



Aleksa Stanišić

Jahrgang 1991. 2009–2014 Pharmaziestudium an der Universität Belgrad, Serbien. 2016–2021 Promotion in der Nachwuchsgruppe Biosynthetisches Design von Naturstoffen (Dr. Hajo Kries) am Leibniz-Institut für Naturstoff-Forschung und Infektionsbiologie e. V. (Leibniz-HKI) und der Universität Jena. Seit 2022 Protein Engineer bei Origin.Bio, München.

VAAM-Promotionspreis

Enzymatische Schludrigkeit zur Tugend machen

ALEKSA STANIŠIĆ

NACHWUCHSGRUPPE BIOSYNTHETISCHES DESIGN VON NATURSTOFFEN, LEIBNIZ-INSTITUT FÜR NATURSTOFF-FORSCHUNG UND INFEKTIONS BIOLOGIE E.V. (LEIBNIZ-HKI, JENA)

DOI: 10.1007/s12268-022-1755-0
© Der Autor 2022

■ Nichtribosomale Peptide wie das Surfactin (**Abb. 1A**) gehören zu den gängigen und nützlichen Naturstoffen aus Bakterien und Pilzen. Sie werden auf den enzymatischen Fließbändern der riesigen nichtribosomalen Peptidsynthetasen (NRPS) gebildet. Jede Aminosäure wird durch eine spezielle Adenylierungsdomäne (A-Domäne) aktiviert und die Peptidbindung wird in der Kondensationsdomäne (C-Domäne) geknüpft. Ihre modulare Struktur und ihr breites Spektrum an Substraten machen sie zu idealen Zielen für biosynthetisches Engineering. Dadurch hoffen wir, Peptide mit neuen oder verbesserten Bioaktivitäten zu erhalten.

In meiner Arbeit habe ich mich mit der Substratauswahl durch die A-Domäne befasst und damit, wie sie gemessen und manipuliert werden kann. Einer der wichtigsten technischen Engpässe war bisher die Bestimmung der Substratspezifität der A-Domäne [1], die über die Identität der Seitenketten in der Peptidsequenz entscheidet. Daher habe ich einen neuen Hydroxamat-Assay (HAMA) entwickelt, der die Bestimmung eines vollständigen Spezifitätsprofils in einer einzigen Enzymreaktion ermöglicht (**Abb. 1B**, [2]).

HAMA stellt einen bedeutenden Fortschritt gegenüber den bisherigen Assays dar, die experimentell anspruchsvoll sind und zum Beispiel radioaktive Marker benötigen. Darüber hinaus bietet HAMA erstmals die Möglichkeit zur Erforschung des vollen Substratspektrums der oft schludrig arbeitenden A-Domänen. Diese Schludrigkeit wollen wir zur Tugend machen: Durch HAMA aufgedeckte und durch Mutagenese erhöhte Nebenaktivitäten sollen zukünftig die Synthese neuer Naturstoffe ermöglichen.

Die Ausnutzung neuer A-Domänen-Aktivitäten kann aber nur erfolgreich sein, wenn auch alle Folgereaktionen korrekt ablaufen. Insbesondere die C-Domäne könnte die Produkttiter senken, wenn sie neue Seitenketten zurückweist. Um die Beziehung zwischen der Spezifität der A- und der C-Domäne zu untersuchen, verwendeten wir ein Zweimodulsystem, bei dem eine chimäre A-Domäne im ersten Modul der nachfolgenden C-Domäne zwei verschiedene Substrate anbietet [3]. Mit einem neuen Modell für die Produktbildungskinetik zeigen wir, dass die A-Domäne in der Lage ist, unter bestimmten Bedingungen die Spezifität der C-Domäne außer Kraft zu setzen und die Identität des Endprodukts zu bestimmen.

Sechs Jahrzehnte NRPS-Forschung haben zu bemerkenswerten Erfolgen beim Engineering geführt. Das mangelnde mechanistische Verständnis des Innenlebens der NRPS hat jedoch die Entwicklung eines verlässlichen Arbeitsablaufs behindert, der neue Arzneimittel hervorbringen würde. Meine Arbeit liefert kritische Einblicke, wie A- und C-Domänen gemeinsam die Spezifität der nichtribosomalen Biosynthese codieren und wie diese manipuliert werden kann.

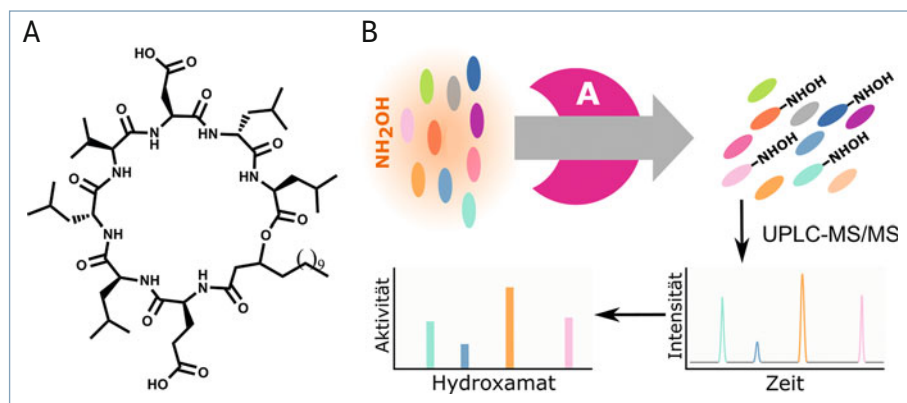
Danksagung

Vielen Dank an meinen Doktorvater Hajo Kries für die großartige Unterstützung und Expertise. Ich bin unseren Kooperationspartnern und der gesamten Arbeitsgruppe für die wunderbare Arbeitsatmosphäre und der Leibniz-Gemeinschaft für die finanzielle Unterstützung zu Dank verpflichtet. ■

Literatur

- [1] Stanišić A, Kries H (2019) Adenylation domains in nonribosomal peptide engineering. *ChemBioChem* 20: 1347–1356
- [2] Stanišić A, Hüsken A, Kries H (2019) HAMA: a multiplexed LC-MS/MS assay for specificity profiling of adenylation-forming enzymes. *Chem Sci* 10: 10395–10399
- [3] Stanišić A, Hüsken A, Stephan P et al. (2021) Engineered nonribosomal peptide synthetase shows opposite amino acid loading and condensation specificity. *ACS Catal* 11: 8692–8700

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.
Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.



▲ **Abb. 1:** A, Surfactin ist ein nichtribosomales Lipopeptid, produziert von *Bacillus subtilis*. B, Der Hydroxamat(HAMA)-Spezifitätstest misst das Substratspektrum nichtribosomaler A-Domänen. Eine Mischung von Aminosäuren wird mit der A-Domäne in Gegenwart von Hydroxylamin und ATP inkubiert und die gebildeten Hydroxamate mittels UPLC-MS quantifiziert.

Korrespondenzadresse:

Dr. Aleksa Stanišić
Origin.Bio
Fördergesellschaft IZB mbH
Am Klopferspitz 19
D-82152 Planegg/Martinsried
aleksa.stanistic@gmail.com