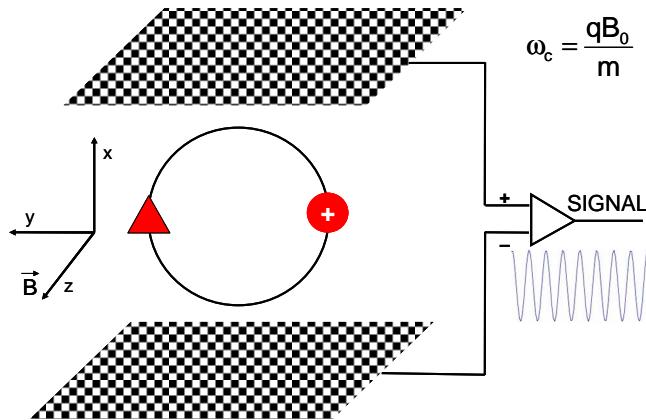


Abschlussarbeiten zur Entwicklung von Massenspektrometrie-basierten Techniken zur Analytik von biologisch aktiven Glykokonjugaten



Wir bieten an:

Interessante Themen für eine Abschlussarbeit im interdisziplinären Forschungsbereich der biomedizinischen Massenspektrometrie am Institut für Hygiene.

Auf der Oberfläche von eukaryontischen Zellen finden sich eine Vielzahl von glykosilierten, d. h. Zucker-tragenden, Molekülen. Diese spielen bei einer Vielzahl von biologischen Prozessen wie zum Beispiel der Signalübertragung und der Zellerkennung eine wichtige Rolle oder dienen als Rezeptoren von Bakterien, Viren oder anderen Pathogenitätsfaktoren.

Die strukturelle Charakterisierung von Glykokonjugaten und ihrer Bindungspartner und darüber hinaus die strukturelle und thermodynamische Analyse ihrer nicht-kovalenten Wechselwirkung ist für das Verständnis einer Vielzahl dieser Bindungsprozesse essentiell. Arbeiten zur strukturellen Charakterisierung und Entwicklung von Methoden zur qualitativen und quantitativen Analyse von Glykokonjugaten, d.h. Glykoproteine, Glykolipide und freie Glykane, stellen einen wesentlichen Schwerpunkt unserer Forschung dar. Hierbei werden hochempfindliche massenspektrometrische, immunologische und chromatographische Methoden und Techniken genutzt. Unter anderem kommt hierbei ein Fourier-Transform Ionen Zyklotron Resonanz Massenspektrometer (FT-ICR MS) zum Einsatz. Die FT-ICR MS zeichnet sich durch ein extrem hohes Massenauflösungsvermögen, eine hohe Massengenauigkeit sowie die Fähigkeit zur Durchführung verschiedener (mehrstufiger) Fragmentierungsmethoden aus.

Wir bieten Ihnen die Möglichkeit, Ihre Abschlussarbeit zu einer aktuellen biomedizinische Fragestellung in einem interdisziplinären Forschungsumfeld durchzuführen. Diese umfassen im Wesentlichen die Entwicklung neuartiger Methoden zur Charakterisierung von Kohlenhydrat-bindenden Proteinen und ihrer Interaktionspartner. Ein zweiter Schwerpunkt liegt auf der Untersuchung der nicht-

kovalenten Wechselwirkung solcher Proteine mit Glykokonjugaten. Neben den vorgeschlagenen Themen sind auch individuelle Absprachen zu weiteren Themen möglich.

Kontakt:

Bei Interesse melden Sie sich bitte bei:

Dr. Michael Mormann

mmormann@uni-muenster.de

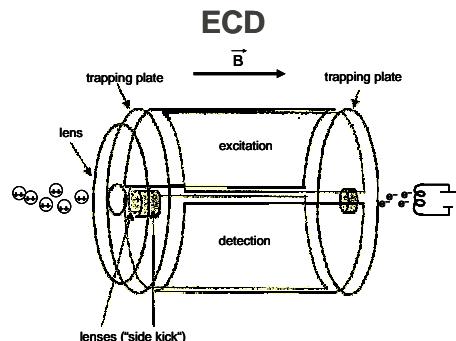
http://www.campus.uni-muenster.de/hyg_forsch_dreisewerd.html



A) Charakterisierung von Glykoproteinen aus Milch

Die Proteine in humaner Muttermilch werden vom Neugeborenen nicht nur als Aminosäurequelle genutzt, sondern tragen durch vielfältige Mechanismen und sehr spezielle Funktionen zum Aufbau einer Immunabwehr und zur Abwehr von Pathogenen bei. Uns interessieren vor allem die Milchglykoproteine im Allgemeinen und ihre Glykane im Besonderen. Im Rahmen der Masterarbeit sollen die (Glyko-) Proteine aus humaner Muttermilch gereinigt und aufgetrennt sowie die Glykosilierung durch Massenspektrometrie analysiert werden. Das Schwerpunktthema der Masterarbeit soll die Etablierung eines Protokolls zur Auf trennung von (Glyko-) Proteinen mittels zweidimensionaler SDS-PAGE sein. Die Glykoproteine sollen anschließend durch Western Blot und spezifische Färbung identifiziert und mittels MS charakterisiert werden. Dabei werden Methoden zur spezifischen Anreicherung von Glykoproteinen erlernt. Alternativ soll das Potential der HPLC zur Trennung bzw. Fraktionierung von Glyko-/Proteinen an verschiedene stationären Phasen untersucht werden.

B) Top-down Sequenzierung von Proteinen mit Hilfe von ECD



Die Elektronen-Einfang Dissoziation (electron-capture dissociation, ECD) ist eine perspektivreichen Methode insbesondere in der Proteinanalyse sowohl für die Peptidsequenzierung als auch für die Sequenzanalyse intakter Proteine. Bei der ECD werden Polykationen, die durch Anlagerung mehrerer Protonen bei der Elektrospray Ionisierung erzeugt werden, in der ICR-Zelle mit Elektronen niedriger kinetischer Energie (< 1eV) zur Reaktion gebracht. Die Rekombination der mehrfach geladenen Analytionen mit einem Elektron führt zu einer Herabsetzung der Ladung um 1, und – entscheidender – erzeugt eine Radikal-Species. Die Überschussenergie dieses Prozesses beträgt ~ 6 eV, ausreichend viel, um Fragmentierungen zu induzieren. Die so erzeugten Radikalkationen unterscheiden sich in ihrer Reaktivität von Ionen mit gerader Elektronenzahl. In den Massenspektren von angeregten Peptidradikalkationen werden vor allem Signale gefunden, die durch c- und z•-Ionen erzeugt werden. Bedingt durch den nicht-ergodischen Charakter des ECD-Prozesses werden labile Substituenten -im Gegensatz zur ergodischen Stoßanregung- nicht aus den angeregten Species eliminiert.

ECD ist daher hervorragend sowohl zur Analyse von posttranslational modifizierten Proteinen und Peptiden geeignet, da die Position der labilen Substituenten ohne vorherige chemische Modifizierung möglich ist, als auch zur Lokalisierung von N- und O-Glykosylierungs- und Phosphorylierungsstellen von Peptiden.

Im Hinblick auf die potentielle Anwendung der ECD auf die Analytik intakter Proteine wurden erste Ergebnisse vorgestellt. Der sogenannte „top-down“ Ansatz stellt den Versuch der Sequenzierung bzw. Identifizierung von Proteinen ohne vorangehende chemische oder enzymatische Behandlung dar.

C) Untersuchung der Bindungstopologie von nicht-kovalenten Komplexen

Die Charakterisierung der Kontaktfläche zwischen einem Protein und seinem Liganden ist für das Verständnis der Beziehung zwischen Struktur und biologischer Funktion von großer Bedeutung. Im Rahmen einer Abschlussarbeit sollen Methoden etabliert werden mit deren Hilfe diese Fragestellungen bearbeitet werden können. Hierbei spielen Wasserstoff/Deuteriumaustausch-Reaktionen eine zentrale Rolle. Das Potential der Electron Capture Dissociation (ECD) Methode zur Bestimmung derjenigen Positionen, an denen ein Austausch stattgefunden hat, soll untersucht werden.

D) Thermodynamik und Kinetik der Bildung nicht-kovalenter Komplexe

Neben der Untersuchung der Struktur von nicht-kovalenten Komplexen ist die Untersuchung der Bindungsstärke zwischen den interagierenden Partnern für das Verständnis der Prozesse sehr wichtig. Zentrales Thema dieser Abschlussarbeit ist Bestimmung von Gleichgewichtskonstanten und kinetischen Parametern für die Komplexbildung.

E) DESI-FT-ICR MS zur Untersuchung Dünnschichtchromatographieplatten und anderer Oberflächen

Die Desorption/Ionisation mittels Elektrospray Ionisierung (DESI) ist ein neuartiges Verfahren zur Desorption und Ionisierung von Analytmolekülen insbesondere von Oberflächen. In dieser Abschlussarbeit soll mit Hilfe von DESI versucht werden, Glykokonjugate, die auf Dünnschichtchromatographieplatten planar getrennt wurden, als intakte ionisierte Spezies in die Gasphase zu transferieren und dort strukturell zu charakterisieren.