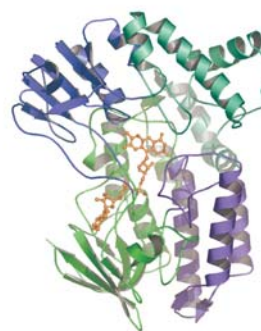


Kloneren, zuiveren en karakteriseren van nieuwe BVMOs

Stage voorstel

Onderzoeksgroep: Biotechnologie (GBB)

Project begeleider: drs. D.E. Torres Pazmiño
Nijenborgh 4 (kamer 5114.0104)
9747 AG Groningen
tel.: 050-3634162
email: d.e.torres.pazmino@rug.nl



Omschrijving onderzoeksgroep

Het onderzoek van de groep Biotechnologie richt zich op het verkrijgen van inzichten in de biochemie en enzymologie van microbiële transformaties van synthetische verbindingen en op het ontwikkelen van verbeterde biokatalysatoren voor zulke transformaties. De groep richt zich op het ophelderen van catabole routes in micro-organismen die milieuschadelijk stoffen afbreken (bv. gechlorineerde oplosmiddelen, pesticiden). Verder worden er enzymologische en *protein engineering* studies verricht op microbiële enzymen die kunnen worden toegepast als biokatalysatoren in de (enantioselectieve) synthese van fijn-chemicaliën.

Achtergrond informatie

Baeyer-Villiger monooxygenases (BVMOs) zijn enzymen die ketonen kunnen oxideren tot esters. BVMOs bevatten een flavine cofactor (zie figuur en ref. 1) en zijn voor activiteit afhankelijk van NADPH en zuurstof. Er is gevonden dat BVMOs verschillende oxidatie reacties uiterst regio- en/of enantioselectief kunnen katalyseren (beter/selectiever dan bestaande chemische methodes). Dit geeft aan dat deze enzymen van grote waarde kunnen zijn voor de synthese van interessante fijn-chemicaliën. Tot dusver zijn er echter slechts beperkt aantal BVMOs bekend.

Doel stage

Recentelijk hebben we een sequentie motief ontdekt dat kenmerkend blijkt te zijn voor BVMO sequenties (ref. 2). Met behulp van dit sequentie motief kunnen nieuwe BVMO genen worden geïdentificeerd in genoom databanken (ref. 3). Deze manier van zoeken naar nieuwe enzymen ('*genome mining*') heeft geresulteerd in het identificeren van een groot aantal potentiële BVMOs in een aantal verschillende bacteriën. Het doel van deze stage is om een aantal BVMO genen in een expressievector te kloneren, om vervolgens de verschillende enzymen tot overexpressie te brengen, te zuiveren en te karakteriseren. Hierbij zullen verschillende bioinformatica, moleculair biologische en enzymologische technieken gebruikt worden.

Te gebruiken technieken

Allereerst zullen de geïdentificeerde genen in een expressievector worden gezet (m.b.v. PCR, DNA digestie en ligatie reacties, etc.). Hierbij zal gebruik gemaakt worden van het commerciële Gateway expressievector systeem (Invitrogen). Vervolgens zullen de gekloneerde genen tot overexpressie worden gebracht in *Escherichia coli* en zullen de geproduceerde enzymen gezuiverd worden (affiniteits- en ionenuitwisselingskolomchromatografie, SDS-PAGE). Eenmaal gezuiverd, zullen de enzymen biochemisch gekarakteriseerd worden. Hierbij zal men gebruik maken van technieken zoals spectrofotometrische assays, gaschromatografie, gelfiltratie. Ook zullen, op basis van sequentie homologie, structuur modellen gemaakt worden van de bestudeerde enzymen.

Literatuur

- (1) Malito et al. Crystal structure of a Baeyer-Villiger monooxygenase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2004**:13157-62.
- (2) Fraaije et al. Identification of a Baeyer-Villiger Monooxygenase Sequence Motif, *FEBS Letters* **2002**: 43-47.
- (3) Fraaije et al. Discovery of a Thermostable Baeyer-Villiger Monooxygenase by Genome Mining, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2004**: 393-400.