ii) invertujúci – zmena konfigurácie. Účinkom alfa-amylázy (retenujúci enzým) vznikajú alfa-glukány, kým produktami účinku beta-amylázy a glukoamylázy (invertujúce enzýmy) sú beta-glukány [4]. Keďže v CAZy databáze je hlavným kritériom pre klasifikáciu sekvenciálna podobnosť, do spoločnej CAZy rodiny sa môžu dostať enzýmy rôzne z pohľadu ich klasického rozdelenia do enzýmových tried (EC čísla) [2]. Práve z tohto dôvodu boli tri najznámejšie amylolytické enzýmy – alfa-amyláza, beta-amyláza a glukoamyláza – klasifikované hneď pri vzniku klasifikácie do svojich samostatných rodín GH13, GH14 a GH15 [5].

V súčasnosti je enzýmová špecificita alfa-amylázy prítomná okrem hlavnej alfa-amylázovej rodiny GH13 aj v rodinách GH57 a GH119, a prípadne aj v GH126 [4]. Popri koncepte klasifikácie založenej na sekvenciách [5] sa v tom istom čase vyvíjal koncept alfa-amylázovej rodiny vychádzajúci z množstva experimentálnych a teoretických štúdií. Na ich základe bolo jasné, že okolo alfa-amylázy sa zoskupujú aj iné príbuzné amylolytické enzýmy, ako napr. alfa-glukozidáza, pululanáza, cyklohextrín-glukanotransferáza, izoamyláza, ako aj mnohé ďalšie [6]. Za jeden z míľnikov možno považovať objav neopululanázy ako univerzálneho enzýmu schopného katalyzovať hydrolýzu aj tvorbu alfa-1,4- aj alfa-1,6-glukozidových väzieb [7]. Rovnako dôležité však boli aj mnohé *in silico* analýzy identifikujúce črty alfa-amyláz v príbuzných enzýmoch [8,9].

Dnes hlavná alfa-amylázová rodina GH13 obsahuje viac ako 105 tisíc členov a viac ako 30 rôznych enzýmových špecificít [2]. Okrem enzýmov sú v rodine GH13 klasifikované aj ťažké reťazce transportných proteínov rBAT a 4F2 [10]. Typické črty rodiny sú triáda zvyškov katalytickej mašinerie, TIM-barelová katalytická doména, 4-7 konzervovaných sekvenciálnych regiónov a retenujúci mechanizmus [1,4,6]. Na vyššej úrovni CAZy hierarchie tvorí rodina GH13 s rodinami GH70 a GH77 tzv. klan GH-H [1,10]. Na nižšej úrovni hierarchie CAZy bola rodina GH13 oficiálne rozdelená do 43 podrodín [11,12]. Mnohé podrodiny sú si evolučne bližšie príbuzné [10], napr. GH13_6 a GH13_7 (alfa-amylázy z rastlín a archeónov), prípadne GH13_15, GH13_24 a GH13_32 (alfa-amylázy z hmyzu, živočíchov a aktinobaktérií).

V poradí druhá alfa-amylázová rodina GH57 je oveľa menšia – v súčasnosti má viac ako 3000 členov a menej ako 10 enzýmových špecificít z hydroláz a transferáz [2]. Katalytická mašineria je tvorená iba dvojicou zvyškov a katalytická doména adoptuje tzv. nekompletný TIM-barel [4]. Sekvencie zdieľajú 5 konzervovaných sekvenciálnych regiónov [13,14], pričom rodina je príbuzná k ďalšej, t.j. tretej alfa-amylázovej rodine GH119 (iba 32 členov a jedna špecificita) [15].

Potenciálne zatiaľ poslednou, t.j. štvrtou možnou rodinou, v ktorej by bola klasifikovaná špecificita α -amylázy, je rodina GH126 [2,4], ktorá bola etablovaná v roku 2011 na základe vyriešenia terciárnej štruktúry amylolytického enzýmu CPF_2247 z *Clostridium perfringens* [16]. Tento enzým je síce aktívny voči glykogénu a amylolyze, avšak z hľadiska sekvencie a štruktúry je podobný s invertujúcimi β -1,4-glukanázami z rodín GH8 a GH48 [16]. V súčasnosti rodina GH126 obsahuje okolo 1100 bakteriálnych sekvencií, pričom taxonomicky pokrývala iba kmeň Firmicutes [2,17], aj keď podľa nedávnej *in silico* analýzy boli identifikované ako možné GH126 sekvencie aj z kmeňov Proteobacteria, Actinobacteria and Bacteroidetes [18].

Okrem katalytickej domény môžu amylolytické enzýmy obsahovať aj rôzne ďalšie štruktúrno-funkčné moduly. Záujem je dlhodobo sústredený najmä na tzv. škrob-viažuce domény [19]. V databáze CAZy boli klasifikované do rodín CBM ako tzv. sacharid-viažuce moduly [2]. Z doteraz 88 etablovaných CBM rodín [2] je 15 považovaných za škrob-viažuce domény, pričom niektoré z nich zdieľajú evolučnú históriu [19]. Navyše, je to práve spoločná prítomnosť týchto nekatalytických väzbových domén, ktorá spája amylolytické enzýmy s inými neamylolytickými enzýmami a proteínmi, významnými z biotechnologického aj medicínskeho hľadiska, napr. glukánfosfatázy laforín (Laforov typ epilepsie) a proteín SEX4, ako aj ďalšie [20].

Amylolytické enzýmy takto predstavujú atraktívny predmet pre ich celkové štúdium. V súčasnosti, keď sú dostupné obrovské množstvá dát týkajúce sa ich sekvencií z genómových sekvenačných projektov, ale chýba ich biochemická charakterizácia, sú bioinformatické prístupy prvým a esenciálnym krokom na ceste k ich experimentálnemu štúdiu. Vďaka relevantným výsledkom získanými *in silico* prístupmi môže byť táto cesta skutočne lacnejšia a kratšia.

Literatúra

- [1] MacGregor EA, Janecek S & Svensson B: Relationship of sequence and structure to specificity in the α -amylase family of enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 2001, 1546: 1-20.
- [2] Lombard V, Golaconda Ramulu H, Drula E, Coutinho PM & Henrissat B: The Carbohydrate-active enzymes database (CAZy) in 2013. *Nucleic Acids Res.* 2014, 42: D490-D495.
- [3] McCarter JD & Withers SG: Mechanisms of enzymatic glycoside hydrolysis. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 1994, 4: 885-892.
- [4] Janecek S, Svensson B & MacGregor EA: α -Amylase: an enzyme specificity found in various families of glycoside hydrolases. *Cell. Mol. Life Sci.* 2014, 71: 1149-1170.
- [5] Henrissat B: A classification of glycosyl hydrolases based on amino acid sequence similarities. *Biochem. J.* 1991, 280: 309-316.
- [6] Janecek S: α -Amylase family: molecular biology and evolution. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 1997, 67: 67-97.
- [7] Kuriki T & Imanaka T: Nucleotide sequence of the neopullulanase gene from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Gen. Microbiol.* 1989, 135: 1521-1528.
- [8] MacGregor EA & Svensson B: A super-secondary structure predicted to be common to several α -1,4-D-glucan-cleaving enzymes. *Biochem. J.* 1989, 259: 145-152.
- [9] Jespersen HM, MacGregor EA, Sierks MR & Svensson B: Comparison of the domain-level organization of starch hydrolases and related enzymes. *Biochem. J.* 1991, 280: 51-55.
- [10] Janecek S & Gabrisko M: Remarkable evolutionary relatedness among the enzymes and proteins from the α -amylase family. *Cell. Mol. Life Sci.* 2016, 73: 2707-2725.
- [11] Stam MR, Danchin EG, Rancurel C, Coutinho PM & Henrissat B: Dividing the large glycoside hydrolase family 13 into subfamilies: towards improved functional annotations of α -amylase-related proteins. *Protein Eng. Des. Sel.* 2006, 19: 555-562.
- [12] Janecek S & Zamocka B: A new GH13 subfamily represented by the α -amylase from the halophilic archaeon *Haloarcula hispanica*. *Extremophiles* 2020, 24: 207-217.
- [13] Blesak K & Janecek S: Sequence fingerprints of enzyme specificities from the glycoside hydrolase family GH57. *Extremophiles* 2012, 16: 497-506.
- [14] Martinovicova M & Janecek S: *In silico* analysis of the α -amylase family GH57: eventual subfamilies reflecting enzyme specificities. *3Biotech* 2018, 8: 307.
- [15] Janecek S & Kuchtova A: *In silico* identification of catalytic residues and domain fold of the family GH119 sharing the catalytic machinery with the α -amylase family GH57. *FEBS Lett.* 2012, 586: 3360-3366.
- [16] Ficko-Blean E, Stuart CP & Boraston AB: Structural analysis of CPF_2247, a novel α -amylase from *Clostridium perfringens*. *Proteins* 2011, 79: 2771-2777.
- [17] Kerenyiova L & Janecek S: A detailed *in silico* analysis of the amylolytic family GH126 and its possible relatedness to family GH76. *Carbohydr Res.* 2020, 495: 108082.
- [18] Kerenyiova L & Janecek S: Extension of the taxonomic coverage of the family GH126 outside Firmicutes and *in silico* characterization of its non-catalytic terminal domains. *3Biotech* 2020, 10: 420.
- [19] Janecek S, Marecek F, MacGregor EA & Svensson B: Starch-binding domains as CBM families – history, occurrence, structure, function and evolution. *Biotechnol. Adv.* 2019, 37: 107451.
- [20] Janecek S, Svensson B & MacGregor EA: Structural and evolutionary aspects of two families of non-catalytic domains present in starch and glycogen binding proteins from microbes, plants and animals. *Enzyme Microb. Technol.* 2011, 49: 429-440.