

Martin Erich Böhm

Dr. sc. hum.

Quantitative Analytik der Phosphorylierung und Dimerisierung von STAT5A und STAT5B bei der zellulären Signaltransduktion

Einrichtung: DKFZ (Deutsches Krebsforschungszentrum)

Doktorvater: Professor Dr. Wolf-Dieter Lehmann

Der übergeordnete Kontext dieser Arbeit ist ein Forschungsprojekt, dessen Ziel es ist, tieferes Verständnis darüber zu bekommen, wie eine begleitende Epo-Behandlung von Lungenkrebspatienten mit der Entwicklung und Bekämpfung von Lungentumoren interagiert. Da die Aktivierung von STAT5A und STAT5B den Endpunkt des zytosolischen Teils der Epo-Signalkaskade darstellt, wurde die molekulare Analytik des Aktivierungsstatus von STAT5A und STAT5B in den Fokus dieser Arbeit gestellt. Der methodische Schwerpunkt dieser Arbeit liegt auf der quantitativen massenspektrometrischen Proteinanalytik. Ziel war zunächst, eine Analytik zu etablieren, mit welcher die Phosphorylierung des STAT5A bzw. STAT5B-pTyr-Aktivierungsmotivs (Tyr694 bzw. Tyr699) in Zellen humanen und murinen Ursprungs sicher quantifiziert werden kann. Hierfür wurde eine Methode entwickelt, welche mittels eines isotypenmarkierten, internen Peptid-/Phosphopeptid-Verhältnisstandards erlaubt, das pTyr-STAT5-Aktivierungsmotiv mit einer hier zum ersten Mal gezeigten hohen Genauigkeit Richtigkeit zu quantifizieren. Die Qualität der Methode wurde durch Messung von Proben mit definiertem Verhältnis von rekombinantem Peptid und Phosphopeptid, sowie mit alternativen Messmethoden nachgewiesen. Weitere Regulationsebenen der durch STAT5 aus dem Zytosol in den Zellkern vermittelten Signalübertragung sind sowohl zelltypspezifische Isoformverhältnisse von STAT5A und STAT5B als auch deren Dimerisierung, welche sich zeitlich unmittelbar an die Phosphorylierung der STAT5-Moleküle am Epo-Rezeptor anschließt. Um Zugang zu zellulären Isoformverhältnissen zu bekommen wurden auch hierfür auf Basis quantitativer LC-MS/MS, Methoden entwickelt, um zelluläre Isoformverhältnisse der beiden STAT5-Isoformen STAT5A und STAT5B hochgenau zu messen. Die Methoden wurde unter anderem mittels per ICP-MS absolut quantifizierter rekombinanter STAT5-Isoformen validiert. Für BaF3-EpoR-Zellen konnte so beispielsweise ein relativer STAT5A-Anteil von $69 \pm 2 \%$ ($n = 8$) ermittelt werden. Es wurde erkannt, dass isoformspezifische IPs durch co-IP Zugang zu heterodimergebundenen STAT5-Molekülen ermöglichen, die nicht der Spezifität des Antikörpers entsprechen. Nach

Charakterisierung mehrerer STAT5-Antikörper hinsichtlich ihrer Isoformspezifität war es möglich, mit dem innovativen Konzept der in silico-IP und mathematischer Modellierung drei verschiedene Dimerisierungs-Hypothesen zu modellieren. Um die Hypothesen zu testen, wurden in einem kurzen Beobachtungszeitraum von 10 min Epo-Stimulationsexperimente mit BaF3-EpoR-Zellen durchgeführt, und die erhaltenen Befunde mit den modellierten Erwartungswerten verglichen. So konnte zum ersten Mal experimentell gezeigt werden, dass für phospho-STAT5A und phospho-STAT5B eine statistische Bildung von Homo- und Heterodimeren vorliegt. Diese Strategie wurde auf eine dynamische Modellierung ausgeweitet, welche für längere Beobachtungszeiträume ausgelegt ist. Die Beobachtungen an Zeitreihen-Stimulationsexperimenten über vier Stunden konnten nur mit einem Modell beschrieben werden, welches für Homo- und Heterodimere unterschiedliche Kern-Import- und Kern-Retentionsraten verwendete. So konnten ausschließlich durch Messungen im Zytosol zusammen mit mathematischer Modellierung zum ersten Mal Rückschlüsse auf differentiell dynamisches Verhalten von phospho-STAT5-Dimeren im Austausch zwischen Zytosol und Nukleus erkannt werden. Die Phosphorylierungsgrad-Analytik wurde zudem auf eine weitere, für die Regulation der Transkription wichtige Serin-Phosphorylierungsstelle (Ser779) in der Transaktivierungsdomäne von STAT5A ausgeweitet. Über co-Immunopräzipitationen mit den charakterisierten Antikörpern konnte so gezeigt werden, dass die Bildung von phospho-STAT5-Dimeren unabhängig von dieser Phosphorylierung ist und diese auch nicht unmittelbar durch Epo reguliert wird.