

Aus der Abteilung für Klinische Pharmakologie

Direktor: Prof. Dr. med. S. Endres

Medizinische Klinik und Poliklinik IV

Klinik der Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. M. Reincke

**Einfluss RNA-bindender Proteine auf murine T-Zellen in der  
Tumorthherapie**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Lukas Mallaun

aus Feldkirch

2021

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Sebastian Kobold

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Elke Holinski-Feder  
Prof. Dr. Dolores Schendel

Mitbetreuung durch die  
promovierten Mitarbeiter: Dr. Felicitas Stein  
Prof. Dr. med. Stefan Endres

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 28.01.2021

## Eidesstattliche Versicherung

Mallaun, Lukas

Ich erkläre hiermit an Eides statt,  
dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Titel

Einfluss RNA-bindender Proteine auf murine T-Zellen in der Tumorthherapie

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 01.02.2021

Lukas Mallaun

## Inhaltsverzeichnis

---

1 Einleitung	1
1.1 Prinzipien der Immuntherapie	1
1.1.1 CD8 <sup>+</sup> T-Zellen als Haupteffektoren im Kampf gegen Krebs	1
1.1.2 Adoptiver T-Zelltransfer	1
1.2 Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen in T-Zellen	3
1.3 RNA-bindende Proteine (RBP)	3
1.3.1 Auswahl relevanter RBP für den adoptiven T-Zelltransfer	4
1.3.1.1 TTP	6
1.3.1.2 TIS11b und TIS11d	7
1.3.1.3 AUF1	8
1.3.1.4 HuR	8
1.3.1.5 Roquin 1 und Roquin 2	9
1.4 Fragestellung	10
2 Material und Methoden	11
2.1 Material	11
2.1.1 Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien	11
2.1.2 Reagenzien und Chemikalien	12
2.1.3 Puffer und Gele	13
2.1.4 Kommerzielle Kits	14
2.1.5 Zellkulturmedien und -zusätze	14
2.1.6 Primer	15
2.1.6.1 <i>Overlap-Extension</i> Primer	15
2.1.6.2 <i>Real-time-PCR</i> Primer	15
2.1.7 Antikörper	16
2.1.8 Zelllinien	17
2.1.9 Software	17
2.2 Mäusversuche	17
2.2.1 Mäuse	17
2.2.1.1 OT1-System	17
2.2.1.2 Roquin- <i>knock-out</i> -System	18
2.2.1.3 Tumorwachstum <i>in vivo</i>	18
2.2.2 Isolierung von Splenozyten	18
2.3 Zelluläre Methoden	18
2.3.1 Zellkultur	18
2.3.2 Auftauen und Einfrieren	19
2.3.3 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität	19

2.3.4 Magnetic activated cell sorting (MACS).....	19
2.3.5 T-Zellaktivierungsprotokoll und retrovirale Transduktion .....	19
2.3.5.1 Allgemeines.....	19
2.3.5.2 Transfektion von Platinum-E Zellen .....	19
2.3.5.3 Aktivierungsprotokoll muriner T-Zellen und Transduktion.....	20
2.4 Molekularbiologische Methoden.....	21
2.4.1 PCR.....	21
2.4.1.1 Allgemeines .....	21
2.4.1.2 <i>Overlap-extension-PCR</i> .....	21
2.4.1.3 Relative Quantifizierung mittels <i>Real-time-PCR</i> .....	21
2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese.....	22
2.4.3 Klonierung.....	22
2.4.3.1 Herstellung der Inserts und Auswahl des Vektors .....	22
2.4.3.2 Restriktion.....	22
2.4.3.3 Ligation.....	22
2.4.3.4 Transformation .....	22
2.4.3.5 Plasmid-Aufreinigung .....	23
2.4.3.6 Sequenzierung .....	23
2.4.4 RNA und Protein-Extraktion.....	23
2.4.5 Reverse Transkription .....	23
2.5 Immunologische Methoden.....	24
2.5.1 Proteinexpressionsanalyse.....	24
2.5.1.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese.....	24
2.5.1.2 <i>Western blot</i> .....	24
2.5.2 <i>Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)</i> .....	24
2.6 Statistik.....	24
3 Ergebnisse .....	25
3.1 Expression von RNA-bindenden Proteinen in murinen T-Zellen .....	25
3.1.1 Die Expression von TTP sinkt durch TZR-Stimulierung auf mRNA-Ebene.....	25
3.1.2 TTP wird nach TZR-Aktivierung auf Proteinebene mit schneller Kinetik hochreguliert.....	26
3.1.3 Die Expression von TIS11d sinkt durch TZR-Stimulierung auf mRNA-Ebene, die von TIS11b steigt kurzfristig durch TZR-Stimulierung und sinkt anschließend längerfristig ab.....	27
3.1.4 TIS11b wird nach TZR-Aktivierung auf Proteinebene mit schneller Kinetik hochreguliert.....	27
3.1.5 TZR-Stimulation führt zur Hochregulierung von HuR und AUF1 in murinen	

---

T-Zellen auf mRNA-Ebene.....	28
3.1.6 HuR wird durch TZR-Stimulation auf Proteinebene hochreguliert .....	29
3.1.7 Alle AUF1-Isoformen werden nach erstmaliger TZR-Stimulation in murinen CD8 <sup>+</sup> T-Zellen auf Proteinebene hochreguliert.....	30
3.1.8 Die Expression der Roquin-Proteine ändert sich auf mRNA-Ebene kaum.....	30
3.1.9 Roquin 1 und Roquin 2 werden durch TZR-Stimulation auf Proteinebene hochreguliert.....	31
3.2 Einfluss von Tumorzellen auf RBP.....	32
3.2.1 Verschiedene Tumorzelllinien führen zu unterschiedlich starker T-Zellaktivierung .....	32
3.2.2 Die Verringerung der TTP-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung .....	33
3.2.3 Das Ausmaß der kurzfristigen Hoch- und folgenden Herunterregulierung der TIS11b-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung.....	34
3.2.4 Die Verringerung der TIS11d-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung .....	35
3.2.5 Der Anstieg der HuR-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung ..	37
3.2.6 Der Anstieg der AUF1-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung .....	38
3.2.7 Die Roquin 1-Expression wird durch Tumorzellen beeinflusst .....	39
3.2.8 Die Roquin 2-Expression wird spezifisch durch Tumorzellen hochreguliert .....	40
3.3 Überexpression von RBP in murinen T-Zellen.....	41
3.3.1 HuR, TTP und TIS11b wurden durch Transduktion in B3Z überexprimiert .....	41
3.3.2 TTP-, TIS11b- und HuR-Überexpression führt zu verminderter T-Zellaktivierung durch Pankreaskarzinomzellen.....	42
3.3.3 TTP-Überexpression führt zu verstärkter T-Zellaktivierung durch Kolonkarzinomzellen .....	43
3.4 Roquin- <i>knock-out</i> in murinen T-Zellen.....	43
3.4.1 Roquin- <i>knock-out</i> erhöht die IFN- $\gamma$ -Sekretion von T-Zellen <i>in vitro</i> .....	43
3.4.2 Roquin- <i>knock-out</i> in T-Zellen führt zu beschleunigtem Tumorwachstum <i>in vivo</i> ...	44
4 Diskussion .....	46
4.1 TTP-Familie .....	46
4.1.1 Die Expression der TTP-Familie wird durch TZR-Stimulierung stark beeinflusst..	46
4.1.2 Wirkung von Tumorzellen auf die Expression von TTP, TIS11b und TIS11d.....	47
4.1.3 Überexpression von TTP und TIS11b verändert T-Zellfunktionen .....	48
4.2 HuR und AUF1 .....	49

---

4.2.1 Die Expression von HuR und AUF1 wird durch TZR-Stimulierung stark beeinflusst.....	49
4.2.2 Wirkung von Tumorzellen auf die Expression von HuR und AUF1 .....	50
4.2.3 Überexpression von HuR verringert die IL-2-Sekretion von T-Zellen .....	50
4.3 Roquin-Proteine .....	50
4.3.1 Roquin-Proteine werden durch TZR-Aktivierung auf Proteinebene hochreguliert .	50
4.3.2 Tumorzellen erhöhen die Roquin-Expression.....	51
4.3.4 Roquin- <i>knock-out</i> verändert T-Zellfunktionen und Tumorwachstum .....	52
4.4 Klinische Bedeutung und Ausblick.....	52
5 Zusammenfassung	55
Literaturverzeichnis	56
Abkürzungsverzeichnis	66
Danksagung	69



## 1 Einleitung

### 1.1 Prinzipien der Immuntherapie

Nach dem heutigen Stand der Wissenschaft ist das Immunsystem physiologischerweise in der Lage, Krebszellen zu erkennen und zu eliminieren. Verschiedene, zum Teil noch unverstandene, Mechanismen können dazu führen, dass Tumorzellen der Eliminierung durch das Immunsystem entgehen und so eine aktive Krebserkrankung entsteht (Palucka & Coussens, 2016). Diese Erkenntnisse führten zu der Idee, dass es möglich sein könnte in diese komplexen Interaktionen einzugreifen, um dem Immunsystem die Erkennung und Eliminierung wieder zu ermöglichen: durch sogenannte Immuntherapien.

#### 1.1.1 CD8<sup>+</sup> T-Zellen als Haupteffektoren im Kampf gegen Krebs

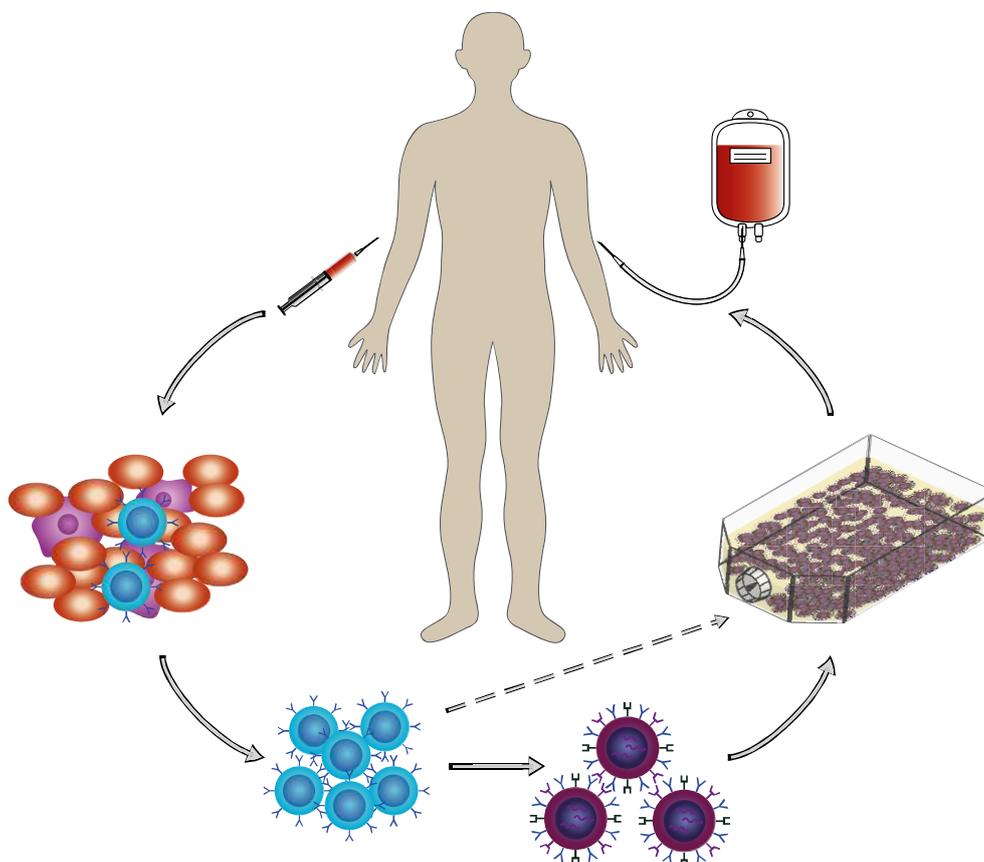
Als Haupteffektoren im Kampf gegen Krebszellen gelten CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen (Appay, Douek, & Price, 2008). CD8<sup>+</sup> T-Zellen besitzen einen T-Zellrezeptor (TZR), der hochspezifisch für ein einziges Antigen ist, welches durch einen Proteinkomplex namens Haupthistokompatibilitätskomplex I (MHC-I) auf der Oberfläche von kernhaltigen menschlichen Zellen präsentiert wird. Nach Bindung der Zielstruktur durch den TZR setzen zytotoxische T-Zellen Perforin und Granzyme frei und lysieren so die erkannte Zelle. Durch somatische Rekombination von verschiedenen Genregionen entstehen T-Zellen, die eine gigantische Anzahl unterschiedlicher Antigene erkennen können. Um zu verhindern, dass T-Zellen gesunde körpereigene Zellen zerstören, werden sogenannte autoreaktive T-Zellen durch ein komplexes System eliminiert (Janeway, Travers, Walport, & Shlomchik, 2001). Durch genetische Instabilität entstehen neue "Neoantigene" auf Tumorzellen, die diese von Körperzellen unterscheiden und so ihre Eliminierung durch T-Zellen ermöglichen (Dunn, Old, & Schreiber, 2004).

#### 1.1.2 Adoptiver T-Zelltransfer

Der direkte therapeutische Einsatz solcher zytotoxischer T-Zellen ist der adoptive T-Zelltransfer. Hierbei besteht die Möglichkeit (1) tumorinfiltrierende T-Lymphozyten (TIL) des Patienten zu entnehmen, aufzureinigen, *in vitro* zu vermehren und dem Patienten rückzuführen, oder (2) naive T-Zellen aus peripherem Blut aufzureinigen und diese genetisch zu verändern, um sie effektiver im Kampf gegen Tumorzellen zu machen (Abbildung 1). Der Einsatz von TIL führte zu kompletten und anhaltenden Ansprechraten von 22% in Patienten mit metastasierten Melanomen (Rosenberg et al., 2011). Dieser Ansatz hat jedoch mehrere Limitationen: Zum einen erfordert die Gewinnung von TIL eine Resektion des Tumors und ist somit ungeeignet für inoperable Patienten. Zudem ist die Therapie auf das

Vorhandensein anti-tumoral wirksamer TIL angewiesen (Houot, Schultz, Marabelle, & Kohrt, 2015). Obwohl TIL aus zahlreichen soliden Tumoren gewonnen werden können, zeigten bisher lediglich TIL aus Melanomen konstant tumorspezifische Zytolyse (Yannelli et al., 1996).

Der Einsatz gentechnisch modifizierter T-Zellen umgeht beide Probleme und eröffnet die Möglichkeit die Effektivität anti-tumoraler T-Zellen weiter zu verbessern. Die erste wichtige Voraussetzung ist die Erkennung der Tumorzelle durch die T-Zelle. Während initial versucht wurde die T-Zelle mit einem tumorspezifischen TZR auszustatten, gibt es mittlerweile auch den Ansatz, sogenannte *chimeric antigen receptors* (CAR) zu verwenden. Diese besitzen eine extrazelluläre Bindestelle eines Antikörpers verbunden mit der intrazellulären Signaldomäne eines TZR und sind somit in der Lage, Tumorantigene unabhängig von MHC-I zu erkennen (Kalos & June, 2013). Diese Therapien zeigten ihre Wirksamkeit bereits in mehreren klinischen Studien, unter anderem mit einer Ansprechrate von 64 % in Patienten mit rezidiertem oder therapierefraktärem B-Zell Lymphom. Besonders beeindruckend ist hierbei auch die hohe Zahl lang anhaltender Remissionsraten von 86 – 89 % der Patienten, die initial auf die Therapie angesprochen hatten (Schuster et al., 2017). Im Vergleich dazu sind die Ergebnisse von CAR in soliden Tumoren bisher enttäuschend und es besteht dringender Bedarf diese zu optimieren (Houot et al., 2015).



**Abbildung 1 Adoptiver T-Zell Transfer (Eigene Abbildung, basierend auf Maus & June, 2016)**

Dem Patienten wird Vollblut entnommen. Durch Zentrifugation werden die zellulären Blutbestandteile isoliert. Mittels magnetic activated cell sorting (MACS) werden T-Zellen isoliert. Diese können gentechnisch modifiziert werden oder direkt in der Zellkultur vermehrt werden. Die veränderten T-Zellen werden in therapeutischer Intention rückinjundiert.

Trotz der zunehmenden Erkenntnis der großen Bedeutung posttranskriptioneller Regulationsmechanismen in T-Zellen (siehe Kapitel 1.2), wurde die Rolle dieser im Kontext der T-zellbasierten Tumorthherapie bisher kaum erforscht. Das Ziel dieser Arbeit ist es zu klären, ob die anti-tumorale Effektivität von T-Zellen durch das Eingreifen in posttranskriptionelle Regulationsmechanismen verbessert werden kann.

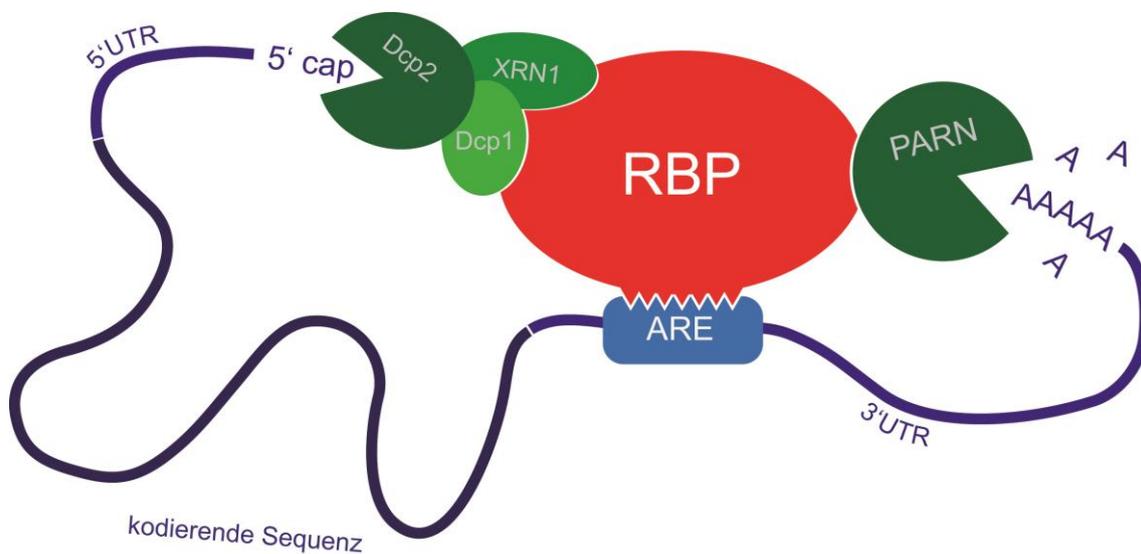
## 1.2 Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen in T-Zellen

Posttranskriptionelle Regulationsmechanismen sind essenziell für die korrekte Funktion von T-Zellen, da sie eine schnelle Reaktion auf exogene Stimuli ermöglichen. Eine Immunantwort kann so, nach Erkennung eines pathogenen Fremdorganismus oder einer krankhaft veränderten körpereigenen Zelle, binnen kürzester Zeit eingeleitet und nach Beseitigung der Bedrohung sofort wieder abgeschaltet werden, um Schäden an gesunden körpereigenen Zellen zu vermeiden (Salerno & Wolkers, 2015). Microarray Untersuchungen zeigten, dass hunderte verschiedene Transkripte in T-Zellen nach TZR-Aktivierung von rapidem mRNA Abbau betroffen waren, darunter wichtige Zytokine, Signaltransduktoren, Transkriptionsfaktoren und Regulatoren von Apoptose (Raghavan et al., 2002). Eine andere Studie beschreibt, dass bis zu 50 % der Änderung von mRNA Level in aktivierten T-Zellen durch posttranskriptionelle Mechanismen verursacht werden (Cheadle et al., 2005). Detaillierte Mechanismen sind bisher nur teilweise bekannt.

## 1.3 RNA-bindende Proteine (RBP)

Die wichtigsten Effektoren posttranskriptioneller Regulation in Immunzellen sind microRNA und RNA-bindende Proteine (RBP). Während microRNA grundsätzlich die Translation von mRNA verhindern und ihren Abbau stimulieren, können RBP Transkripte stabilisieren oder destabilisieren und die Translation sowohl behindern als auch unterstützen. RBP binden im Anschluss an die Transkription als *trans-acting* Faktoren an spezifische *cis*-Bindestellen in der 3'- oder 5'-untranslatierten Region von mRNA. Durch weitere Bindestellen rekrutieren sie dann verschiedene Effektorproteine zur Ziel-mRNA und bilden so Protein-mRNA-Komplexe, sogenannte *messenger ribonucleoprotein particles* (mRNP). Manche dieser Effektorproteine können dann durch Deadenylierung, *decapping* und exo- oder endoribonukleolytischer Aktivität zum Abbau der mRNA führen (Abbildung 2). Andere wiederum besetzen die Bindestellen von abbauenden Enzymen, verhindern damit den Abbau und stabilisieren so die mRNA. Da der poly(A)-Schwanz und die 5'-cap Struktur wichtig für die Translation sind, wird auch diese beeinflusst. Die genaue Zusammensetzung der mRNP bestimmt das Schicksal der mRNA. Diese wird wiederum durch das Vorhandensein von RBP in der Zelle und *cis*-Bindestellen in

der mRNA bestimmt (Ivanov & Anderson, 2013). Neue Methoden und ein zunehmendes Interesse an posttranskriptionellen Regulationsmechanismen führen zur Entdeckung ständig neuer RBP. Waren vor einigen Jahren noch etwa 20 – 30 RBP bekannt, wurden mittlerweile mehr als hundert klassische RBP entdeckt. In den meisten Fällen ist die biologische Funktion dieser Proteine kaum bis nicht bekannt (Hentze, Castello, Schwarzl, & Preiss, 2018). Einige der besser erforschten RBP, wie KH-type splicing regulatory protein (KSRP), Zc3h12a und Fragile X related protein 1 (FXR1P) haben vor allem im angeborenen Immunsystem regulatorische Funktionen (Garnon et al., 2005; Lin et al., 2011; Matsushita et al., 2009). Für diese Arbeit sollten jedoch gezielt RBP untersucht werden, die eine Rolle in T-Zellen spielen.



**Abbildung 2 Vereinfachte Darstellung der Funktionsweise von RBP als Adapterproteine (Eigene Abbildung, basierend auf Ivanov & Anderson, 2013)**

RBP binden an ARE in der 3'-untranslatierten Region ihrer Ziel-mRNA. Durch Bindung an weitere Effektorproteine, wie die *decapping* Enzyme Dcp1 und Dcp2, die Exoribonuklease XRN1 oder die Poly-A-Ribonuklease PARN, werden diese in unmittelbare Nähe zur mRNA gebracht und können diese abbauen.

### 1.3.1 Auswahl relevanter RBP für den adoptiven T-Zelltransfer

Obwohl die Gesamtheit der Funktionen von RBP in T-Zellen noch wenig verstanden ist, wurden bereits einige RBP in T-Zellen beschrieben. Unsere Literaturrecherche ergab mindestens 16 RBP, die eine Rolle in T-Zellen spielen. Im Folgenden wird versucht die vielversprechendsten für die Optimierung des adoptiven T-Zelltransfers herauszufiltern.

Alleine an der Regulation von IL-2 mRNA sind in T-Zellen die RBP Nucleolin und *Y box binding protein 1* (YB-1), *Nuclear Factor 90* (NF90), *Polypyrimidine tract-binding protein 1* (PTBP1) und *Human antigen R* (HuR) beteiligt (C. Y. Chen et al., 2000; La Porta, Matus-Nicodemos, Valentin-Acevedo, & Covey, 2016; Shi, Godfrey, Lin, Zhao, & Kao, 2007;

Techasintana et al., 2017). Von den genannten RBP kommt HuR eine Schlüsselrolle zu, da es die Bindung und Aktivität zahlreicher anderer RBP reguliert (Anderson, 2008). In T-Zellen ist HuR essenziell für die Zytokinexpression nach T-Zellaktivierung und somit ein idealer Kandidat für diese Arbeit (Meisner et al., 2007; J. G. Wang et al., 2006). Für YB-1 und NF90 ist bisher keine weitere Funktion in T-Zellen bekannt. Nucleolin interagiert mit der intrazellulären TZR Domäne CD3 $\epsilon$ , die Funktion dieser Interaktion ist jedoch unbekannt (Gil, Gutierrez, & Alarcon, 2001). Nucleolin und PTBP1 regulieren zudem die Stabilität von CD40-Ligand (CD40L) mRNA in CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Kosinski, Laughlin, Singh, & Covey, 2003; Singh, Laughlin, Kosinski, & Covey, 2004). CD40L wird hauptsächlich von aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert und spielt eine zentrale Rolle in der T-zellvermittelten humoralen Immunantwort durch B-Zellen (van Kooten & Banchereau, 2000). In den für diese Arbeit relevanten CD8<sup>+</sup> T-Zellen ist bisher keine weitere Funktion von Nucleolin und PTBP1 bekannt.

Tristetraprolin (TTP) ist eines der am besten erforschten RBP und ein negativer Regulator zahlreicher T-Zell-assoziiierter Zytokine (Carballo, Lai, & Blakeshear, 1998; Ogilvie et al., 2005; Ogilvie et al., 2009). Ein TTP-*knock-out* in T-Zellen verstärkte deren Aktivierung führte zu verbesserter anti-viraler Effektivität (Moore et al., 2018). Die Untersuchung, ob TTP auch zur Verbesserung der anti-tumoralen Effektivität von T-Zellen genutzt werden kann, liegt nahe. TIS11b und TIS11d sind eng verwandte Proteine von TTP (Varnum, Ma, Chi, Fletcher, & Herschman, 1991). In T-Zellen ist für TIS11b und TIS11d bisher eine Rolle in der T-Zell-Entwicklung und Zellzyklusregulation beschrieben (Galloway et al., 2016; Hodson et al., 2010; Vogel, Bell, Galloway, Ahlfors, & Turner, 2016). Da eine ähnliche, möglicherweise redundante Funktion der TTP-Proteinfamilie in T-Zellen wahrscheinlich ist, wurden alle drei Proteine in dieser Arbeit untersucht.

Roquin 1 und das eng verwandte Protein Roquin 2 sind RBP, die als negative Regulatoren von ko-stimulatorischen Molekülen in T-Zellen überschießende Immunantworten hemmen (Vogel et al., 2013). Der Verlust der Roquin Funktion in T-Zellen führte zu einer überschießenden Immunantwort durch verstärkte Aktivierung von T-Zellen (Vinuesa et al., 2005). Dies macht die Roquin-Proteine zu idealen Kandidaten für diese Arbeit. Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1 (PIN1) ist ein Enzym, das in T-Zellen die Stabilität von Granulozyten-Monozyten-Kolonie-stimulierendem Faktor (GM-CSF) reguliert. Splenozyten von PIN1-*knock-out* Mäusen sekretieren vermehrt IFN- $\gamma$  und IL-2 nach Stimulation. Der Effektor von PIN1 in T-Zellen ist das RBP AU-rich element RNA-binding protein 1 (AUF1) (Esnault, Shen, Whitesel, & Malter, 2006). T-Zellen von AUF1-*knock-out* Mäusen zeigen eine verstärkte Aktivierung (Sadri & Schneider, 2009). Damit ist auch AUF1 ein guter Kandidat zur Optimierung von T-Zelltherapien.

Neben den oben genannten RBP gibt es noch weitere mit bekannter Funktion in T-Zellen, bei denen eine Rolle für den adoptiven T-Zelltransfer weniger wahrscheinlich erscheint. Die RBP *Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like* (hnRNPLL) und *CUG triplet repeat, RNA binding protein 2* (CUGBP2) regulieren alternatives Spleißen und sind essenziell für die T-Zell Entwicklung und Differenzierung (X. Chang, 2016; Mallory et al., 2015). In Effektor T-Zellen ist deren Funktion bisher kaum bekannt. *CUG triplet repeat, RNA binding protein 1* (CUGBP1) kann zum Abbau von mRNA führen und bindet an *GU-rich elements* in T-Zellen (Vlasova et al., 2008). Eine Dysfunktion von CUGBP1 ist mit maligner Entartung von T-Zellen assoziiert (Bohjanen, Moua, Guo, Taye, & Vlasova-St Louis, 2015). Die funktionelle Relevanz für physiologische T-Zellen ist bisher größtenteils unklar. *T-cell intracellular antigen 1* (TIA-1) und *TIA-1-related protein* (TIA-R) sind eng verwandte RBP, die initial in T-Zellen entdeckt wurden und mit der Induktion von Apoptose in Verbindung gebracht wurden (Beck, Medley, O'Brien, Anderson, & Streuli, 1996). Spätere Versuche mit *TIA-1-knock-out* Mäusen deuteten jedoch vor allem auf eine Rolle im angeborenen Immunsystem hin (Piecny et al., 2000).

Bei allen genannten Proteinen sind weitere bisher unbekannte Funktionen in T-Zellen möglich, ebenso gibt es wahrscheinlich bisher unentdeckte RBP in T-Zellen. Aufgrund begrenzter Ressourcen fokussierten wir uns in dieser Arbeit auf die RBP HuR und AUF1, die TTP-Proteinfamilie und die Roquin-Proteine, die nach aktuellem Wissensstand die größte Bedeutung in T-Zellen haben. Auf diese Proteine soll nun näher eingegangen werden.

#### 1.3.1.1 TTP

TTP ist ein Zinkfingerprotein, das an *adenosine-uridine rich elements* (ARE) in der 3' UTR von mRNA bindet und mRNA-abbauende Enzyme rekrutiert bzw. aktiviert. So konnte die Interaktion von TTP mit dem aus mehreren Deadenyasen bestehenden Komplex CCR4-NOT1 (Sandler, Kreth, Timmers, & Stoecklin, 2011), dem Exosom (C. Y. Chen et al., 2001), der Exoribonuklease XRN1 (Hau et al., 2007) und dem *decapping* Enzym Dcp1 (Lykke-Andersen & Wagner, 2005) gezeigt werden. Dadurch führt TTP zum Abbau des Poly(A) Schwanzes und der 5' Cap Struktur und anschließend zur Degradierung der mRNA durch Ribonukleasen. TTP wird in vielen Geweben exprimiert, besonders hoch aber in lymphatischen Geweben wie Lymphknoten, Milz und Thymus sowie in weißen Blutzellen wie neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten und T-Lymphozyten (Taylor et al., 1996). *In vitro* wurde die Bindung von TTP an eine Vielzahl pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Carballo et al., 1998), IL-2 (Ogilvie et al., 2005), IL-3 (Stoecklin, Ming, Looser, & Moroni, 2000), IFN- $\gamma$  (Ogilvie et al., 2009), GM-CSF (Carballo, Lai, & Blackshear, 2000), IL-1 $\beta$  (Y. L. Chen et al.,

2006) und IL-17 gezeigt (Lee et al., 2012). Durch Bindung der mRNA dieser Zytokine führt TTP zu deren Abbau und unterdrückt so inflammatorische Prozesse und verhindert die Schädigung gesunden Gewebes. Mäuse mit *TTP-knock-out* entwickeln schwere Autoimmunsyndrome mit erosiver Arthritis, Dermatitis, Konjunktivitis, Kachexie und Bildung von Autoantikörpern (Taylor et al., 1996). Die hohe Expression in T-Zellen und die Assoziation mit den durch T-Zellen sekretierten Zytokinen TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 machen eine Rolle von TTP in T-Zellen wahrscheinlich. Möglicherweise kann die Zytokinsekretion der T-Zellen durch eine Veränderung der TTP-Expression beeinflusst und damit deren anti-tumorale Effektivität verbessert werden.

#### 1.3.1.2 TIS11b und TIS11d

Die Proteine TIS11b und TIS11d bilden zusammen mit TTP die TTP-Proteinfamilie. Die drei Proteine besitzen eine beinahe identische Stammsequenz, unterscheiden sich aber in der C- und N-terminalen Domäne (Varnum et al., 1991). Versuche zeigten, dass TIS11b wahrscheinlich ebenso wie TTP ein wichtiger Regulator von ARE gesteuertem mRNA Abbau ist (Stoecklin et al., 2002). Sowohl TIS11b als auch TIS11d sind *in vitro* in der Lage, TNF- $\alpha$ , IL-3 und GM-CSF mRNA zu binden und zu deren Abbau zu führen (Lai & Blackshear, 2001; Lai, Carballo, Thorn, Kennington, & Blackshear, 2000). In einem zellfreien System waren alle drei Familienmitglieder in der Lage, die Adenylase PARN zu aktivieren und so zur Deadenylierung ARE enthaltender mRNA Transkripte zu führen (Lai, Kennington, & Blackshear, 2003). Diese *in vitro* Versuche legten ähnliche bzw. überlappende Funktionen der Proteine der TTP-Familie nahe.

Ein konditioneller *double-knock-out* von TIS11b und TIS11d in Thymozyten führte zu einer gestörten T-Zell Entwicklung und schließlich zur Bildung von T-Zell Lymphomen, während der alleinige *knock-out* von TIS11b oder TIS11d keinen Effekt hatte. Die beiden Proteine spielen somit eine redundante Rolle in der T-Zell Entwicklung (Hodson et al., 2010). Neuere Daten belegen außerdem eine wichtige Funktion von TIS11b und TIS11d in der Regulation des Zellzyklus von B- und T-Lymphozyten (Galloway et al., 2016; Vogel et al., 2016). Eine veränderte T-Zellfunktion durch eine Beeinflussung der Expression von TIS11b und TIS11d ist wahrscheinlich. Ob dadurch eine Verbesserung der anti-tumoralen Aktivität von T-Zellen möglich ist, soll in dieser Arbeit untersucht werden.

### 1.3.1.3 AUF1

AUF1 ist ein RBP, das als negativer Regulator überschießende Immunantworten verhindert. Es gibt vier Isoformen von AUF1, die durch alternatives Spleißen entstehen. Die Isoformen p37, p40, p42 und p45 kDa, benannt nach ihrem molekularen Gewicht, werden unterschiedlich exprimiert und binden mit unterschiedlicher Affinität an ihre Ziele. Die stärkste Affinität besitzt die p37 Isoform, es folgen in absteigender Reihenfolge p42, p45 und p40 (Wagner, DeMaria, Sun, Wilson, & Brewer, 1998). Wahrscheinlich besitzen die verschiedenen Isoformen unterschiedliche Funktionen, sodass das Endergebnis von der relativen Expression der Isoformen zueinander abhängt (Raineri, Wegmueller, Gross, Certa, & Moroni, 2004). Passend zu der hohen Affinität kommt der p37 Isoform die bedeutendste Rolle in der Degradation ARE-haltiger Transkripte zu (B. Sarkar, Xi, He, & Schneider, 2003). *In vitro* wurden zahlreiche Ziel-Transkripte für AUF1 beschrieben, unter anderem die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1, IL-2, IL-3, IL-6, GM-CSF und TNF- $\alpha$  (Gratacos & Brewer, 2010). Für die p40 Isoform wurde außerdem eine stabilisierende Funktion für das anti-inflammatorische Protein IL-10 beschrieben (S. Sarkar, Sinsimer, Foster, Brewer, & Pestka, 2008).

AUF1-*knock-out* Mäuse versterben an Endotoxin induziertem Schock, wenn sie mit Lipopolysacchariden stimuliert werden. Der Grund dafür ist, ähnlich wie bei TTP-*knock-out* Mäusen, eine exzessive Produktion der inflammatorischen Zytokine TNF- $\alpha$  und IL-1 $\beta$  (Lu, Sadri, & Schneider, 2006). Diese Mäuse haben außerdem veränderte T-Zellfunktionen mit höherer Proliferationsrate und verstärkter Sekretion von IL-2, TNF- $\alpha$  und IL1 $\beta$  (Sadri & Schneider, 2009). Ein AUF1-*knock-out* in T-Zellen könnte zu einer verstärkten anti-tumoralen Antwort führen.

### 1.3.1.4 HuR

HuR ist ein ARE-bindendes Protein, das im Gegensatz zu den meisten anderen zu einer Stabilisierung einer großen Anzahl von mRNA führt. So wurde *in vitro* unter anderem eine Stabilisierung der pro-inflammatorischen Zytokine GM-CSF (Fan & Steitz, 1998), TNF- $\alpha$  (Dean et al., 2001), IL-4 (Yarovinsky, Butler, Monick, & Hunninghake, 2006), IL-6 (Sung et al., 2009), IL-13 (Casolaro et al., 2008) und IFN- $\gamma$  beobachtet (J. G. Wang et al., 2006). Ein Genom weites Screening mit Hochdurchsatz Präzipitations- und Sequenzierungsmethoden ergab HuR Bindestellen in mehr als 8000 Transkripten (Mukherjee et al., 2011). HuR interagiert mit mehreren anderen RBP, unter anderem mit TTP (Tiedje et al., 2012) und AUF1 (David, Tanveer, & Port, 2007). Durch die Verhinderung der Bindung destabilisierender RBP führt HuR zu einer Stabilisierung von Ziel mRNA (Anderson, 2008).

Ein konditioneller *knock-out* von HuR in Thymozyten führte zu Hyperproliferation von unreifen Thymozyten im Thymus mit gleichzeitig verringerter Anzahl peripherer reifer T-Zellen. Des Weiteren zeigte sich eine bedeutende Rolle von HuR in der Zellzyklusregulation und TZR Signaltransduktion in T-Zellen (Papadaki et al., 2009). Eine weitere Studie beschrieb die Bedeutung von HuR in der Ausbildung des TZR durch Regulation der Expression der CD3 $\zeta$  Kette des TZR (Moulton, Kyttaris, Juang, Chowdhury, & Tsokos, 2008). Interessante Ergebnisse lieferte auch eine Studie über die Wirkungsweise von *Lymphocyte function associated antigen 1* (LFA1), einem Integrin mit großer Bedeutung für die Funktion von T-Zellen und anderen Leukozyten (Verma & Kelleher, 2017). Eine Aktivierung von LFA1 führte zu einer Stabilisierung der mRNA von TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$ , die zentrale Effektormoleküle in T-Zellen darstellen. Eine Inhibierung von HuR führte zu einem kompletten Ausbleiben dieses Effekts (J. G. Wang et al., 2006). Schlussendlich wird die Bedeutung von HuR in T-Zellen dadurch untermauert, dass eine Blockade der HuR Funktion durch niedermolekulare Inhibitoren zu einer Blockierung der Aktivierung und Zytokinexpression in T-Zellen führt (Meisner et al., 2007). Eine Überexpression von HuR könnte somit im Umkehrschluss zu einer Disinhibition von T-Zellen mit verstärkter Zytokinsekretion und anti-tumoralen Aktivität führen.

#### 1.3.1.5 Roquin 1 und Roquin 2

Roquin 1 und Roquin 2 sind RBP, die an *constitutive decay elements* (CDE) in der 3' UTR von mRNA binden und zu deren Abbau führen (Leppek et al., 2013). Bekannte Ziel-mRNA sind TNF- $\alpha$  (Leppek et al., 2013) und die T-zellspezifischen kostimulatorischen Rezeptoren OX40 und ICOS (Vogel et al., 2013). Beide Proteine werden am höchsten in Lymphknoten und Thymus exprimiert, gefolgt von Milz, Lunge und Gehirn, was auf eine Hauptfunktion in der Regulation von Immunzellen hinweist. In allen Geweben ist Roquin 1 deutlich höher exprimiert als Roquin 2, in T-Zellen etwa fünf Mal höher (Vogel et al., 2013).

Eine Punktmutation von Roquin 1 führte in Mäusen zu einem Lupus erythematoses ähnlichen Krankheitsbild mit T-zellspezifischen Abnormitäten mit Überexpression des kostimulatorischen Moleküls ICOS und vermehrter Produktion von IL-21, IL-5 und IFN- $\gamma$  nach Stimulation. Zudem zeigte sich eine exzessive Bildung von folliculären T-Helferzellen und eine Akkumulation aktivierter CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen (Vinuesa et al., 2005). Überraschenderweise führte der alleinige *knock-out* von Roquin 1 in T-Zellen nur zu einem mild ausgeprägten Phänotyp ohne Autoimmunität. Lediglich eine geringe Erhöhung der ICOS-Expression sowie der Zahl der CD8<sup>+</sup> Effektor T-Zellen war zu beobachten. Auch der alleinige *knock-out* von Roquin 2 hatte keinen drastischen Effekt. Erst der *double-knock-out* von Roquin 1 und 2 in

T-Zellen führte zu oben beschriebenem Lupus erythematoses ähnlichen Phänotyp. Die bisher bekannte Hauptfunktion der Roquin-Proteine ist somit die Verhinderung von Autoimmunität durch zu starke Aktivierung von T-Zellen. Dabei unterdrückt Roquin 1 physiologischerweise die Funktion von Roquin 2, während Roquin 2 als Sicherheitsmechanismus bei einem Ausfall von Roquin 1 dessen Funktion beinahe vollständig kompensieren kann. (Vogel et al., 2013; Bertossi et al., 2011). Im adoptiven T-Zelltransfer könnte der Roquin 1-Roquin 2-*double-knock-out* in T-Zellen genutzt werden, um eine stärkere anti-tumorale Immunantwort zu erzeugen.

#### 1.4. Fragestellung

Zur Klärung, ob RBP zur Optimierung des adoptiven T-Zelltransfers genutzt werden können, soll zunächst die Rolle sieben vielversprechender RBP in zytotoxischen T-Zellen näher untersucht werden. Anschließend soll die Auswirkung von *knock-out* und Überexpression der RBP auf die anti-tumorale Effektivität von T-Zellen untersucht werden. Konkret sollen folgende Fragen beantwortet werden:

1. Werden die RBP TTP, TIS11b, TIS11d, HuR, AUF1, Roquin 1 und Roquin 2 in zytotoxischen T-Zellen auf mRNA-Ebene und Proteinebene exprimiert?
2. Wie verhält sich die Expression der genannten RBP nach Aktivierung der T-Zellen? Spielen die RBP eine Rolle in der T-Zellaktivierung?
3. Wie verhält sich die Expression der genannten RBP nach Tumorzellkontakt? Wird die Expression der RBP durch Tumorzellen beeinflusst?
4. Kann die anti-tumorale T-Zellfunktion *in vitro* durch Überexpression oder *knock-out* der genannten RBP beeinflusst werden?
5. Hat der *knock-out* oder die Überexpression von RBP Auswirkungen auf das Tumorstadium *in vivo*?

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Technische Geräte und Verbrauchsmaterialien

96-Well Platte schwarz pure Grade™ (DC protein assay)	BRANDplates (Wertheim, Deutschland)
Alpha Imager HP gel imager	Alpha Innotech (Kasendorf, Deutschland)
Analytical balance ENTRIS224-1S	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
CO <sub>2</sub> -Brutschrank (BD6220)	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Costar Assay Plate 96 Well, Half Area (ELISA)	Corning (Corning, USA)
FACSCanto II	BD Biosciences (New Jersey, USA)
Fujifilm LAS4000	Fujifilm (Tokyo, Japan)
HERAfreeze™ HFU T Serie -86 °C Ultratiefkühlschränke	Heraeus (Hanau, Detuschland)
Innova44 Thermoshaker	New Brunswick Scientific, Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Kühl- und Gefrierschränke 4 °C und -20 °C	Bosch (Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland)
Lamin Air	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Lichtmikroskope Axiovert 40C und Primovort	Zeiss (New York, USA)
LightCycler480 System	Roche (Mannheim, Deutschland)
Mini Trans-Blot® Cell	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
MiniMACS, QuadroMACS	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
Mithras LB 940 Microplate Reader	Berthold Technologies (Bad Wildbad, Deutschland)
Multifuge 2L-R, X3 und 4KR	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Multi-Well-Platten (Zellkultur)	Corning (Corning, USA)
Nalgene® Cryo 1 °C “Mr. Frosty“ Freezing Container	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Nanodrop 2000c	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Neubauer-Zählkammer	MTG GmbH (Bruckberg, Deutschland)
Nichipette EX II Pipettensatz	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Orbitalschüttler DOS-10L	NeoLAB (Heidelberg, Deutschland)
PerfectBlue™ Doppel-Gelsystem Twin S	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
pH-Meter	WTW (Weilheim, Deutschland)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Pipetus	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
Polypropylen Röhrchen 15 ml und 50 ml	Greiner Bio-One (Kremsmünster, Österreich)
PowerPac™ Universal Power Supply	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Reagiergefäße	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Research plus Pipettensatz	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rollenmischer RM 5-40	CAT M. Zipperer (Ballrechten-Dottingen, Deutschland)
Roti®-PVDF	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Serologische Pipetten	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Sprout minicentrifuge	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
T3 Thermocycler	Biometra (Göttingen, Deutschland)
Thermocycler Gene Pro	Bioer (Hangzhou, China)
Thermomixer comfort	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
UV Transilluminator LKB 2011 Macrovue	LKB Bromma (Stockholm, Schweden)

Vortexmischer RS-VA 10	Phoenix (Garbsen, Deutschland)
Welch® Vakuumpumpe	Promega (Wisconsin, USA)
Zentrifuge 5418r	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Zentrifuge Rotina 420R	Hettich GmbH (Tuttlingen, Deutschland)

### 2.1.2 Reagenzien und Chemikalien

2-Propanol 100 %	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
CutSmart Buffer	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
di-Natriumhydrogenphosphat	Merck (Darmstadt, Deutschland)
DNA Gel Loading Dye 6x	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
DNA Stain Clear G	SERVA (Heidelberg, Deutschland)
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA (Pasching, Österreich)
Dynabeads Mouse T-Activator CD3/28	Invitrogen (Carlsbad, USA)
EcoRI-HF	New England Biolabs (Ipswich, USA)
Ethanol 100 %	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
FACSFlow, FACSSafe	BD Biosciences (New Jersey, USA)
GeneRuler™ DNA Ladder Mix	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Glycin	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Guanidin-hydrochlorid	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
HEPES	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Isofluoran	CP PHARMA (Burgdorf, Deutschland)
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kaliumhydrogencarbonat	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Kalziumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Kapa Probe Fast	Kapa Biosystems (Wilmington, USA)
LB-Agar	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
LB-Medium	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
LE-Agarose	Biozym (Hessisch Oldendorf, Deutschland)
Methanol	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Milchpulver, blotting grade	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Nonidet™ P 40 Substitute	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
NOTI-HF	New England Biolabs (Ipswich, USA)
peqGOLD TriFast	VWR International GmbH (Darmstadt, Deutschland)
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Q5 Enzym	New England Biolabs (Ipswich, USA)
RetroNectin	TaKaRa (Kyoto, Japan)
SDS (Sodium dodecyl sulfate)	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Supersignal West Femto Chemiluminescent Substrate	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)

Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
T4 DNA Ligase	New England Biolabs (Ipswich, USA)
TAE Puffer Rotiphorese® 50x	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TEMED (Tetramethylethylendiamin)	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
TRIS	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Trypanblau	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
Tween 20	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)

### 2.1.3 Puffer und Gele

#### CaCl<sub>2</sub> Puffer (Transfektion)

2,5 M CaCl<sub>2</sub>  
in Wasser

#### Block Puffer (Transfektion)

2 % BSA  
in Wasser

#### Waschpuffer (Transfektion)

25 mM HEPES  
in PBS

#### Protein-Extraktion Waschpuffer

0,3 M Guanidin-Hydrochlorid  
in 95 % Ethanol

#### Stripping Puffer

6 M Guanidin-Hydrochlorid  
0,2 % NP-40  
0,1 M β-Mercaptoethanol  
20 mM TRIS-HCl  
in Wasser, pH 7,5

#### SDS-Polyacrylamid Sammelgel

5 % Acrylamid  
25 % 0,5 M TRIS-HCl, pH 6,8  
2,5 % SDS  
0,1 % Ammoniumpersulfat  
0,1 % TEMED  
in Wasser

#### SDS-Polyacrylamid Trenngel

10 % Acrylamid  
25 % 1,5 M TRIS-HCl, pH 8,8  
2,5 % SDS  
0,1 % Ammoniumpersulfat  
0,04 % TEMED  
in Wasser

#### ELISA Coating Puffer

0,2 M Natriumphosphat  
in Wasser, pH 9,5

#### MACS Puffer

2 mM EDTA  
10 % FBS / 1 % BSA  
in PBS

#### Transfektionspuffer

27 mM NaCl  
1 mM KCl  
0,28 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
4,2 mM HEPES  
in Wasser

#### Erylyse Puffer

167 mM Ammoniumchlorid  
0,2 mM Kaliumhydrogenkarbonat  
2,7 mM EDTA  
in Wasser

#### TBS-T

50 mM TRIS  
150 mM NaCl  
1 % Tween20  
in Wasser

#### Laufpuffer für SDS-Page Gelelektrophorese

3,47 mM SDS  
25 mM TRIS  
192 mM Glycin  
in Wasser, pH 8,3

#### Transferpuffer für Western blot

25 mM TRIS  
192 mM Glycin  
20 % Methanol  
in Wasser

#### Laemmli-Puffer 6x

300 mM TRIS  
60 % Glycerol  
12 % SDS  
0,03 % Bromphenolblau  
5 % β-Mercaptoethanol  
in Wasser, pH 6,8

#### ELISA Waschpuffer

0,05 % Tween20  
in PBS

#### ELISA Verdünnungspuffer

10 % FBS  
in PBS

### 2.1.4 Kommerzielle Kits

CD8a (Ly-2) MicroBeads, murin	Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Deutschland)
DC™ Protein Assay	Biorad (München, Deutschland)
GeneJET Plasmid Miniprep Kit	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
Mouse IFN- $\gamma$ ELISA Set (RUO)	BD Biosciences (New Jersey, USA)
MycAlert™ Mycoplasma Detection Kit	Lonza (Basel, Schweiz)
PureLink™ Quick Gel Extraction Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
PureLink™ Quick PCR Purification Kit	Invitrogen (Carlsbad, USA)
RevertAID First Strand cDNA Synthesis Kit	ThermoFisherScientific (Waltham, USA)
ZymoPURE™ Plasmid Maxiprep Kit	Zymo Research (Irvine, USA)

### 2.1.5 Zellkulturmedien und –zusätze

Blasticidin	InvivoGen (San Diego, USA)
Dulbecco's modified Eagles medium (DMEM)	PAA (Pasching, Österreich)
HEPES-Puffer 1M	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
High Glucose FBS	Gibco Products (New York, USA)
L-Glutamin 200 mM	PAA (Pasching, Österreich)
Natrium-Pyruvat	PAA (Pasching, Österreich)
Penicillin/ Streptomycin (100x)	PAA (Pasching, Österreich)
Puromycin	InvivoGen (San Diego, USA)
Roswell Park Memory Institute (RPMI)	PAA (Pasching, Österreich)
Trypsin (10x)	PAA (Pasching, Österreich)
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
<u>Murines T-Zell Medium</u>	<u>DMEM Vollmedium</u>
RPMI	DMEM
10 % FBS	10 % FBS
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin	100 IU/ml Penicillin
100 $\mu$ g/ml Streptomycin	100 $\mu$ g/ml Streptomycin
1 mM Natrium-Pyruvat	<u>Gefriermedium</u>
0,1 % HEPES	90 % FBS
0,1 % $\beta$ -Mercaptoethanol	10 % DMSO
<u>Platinum-E Kulturmedium</u>	<u>Zytotox-Medium</u>
DMEM	RPMI ohne Phenolrot
10 % FBS	1 % FBS
2 mM L-Glutamin	2 mM L-Glutamin
100 IU/ml Penicillin	100 IU/ml Penicillin
100 $\mu$ g/ml Streptomycin	100 $\mu$ g/ml Streptomycin
1 mg/ml Puromycin	1 mM Natrium-Pyruvat
10 mg/ml Blasticidin	

## 2.1.6 Primer

2.1.6.1 *Overlap-Extension* Primer

Primername	Gen	Überhang	Sequenz
2A fwd			5'-GTG AAA CAG ACT TTG AAT TTT GAC C-3'
2A rev		3' GFP	5'-CTT GCT CAC CAT CGG GCC TGG GTT G-3'
GFP fwd	Synthetic GFP (KU721836.1)	NotI	5'-C CCA GGC CCG ATG GTG AGC AAG GGC G-3'
GFP rev		EcoRI	5'-T AAT GAA TTC TTA CTT GTA CAG CTC GTC C-3'
mAUF1 fwd	mAUF1 (NM_001077265.1)	NotI-Kozak	5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG TCG GAG GAG CAG TTC-3'
mAUF1 rev		EcoRI	5'-T AAT GAA TTC TTA GTA TGG TTT GTA GCT ATT TTG ATG TCC-3'
mHuR fwd	mHuR (NM_010485.3)	NotI-Kozak	5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG TCT AAT GGT TAT GAA GAC CAC-3'
mHuR rev		EcoRI	5'-T AAT GAA TTC TTT GTG GGA CTT GTT GG-3'
mHuR rev 2A		3' 2A	5'-G AAG GTC AAA ATT CAA AGT CTG TTT CAC TTT GTG GGA CTT GTT GG-3'
mRoquin1 fwd	mRoquin1 (NM_001100591.1)	NotI-Kozak	5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG CCT GTA CAA GCT CCA C-3'
mRoquin1 rev		EcoRI	5'-T AAT GAA TTC CTA GGG AGC AGA ATT GGA AAC-3'
mRoquin2 fwd	mRoquin2 (NM_001024952.2)	BamHI-Kozak	5'-A TTA GGA TCC GCC ACC ATG CCT GTG CAG GC-3'
mRoquin2 rev		SalI	5'-T AAT GTC GAC GCT GTT AAC CAT CTT CCC ATT TG-3'
mTIS11b fwd	mTIS11b (NM_007564.5)	NotI-Kozak	5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG ACC ACC ACC CTC G-3'
mTIS11b rev		EcoRI	5'-T AAT GAA TTC TTT GTG GGA CTT GTT GG-3'
mTIS11b rev 2A		3' 2A	5'-G AAG GTC AAA ATT CAA AGT CTG TTT CAC TTT GTG GGA CTT GTT GG-3'
mTTP fwd	mTTP (NM_011756.4)	NotI-Kozak	5'-ATT AGC GGC CGC GCC ACC ATG GAT CTC TCT GCC ATC TAC-3'
mTTP rev		EcoRI	5'-T AAT GAA TTC CTC AGA GAC AGA GAT ACG ATT G-3'
mTTP rev 2A		3' 2A	5'-G AAG GTC AAA ATT CAA AGT CTG TTT CAC GTC ATC TGA GAT GGA GAG TCT G-3'
Univ1		NotI-Kozak	5'-ATT AGC GGC CGC GC-3'
Univ2		NotI-Kozak	5'-ATT AGG GCC CGC CAC-3'

2.1.6.2 *Real-time-PCR* Primer

Gen (Accession Code)	Position	Sequenz	Sonde	Effizienz
mAUF1 p45 (NM_001077265.1)	fwd 512 – 531	5'-C AAG ATC GAC GCC AGT AAG A-3'	#88	1,945
und mAUF1 p40 (NM_007516.3)	rev 554 - 572	5'-GTG TCG TGG GGA GGA GTT T-3'		

mHuR (NM_010485.3)	fwd 839 – 856 rev 886 - 905	5'- CT GCT AGG CGG TTT GGA G-3' 5'- AC ACC CAT AGG GGA GAA CCT-3'	#98	1,926
mRoquin1 (NM_001024952.2)	fwd 255 – 272 rev 295 - 321	5'-CG GAG CTG AGA GGA GCT G-3' 5'-AG ATA CAG TCA GCA CAT AGT GTG AAA T-3'	#93	2,061
mRoquin2 (NM_001100591.1)	fwd 3519 – 3538 rev 3607 - 3626	5'-GCA GTG GAA AAT GGT CAT CC-3' 5'-AAT TGG TTT TTG CTC CTC CA-3'	#3	1,909
mRPL13A (NM_009438.5)	fwd 355 – 374 rev 431 - 449	5'-C CCT CCA CCC TAT GAC AAG A-3' 5'-G CCC CAG GTA AGC AAA CTT-3'	#108	1,88
mTIS11b (NM_007564.5)	fwd 96 – 116 rev 207 - 226	5'- C GAC ACA CCA GAT CCT AGT CC-3' 5'- T GGG AGT GCT GTA GTT GAG C-3'	#77	1,933
mTIS11d (NM_001001806.2)	fwd 278 – 301 rev 391 - 408	5'- TTC TAC GAT ATC GAC TTC TTG TGC-3' 5'-AA GCC CGG AGT GAA GCT C-3'	#66	1,868
mTTP (NM_011756.4)	fwd 4 – 23 rev 52 - 69	5'-T CTC TTC ACC AAG GCC ATT C-3' 5'-AT CGA CTG GAG GCT CTC G-3'	#53	2,164

### 2.1.7 Antikörper

	Klon- / Lot- Nummer	Eingesetzte Konzentration	Herkunft	Sitz des Unternehmens
Anti-AUF1	# 2646922	0,1 µg/ml, in 5% BSA in TBS-T	Merck	Darmstadt, Deutschland
Anti-mouse CD3	17A2	1 µg/ml bzw. 0,1 µg/ml in PBS	BD Biosciences	New Jersey, USA
Anti-mouse CD28	37.51	0,1 µg/ml bzw. 2 µg/ml in PBS	BD Biosciences	New Jersey, USA
Goat Anti-rabbit IgG-HRP	# C2411	0,2 µg/ml in 5% BSA in TBS-T	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Goat Anti-rat IgG-HRP	# H0211	0,2 µg/ml in 5% BSA in TBS-T	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA
Anti-Roquin1/2	3F12	1:10 in 1% MLK in TBS-T	Institute for Immunology	München, Deutschland
BRF1/2 Antibody	# 1	0,038 µg/ml in 5% BSA in TBS-T	Cell Signaling	Cambridge, UK
ELAVL1/HuR	D9W7E	0,025 µg/ml in 5% MLK in TBS-T	Cell Signaling	Cambridge, UK
Tristetraprolin	D1I3T	0,067 µg/ml in 5% BSA in TBS-T	Cell Signaling	Cambridge, UK
β-Actin HRP	C4	0,1 µg/ml in 5% BSA in TBS-T	Santa Cruz Biotechnology	Dallas, USA

### 2.1.8 Zelllinien

Zelllinie	Zellart	Kulturmedium	Herkunft
B3Z	Murines CD8 <sup>+</sup> T-Zellhybridom mit SIINFEKL-spezifischem TZR	Murines T-Zellmedium ohne $\beta$ -Mercaptoethanol	Prof. Wolfgang Uckert (Charité Berlin)
EG7 (EL4-OVA)	Murine Lymphom Zelllinie (C57BL/6), exprimiert stabil Ovalbumin	Murines T-Zellmedium ohne $\beta$ -Mercaptoethanol	American Type Culture Collection (ATCC)
MC38-GFP-iRFP-OVA	Murine Kolorektales Adenokarzinom Zelllinie (C57BL/6), exprimiert stabil Ovalbumin	DMEM-Vollmedium	MC38-GFP von Prof. Mathias Heikenwälder (Helmholtz Zentrum München), mit IRFP-OVA transduziert durch Jennifer Heinrich
Panc02-OVA	Murine Pankreaskarzinom Zelllinie (C57BL/6), exprimiert stabil Ovalbumin	DMEM-Vollmedium	Panc02 von Prof. Christiane Bruns (LMU München), mit OVA transduziert durch Collin Jacobs
Platinum-E (murin)	Retrovirale Verpackungszelllinie	Platinum-E Kulturmedium	Cellbiolabs
Primäre murine T-Zellen		Murines T-Zellmedium	
T110299-OVA	Murine Pankreaskarzinom Zelllinie (KPC), exprimiert stabil Ovalbumin	DMEM-Vollmedium	Dr. Jens Siveke (TU München)

### 2.1.9 Software

Adobe Creative Suite	Adobe Systems	San Jose, USA
Endnote	Thomson Reuters	New York, USA
FlowJo	Tree Star	Ashland OR, USA
GraphPad Prism	GraphPad Software	La Jolla, USA
LightCycler 480 Software	Roche Diagnostics International AG	Rotkreuz, Schweiz
Microsoft Office	Microsoft	Redmond, USA
SnapGene	GSL Biotech LLC	Illinois, USA

## 2.2 Mäusversuche

### 2.2.1 Mäuse

#### 2.2.1.1 OT1-System

C57BL/6-Tg (TcraTcrb) 1100Mjb/J Mäuse wurden von The Jackson Laboratory (Bar Harbor, USA) erworben. Diese C57BL/6 Mäuse enthalten transgene TZR in ihren CD8<sup>+</sup> T-Lymphozyten, die spezifisch Ovalbumin im Kontext von MHC-I erkennen.

### 2.2.1.2 Roquin-*knock-out*-System

C57BL/6 Mäuse mit konstitutionellem (Rc3h1fl/fl; Rc3h2fl/fl; CD4-Cre (Vogel et al., 2013)) bzw. Tamoxifen induzierbarem (Rc3h1fl/fl; Rc3h2fl/fl; Cre-ERT2 (Jeltsch et al., 2014)). Roquin 1-Roquin 2-*double-knock-out* in T-Lymphozyten wurden freundlicherweise von Prof. Vigo Heissmeyer (München, Deutschland) bereitgestellt.

### 2.2.1.3 Tumorwachstum *in vivo*

Je  $2 \times 10^6$  Pankreaskarzinomzellen der Zelllinie Panc02-OVA wurden subkutan in die Flanken von fünf Wildtyp und fünf Roquin 1-Roquin 2-*double-knock-out* (Rc3h1fl/fl; Rc3h2fl/fl; CD4 Cre) Mäusen injiziert. Anschließend wurden alle ein bis drei Tage Länge und Breite der Tumoren mittels Schiebelehre gemessen und die Tumorgöße mittels Flächenberechnung abgeschätzt. Abbruchkriterien waren Ulzerationen, eine Tumorgöße über 225 mm<sup>2</sup> oder Verhaltensauffälligkeiten der Mäuse. Sowohl Injektion als auch Messung der Tumorgöße geschah verblindet. Die Entblindung erfolgte erst nach dem Tod der letzten Maus.

### 2.2.2 Isolierung von Splenozyten

Mäuse wurden unter Anästhesie mit Isofluran mittels Genickbruch getötet und die Milzen entnommen. Die Milzen wurden mit Medium gespült und auf einem Zellsieb mit 30 µm Porengröße zerrieben. Die Erythrozyten wurden durch dreiminütige Inkubation in Erylyse Puffer lysiert und die übrig gebliebenen Splenozyten in murinem T-Zellmedium gelöst.

## 2.3 Zelluläre Methoden

### 2.3.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in entsprechendem Medium in Zellkulturflaschen bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> Gehalt und 95 % Luftfeuchtigkeit in Brutschränken kultiviert. Die Zellen wurden alle zwei bis drei Tage geteilt. Adhärente Zellen wurden hierfür gewaschen, mit Trypsin gelöst und in frischem Medium aufgenommen wurden. Tests mit MycoAlert™ Mycoplasma Detection Kits wurden durchgeführt, um Kontaminationen der Zellen mit Mykoplasmen auszuschließen. Sämtliche Experimente mit Zellen erfolgten unter sterilen Bedingungen in einer Sicherheitswerkbank.

### 2.3.2 Auftauen und Einfrieren

Zur längeren Aufbewahrung wurden je  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Gefriermedium gelöst und in Kryoröhrchen im *Kryo-Einfriergerät Mr. Frosty* schonend um  $-1 \text{ }^\circ\text{C}$  pro min auf  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  gekühlt und eingefroren. Zum Auftauen wurden die Zellen schnellstmöglich in warmem Kulturmedium gelöst, gewaschen und in Zellkulturflaschen überführt.

### 2.3.3 Bestimmung von Zellzahl und Viabilität

Zur Unterscheidung von lebenden und toten Zellen wurden diese in Trypanblau gelöst und im Lichtmikroskop untersucht. Die vitale Zellzahl wurde folgendermaßen berechnet:

Zellzahl pro ml = (gezählte Zellen / gezählte Kammern) x Verdünnungsfaktor x 10.000

### 2.3.4 Magnetic activated cell sorting (MACS)

CD8<sup>+</sup> MACS Kits wurden gemäß Herstellerprotokoll verwendet, um T-Lymphozyten aus Splenozyten zu isolieren.

### 2.3.5 T-Zellaktivierungsprotokoll und retrovirale Transduktion

#### 2.3.5.1 Allgemeines

In dieser Arbeit wurden RBP in murinen T-Zellen durch retrovirale Transduktion überexprimiert. Zur Herstellung der Vektoren wurde die Verpackungszelllinie Platinum-E genutzt. Diese wiederum wurden dann verwendet, um murine T-Zellen zu transduzieren.

#### 2.3.5.2 Transfektion von Platinum-E Zellen

Platinum-E Zellen wurden aus Zellkulturflaschen gelöst und in 6-Well-Platten ausplattiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen nach Erreichen einer Konfluenz von 70 % transfiziert. Dafür wurden pro Well 18 µg des Plasmids pMP71 mit dem enthaltenen Zielgen mit 15 µl CaCl<sub>2</sub> Puffer gemischt und mit ddH<sub>2</sub>O auf ein Gesamtvolumen von 150 µl gebracht. Die Lösung wurde dann tröpfchenweise mit 150 µl Transfektionspuffer gemischt, 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Platinum-E Zellen gegeben. Nach sechs Stunden wurde das Medium durch unverbrauchtes Medium ersetzt. Die nun virusproduzierenden Zellen wurden für 42 Stunden im Brutschrank inkubiert.

### 2.3.5.3 Aktivierungsprotokoll muriner T-Zellen und Transduktion

Tag 1: Nach Isolierung von Splenozyten und CD8<sup>+</sup> MACS wurden pro ml  $2 \times 10^6$  isolierte T-Zellen in T-Zellmedium mit 0,1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1 ng/ml IL-2 in 6-Well-Platten ausplattiert und mit 1  $\mu$ g/ml anti-mouse CD3 und 0,1  $\mu$ g/ml anti-mouse CD28 Antikörpern für 24 Stunden im Brutschrank aktiviert.

Tag 2: Die aktivierten T-Zellen wurden gezählt und in murinem T-Zellmedium mit 0,1 %  $\beta$ -Mercaptoethanol und 1 ng/ml IL-2 auf eine Konzentration von  $10^6$  pro ml gebracht. Den T-Zellen wurde pro ml  $4 \times 10^5$  Dynabeads Mouse T-Activator anti-CD3-anti-CD28 zugefügt. Für die Transduktion wurden 24-Well-Platten über Nacht bei 4 °C mit RetroNectin beschichtet und anschließend für 30 min mit 500  $\mu$ l Block Puffer geblockt. In der Zwischenzeit wurde der Virusüberstand der am Vortag transfizierten Platinum-E Zellen abgenommen und durch unverbrauchtes murines T-Zellmedium ersetzt. Der Virusüberstand wurde fünf min bei 400 x g zentrifugiert, um enthaltene Zellen zu pelletieren. Die geblockten Wells wurden mit 2 ml Waschpuffer gewaschen und pro Well wurde 1 ml des Virusüberstands zugegeben. Die Platten wurden bei 3000 x g und 4 °C für 90 min zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und durch 1 ml der oben genannten T-Zellsuspension ersetzt. Die Platten wurden erneut für 30 min bei 800 x g und 32 °C zentrifugiert und im Brutschrank inkubiert.

Tag 3-7: Für die Transduktion wurde der Virusüberstand der Platinum-E Zellen an Tag 3 ein zweites Mal abgenommen und zentrifugiert. Anschließend wurde 1 ml des Virusüberstands auf jedes T-Zell Well pipettiert und 90 min bei 800 x g und 32 °C zentrifugiert. Die transduzierten T-Zellen wurden im Brutschrank inkubiert. Nach sechs Stunden wurde die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie (FACS) bestimmt. Die T-Zellen wurden ab Tag 3 alle zwei Tage gezählt und auf eine Konzentration von  $10^6$  pro ml in unverbrauchtem murinem T-Zellmedium mit 50 ng/ml IL-15 verdünnt.

Tag 7: Für die Restimulation expandierter T-Zellen wurden Wells einer 12-Well-Platte entweder mit PBS, 0,1  $\mu$ g/ml anti-CD3 Antikörpern in PBS oder 0,1  $\mu$ g/ml anti-CD3 und 2  $\mu$ g/ml anti-CD28 Antikörpern in PBS über Nacht bei 4 °C beschichtet. Anschließend wurden T-Zellen in einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  pro ml T-Zellmedium ohne Zusätze auf die beschichteten Wells pipettiert und nach drei Stunden sowie nach 24 Stunden Inkubation mit Trizol lysiert, um RNA und Proteine zu extrahieren.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 PCR

#### 2.4.1.1 Allgemeines

In dieser Arbeit wurde die Q5 Polymerase von NEB laut Herstellerprotokoll in folgendem Ansatz verwendet: 100 ng DNA in 23,5 µl Wasser; 1 µl dNTP; 10 µl GC Enhancer; 10 µl Q5 Reaction Buffer; 2,5 µl Primer *forward*; 2,5 µl Primer *revers*; 0,5 µl Q5 Polymerase.

#### 2.4.1.2 *Overlap-extension-PCR*

Die *Overlap-extension-PCR* wurde verwendet, um Restriktionsschnittstellen an die cDNA von RBP anzuhängen. Dazu wurde die *PCR* mit speziellen *overlap-extension* Primern durchgeführt, eine Gel-Elektrophorese durchgeführt und die DNA Fragmente mittels PureLink Quick Gel Extraction Kit von Invitrogen nach Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Primer wurden mittels SnapGene geplant und von Metabion hergestellt.

#### 2.4.1.3 Relative Quantifizierung mittels *Real-time-PCR*

Für die *Real-time-PCR* wurde der LightCycler 480 von Roche verwendet. Pro Well wurden 3 µl cDNA und 7 µl *Mastermix* (5 µl KapaProbe Fast; 0,2 µl Primer *forward*; 0,2 µl Primer *revers*; 0,1 µl Sonde; 1,5 µl ddH<sub>2</sub>O) gemischt. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt und mit der LightCycler 480 Software ausgewertet. Wenn eines der Triplikate einen CP-Wert über 30 hatte, wurde das Experiment verworfen und wiederholt, um unspezifische Messwerte auszuschließen. Um unspezifische Signale durch Primer Dimere zu detektieren, wurden für jedes Primerpaar drei Wells mit Wasser und drei Wells mit RNA statt cDNA als Negativkontrollen verwendet. Wenn der niedrigste CP-Wert einer der Negativkontrollen weniger als fünf Zyklen höher war als der höchste CP-Wert der Proben, wurde das Experiment verworfen und wiederholt. Die verwendeten Primer wurden mithilfe des Roche Universal ProbeLibrary Assay Design entworfen und die zugehörigen Hydrolyse-Sonden des Universal ProbeLibrary Sets verwendet. Zur Bestimmung der Amplifikationseffizienz wurden zunächst Verdünnungsreihen (unverdünnt, 1:10, 1:100, 1:1000) für jedes Primerpaar durchgeführt und die Effizienz mittels LightCycler 480 Software berechnet. Für die relative Quantifizierung wurde das ribosomale Strukturprotein RPL13A als Referenzgen verwendet.

#### 2.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

In dieser Arbeit wurden ein- bis dreiprozentige Agarosegele in TAE Puffer verwendet. Die Proben wurden im Verhältnis 1:6 mit DNA Loading Dye gemischt und GeneRuler DNA Ladder Mix als Leiter aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 bis 110 V für 30 bis 60 Min. Zur Visualisierung wurde dem Agarosegel SERVA DNA Stain Clear G zugefügt.

#### 2.4.3 Klonierung

In dieser Arbeit wurde die cDNA von RBP durch Klonierung vermehrt. Die DNA Sequenz (*insert*) wurde in ein Plasmid ligiert. Bakterien wurden mit dem Plasmid transformiert. Die Bakterien wurden vermehrt und schließlich das Plasmid aufgereinigt.

##### 2.4.3.1 Herstellung der Inserts und Auswahl des Vektors

Die *Inserts* wurden mittels *overlap-extension-PCR* hergestellt und mit den flankierenden Restriktionsschnittstellen für NotI und EcoRI versehen. Als Vektor wurde der retrovirale Transduktionsvektor pMP71 mit Ampicillin Resistenz verwendet.

##### 2.4.3.2 Restriktion

*Inserts* und Vektoren wurden als *double digest* für eine Stunde bei 37 °C mit folgendem Ansatz verdaut: 5 µl CutSmart Buffer; 1 µl NotI-HF; 1 µl EcoRI-HF; 1 µg DNA in 43 µl Wasser  
Der geschnittene Vektor wurde mittels Gelelektrophorese und PureLink Quick Gel Extraction Kit (ThermoFisherScientific), das *insert* mit dem PureLink PCR Purification Kit (ThermoFisherScientific) laut Herstellerprotokoll aufgereinigt.

##### 2.4.3.3 Ligation

Die *Sticky-end-Ligation* erfolgte mit der T4 DNA Ligase (NEB) laut Herstellerprotokoll in einem molaren Verhältnis von 3:1 (*insert*:Vektor).

##### 2.4.3.4 Transformation

Kompetente Bakterien des *Escherichia coli* Stamms DH5α wurden durch Hitzeschock transformiert. Hierfür wurden die Bakterien kurz auf Eis angetaut, 50 ng des ligierten Plasmids zugegeben und für 15 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgte für 60 Sekunden bei

42 °C. Nach weiteren zwei min Inkubation auf Eis wurden die Bakterien eine Stunde in LB-Medium vorkultiviert, auf LB-Agarplatten mit 0,1 % Ampicillin ausplattiert und für 12 bis 16 Stunden bei 37 °C inkubiert.

#### 2.4.3.5 Plasmid-Aufreinigung

Einzelkolonien der transformierten Bakterien wurden für weitere 12 bis 16 Stunden in 5 ml LB-Medium mit 0,1 % Ampicillin vermehrt. Anschließend wurden die Plasmide mit dem GeneJET Plasmid Miniprep Kit laut Herstellerprotokoll aufgereinigt. Nach erfolgreicher Sequenzierung eines Plasmids wurden 300 ml LB-Medium angeimpft und nach 12 bis 16 Stunden mit dem ZymoPURE Plasmid Maxiprep Kit laut Herstellerprotokoll aufgereinigt, um größere Mengen an DNA zu gewinnen.

#### 2.4.3.6 Sequenzierung

Aufgereinigte Plasmide wurden mit dem Mix2Seq Kit von Eurofins nach der Sanger-Methode sequenziert und mithilfe des Programms SnapGene mit der erwarteten Sequenz abgeglichen.

#### 2.4.4 RNA und Protein-Extraktion

In dieser Arbeit wurden mRNA und Proteine von RBP simultan mittels peqGOLD TriFast aus murinen T-Zellen isoliert. Hierfür wurden ein bis zehn Millionen T-Zellen pelletiert und in 1 ml peqGOLD TriFast resuspendiert. Die RNA- und Proteinextraktion erfolgte nach Herstellerprotokoll. Anschließend wurde die RNA Konzentration und Reinheit mit dem NanoDrop photometrisch bestimmt. Die Proteinkonzentrationsmessung erfolgte mittels DC Protein Assay nach Herstellerprotokoll.

#### 2.4.5 Reverse Transkription

Die reverse Transkription erfolgte mit dem RevertAID First Strand cDNA Synthesis Kit (ThermoFisherScientific). 0,5 bis 1 µg RNA wurde in 11,5 µl RNase freiem Wasser verdünnt und folgender Reaktionsansatz zugegeben: 1 µl Oligo-dT; 4 µl 5x Reaction Buffer; 2 µl dNTP Mix (10 mM); 0,5 µl RiboLock RNase inhibitor (40 U/µl); 1 µl RevertAID Reverse Transcriptase (200 U/µl). Die Reaktion erfolgte bei 42 °C für 60 min und wurde bei 70 °C für zehn min terminiert. Die cDNA wurde verdünnt und bei -80 °C gelagert.

## 2.5 Immunologische Methoden

### 2.5.1 Proteinexpressionsanalyse

#### 2.5.1.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Nach Bestimmung der Proteinkonzentration wurden 50 µg Protein jeder Probe mit reduzierendem Laemmli-Puffer versehen. Diese Lösung wurde in vorgefertigte Taschen zehnpromzentiger Polyacrylamidgele pipettiert. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 Volt für 1,5 Stunden. Zur Größenbestimmung der Proteinbanden wurde die PageRuler Prestained Protein Ladder mit vorgefärbten Banden zwischen 10 kDa und 180 kDa verwendet.

#### 2.5.1.2 *Western blot*

Das eigentliche *blotting* erfolgte mit dem Mini Trans-Blot Cell (BioRad) für 1,5 Stunden bei 110 Volt. Die verwendete 0,45 µm PVDF Membran wurde zuvor für 30 Sekunden in Methanol aktiviert. Die Membran wurde in einer fünfprozentigen Milchlösung für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt, um unspezifische Bindungen zu verringern und 15 min in TBS-T gewaschen. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach einem weiteren Waschschritt wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in HRP-gekoppeltem Sekundär-Antikörper inkubiert und erneut gewaschen. Die Membran wurde mit 1 ml SuperSignal West Pico oder Femto (ThermoFisherScientific) beträufelt und mit dem LAS Reader fotografiert. Als Ladekontrolle wurde der *Housekeeper* β-Actin verwendet. Dazu wurden die Membranen 15 min in Stripping Puffer gelegt, nochmals geblockt und für eine Stunde bei Raumtemperatur mit anti-β-Actin-HRP Antikörper inkubiert und erneut entwickelt.

#### 2.5.2 *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

In dieser Arbeit wurde die IFN-γ Konzentration in T-Zellüberständen mit einem Kit von BD Biosciences nach Herstellerprotokoll bestimmt.

## 2.6 Statistik

Die Mittelwerte in den Experimenten dieser Arbeit entsprechen dem arithmetischen Mittel. Die statistischen Analysen dieser Arbeit wurden mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben, bei ungleicher Standardabweichung mit Welch-Korrektur, oder zweifacher Varianzanalyse (ANOVA; nur Abbildung 22) durchgeführt. Die Korrelationen wurden nach Pearson geprüft. Als Signifikanzniveau wurde  $p < 0,05$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*) und  $p < 0,001$  (\*\*\*) festgelegt. Alle Berechnungen erfolgten mit GraphPad Prism.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Expression von RNA-bindenden Proteinen in murinen T-Zellen

Zu Beginn sollte geklärt werden, ob die sieben RBP TTP, TIS11b, TIS11d, HuR, AUF1, Roquin 1 und Roquin 2, die aufgrund ihrer bisher bekannten Funktion potenziell eine Rolle im adoptiven T-Zelltransfer spielen könnten (siehe 1.2), in zytotoxischen T-Zellen exprimiert werden. Zudem sollte geprüft werden, ob die Expression der RBP durch die Aktivierung der T-Zellen durch TZR-Stimulation, Aktivierung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 und Gabe von T-Zellwachstumsfaktoren IL-2 und IL-15 beeinflusst wird. Dazu wurden CD8<sup>+</sup> T-Zellen aus den Milzen von Mäusen isoliert und anhand eines Aktivierungsprotokolls kultiviert (Abbildung 3).

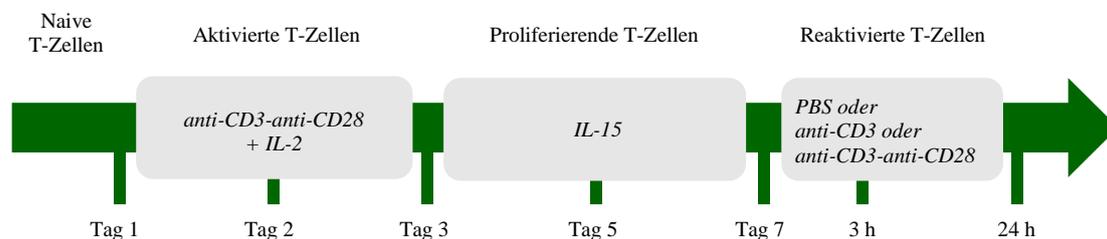
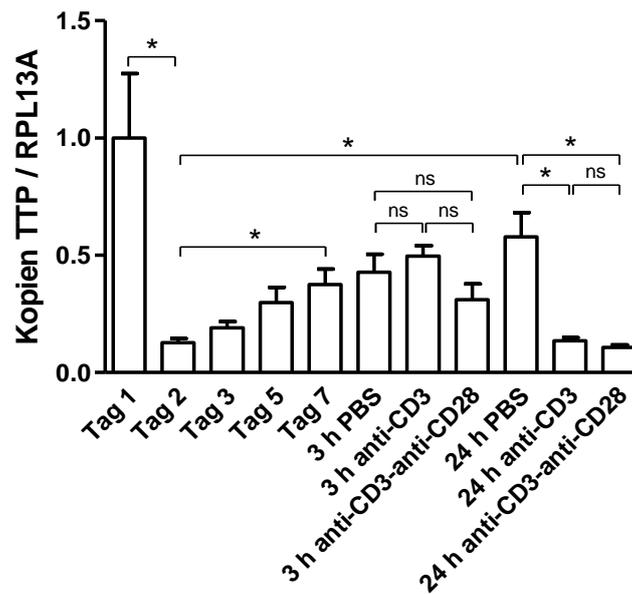


Abbildung 3 Zellkultivierung, Aktivierung und Analysezeitpunkte muriner CD8<sup>+</sup> T-Zellen

Im Verlauf des Protokolls wurde zu verschiedenen Zeitpunkten mRNA aus den T-Zellen extrahiert und die Expression oben genannter RBP mittels *Real-time-PCR* bestimmt. Um eine mögliche posttranskriptionelle Regulation der RBP zu erfassen, wurde deren Expression zusätzlich mittels *Western blot* untersucht. Dazu wurden Proteine aus den gleichen T-Zellen extrahiert, die zuvor bereits mittels *Real-time-PCR* analysiert wurden (Abbildung 3).

##### 3.1.1 Die Expression von TTP sinkt durch TZR-Stimulierung auf mRNA-Ebene

TTP wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert. Die Expression von TTP zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde relativ zu seiner Expression an Tag 1 berechnet und angegeben. Nach erstmaliger Aktivierung der T-Zellen für 24 Stunden sank die Expression von TTP auf 13 % des Ausgangswertes an Tag 1 ab. Unter IL-15 stieg die Expression von TTP im Verlauf einer Woche sukzessive auf 38 % an. Nach erneuter TZR-Stimulation für 24 Stunden sank die Expression von TTP wieder auf 14 % (anti-CD3) bzw. 11 % (anti-CD3-anti-CD28). In der PBS Kontrollgruppe stieg die Expression von TTP auf 58 % an. Nach drei Stunden wurde keine Expressionsänderung gemessen (Abbildung 4).

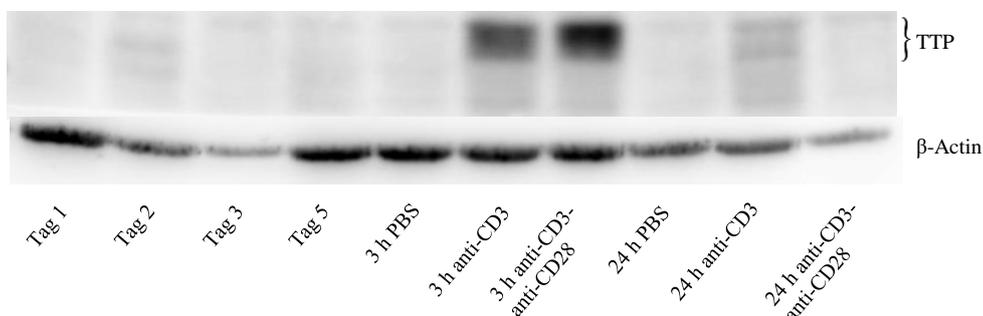


**Abbildung 4 TTP-Expression in murinen T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert (Abbildung 3). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression von TTP mittels *Real-time-PCR* bestimmt. RPL13A diente als Referenzgen. Alle Werte sind relativ zum Mittelwert von Tag 1. Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von neun unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), ns (nicht signifikant).

### 3.1.2 TTP wird nach TZR-Aktivierung auf Proteinebene mit schneller Kinetik hochreguliert

TTP wurde in unstimulierten murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nicht auf Proteinebene exprimiert. Auch nach erstmaliger TZR-Stimulation zeigte sich nach 24 Stunden kein eindeutiges Signal. Nach drei Stunden TZR-Stimulation mit anti-CD3- oder anti-CD3- und anti-CD28 Antikörpern wurde ein starkes Signal detektiert, das nach 24 Stunden bereits wieder verschwunden war (Abbildung 5).

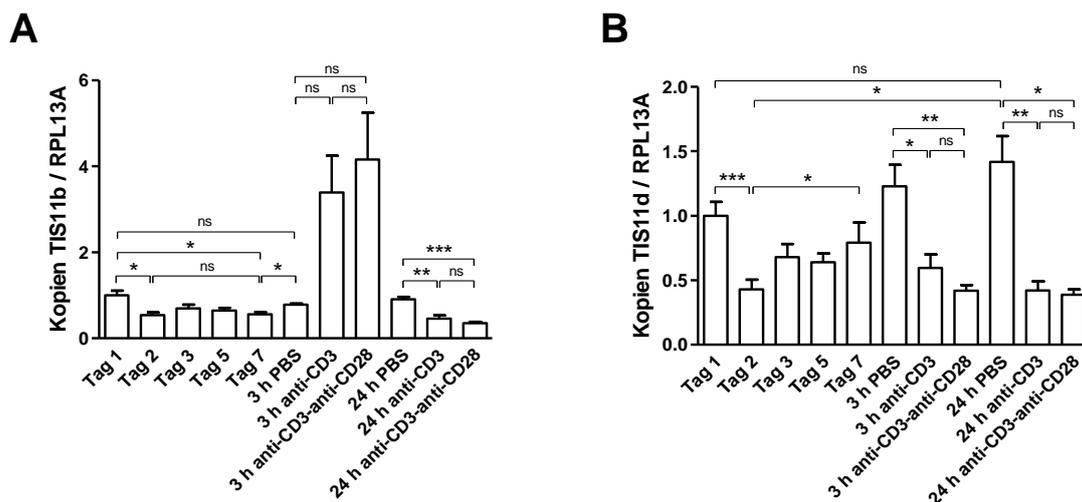


**Abbildung 5 Proteinexpression von TTP in murinen T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert. Proteine wurden zu mehreren Zeitpunkten extrahiert (Abbildung 3). Die TTP-Expression wurde mittels *Western blot* untersucht.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

3.1.3 Die Expression von TIS11d sinkt durch TZR-Stimulierung auf mRNA-Ebene, die von TIS11b steigt kurzfristig durch TZR-Stimulierung und sinkt anschließend längerfristig ab

TIS11b und TIS11d wurden zu allen untersuchten Zeitpunkten exprimiert. Die Expression von TIS11b und TIS11d zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde relativ zu ihrer Expression an Tag 1 berechnet und angegeben. Nach erstmaliger Aktivierung der T-Zellen für 24 Stunden sank die Expression von TIS11b auf 54 % und jene von TIS11d auf 43 %. Unter IL-15 stieg die Expression von TIS11d im Verlauf einer Woche sukzessive auf 79 % an, während jene von TIS11b konstant verringert blieb. Nach erneuter TZR-Stimulation für 24 Stunden sank die Expression von TIS11b auf 46 % (anti-CD3) bzw. 35 % (anti-CD3-anti-CD28) und jene von TIS11d auf 42 % (anti-CD3) bzw. 39 % (anti-CD3-anti-CD28). In den PBS Kontrollgruppen stieg die Expression von TIS11b auf 91 %, die von TIS11d auf 142 %. Nach drei Stunden sank die Expression von TIS11d auf 60 % (anti-CD3) bzw. 42 % (anti-CD3-anti-CD28; Abbildung 6 A, B).



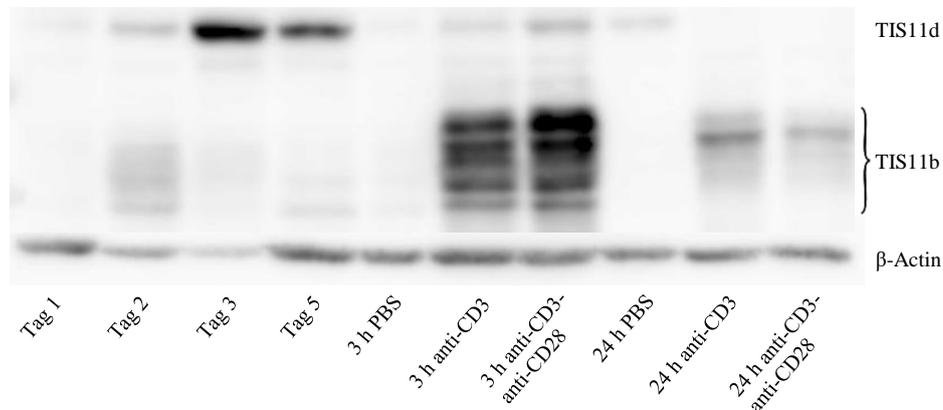
**Abbildung 6 TIS11b- und TIS11d-Expression in murinen T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert (Abbildung 3). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression von TIS11b (A) und TIS11d (B) mittels *Real-time-PCR* bestimmt. RPL13A diente als Referenzgen. Alle Werte sind relativ zum Mittelwert von Tag 1. Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von neun unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ), ns (nicht signifikant).

3.1.4 TIS11b wird nach TZR-Aktivierung auf Proteinebene mit schneller Kinetik hochreguliert

In unstimulierten murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen konnte TIS11b auf Proteinebene nicht nachgewiesen werden. Nach initialer und wiederholter TZR-Stimulation wurde TIS11b hochreguliert. Dabei fiel auf, dass die Expression nach drei Stunden mit Abstand am höchsten war, während sie nach 24 Stunden bereits wieder abfiel. TIS11d konnte nur schwach detektiert werden. Der hier beobachtete Anstieg der Expression an Tag 3 konnte in Wiederholungen nicht reproduziert

werden, sodass keine Aussage über die Regulation von TIS11d getroffen werden konnte (Abbildung 7).

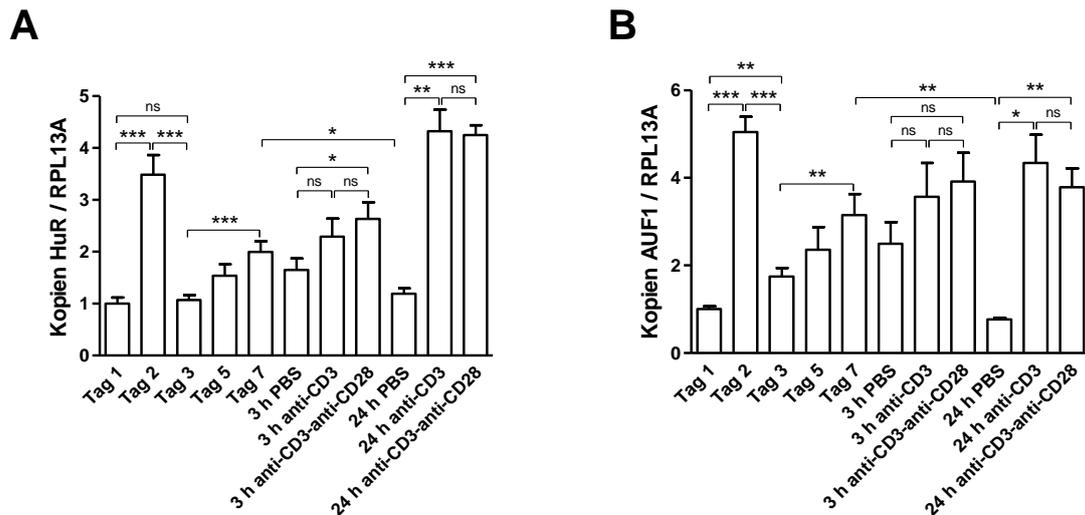


**Abbildung 7 Proteinexpression von TIS11b und TIS11d in murinen T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert. Proteine wurden zu mehreren Zeitpunkten extrahiert (Abbildung 3). Die TIS11b- und TIS11d-Expression wurde mittels *Western blot* untersucht.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

### 3.1.5 TZR-Stimulation führt zur Hochregulierung von HuR und AUF1 in murinen T-Zellen auf mRNA-Ebene

Aufgrund des Primer-Designs wurde nur die Expression der AUF1-Isoformen p45 und p40 gemessen, die Isoformen p42 und p37 wurden nicht erfasst. Zu allen untersuchten Zeitpunkten konnten das mRNA stabilisierende Protein HuR und das sowohl stabilisierende als auch destabilisierende Protein AUF1 in murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Die Expression von HuR und AUF1 zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde relativ zu ihrer Expression an Tag 1 berechnet und angegeben. Die erstmalige TZR-Stimulation führte nach 24 Stunden zu einem Anstieg der HuR mRNA Kopien auf 349 % und einem Anstieg der AUF1 mRNA Kopien auf 504 % des Ausgangswertes an Tag 1. Nach weiteren 24 Stunden fiel die Expression von HuR auf das Ausgangslevel ab (Abbildung 8 A). Die Expression von AUF1 fiel auf 175 % des Ausgangslevels (Abbildung 8 B). Während der anschließenden Stimulierung mit IL-15 stieg die Expression beider Proteine sukzessive an. Nach erneuter TZR-Stimulation stieg die Expression von HuR innerhalb von 24 Stunden auf 432 % (anti-CD3) bzw. 425 % (anti-CD3-anti-CD28) des Ausgangswertes. Die Expression von AUF1 stieg auf 434 % (anti-CD3) bzw. 378 % (anti-CD3-anti-CD28). Die Expression beider Proteine sank in der PBS Gruppe auf das Ausgangslevel ab. Nach drei Stunden waren diese Trends bereits erkennbar, der Effekt war aber noch gering. Die zusätzliche Aktivierung des kostimulatorischen Rezeptors CD28 hatte keinen Effekt auf die Expression von AUF1 oder HuR (Abbildung 8 A, B).

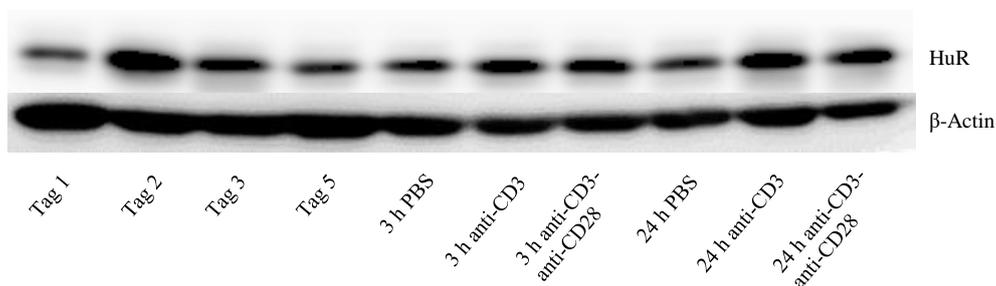


**Abbildung 8 HuR- und AUF1-Expression in murinen T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert (Abbildung 3). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression von HuR (A) und AUF1 (B) mit *Real-time-PCR* bestimmt. RPL13A diente als Referenzgen. Alle Werte sind relativ zum Mittelwert von Tag 1. Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von neun unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) und \*\*\* ( $p < 0,001$ ), ns (nicht signifikant).

### 3.1.6 HuR wird durch TZR-Stimulation auf Proteinebene hochreguliert

HuR wurde zu allen untersuchten Zeitpunkten auf Proteinebene nachgewiesen. Nach erstmaliger TZR-Stimulation stieg die Expression von HuR stark an und sank nach Wegfallen des Stimulus wieder ab. Nach erneuter Stimulation wurde der gleiche Effekt nach 24 Stunden beobachtet. Nach drei Stunden Restimulation wurde noch keine deutliche Änderung der Expression festgestellt und die zusätzliche Aktivierung von CD28 hatte keinen Effekt auf die Expression von HuR (Abbildung 9).

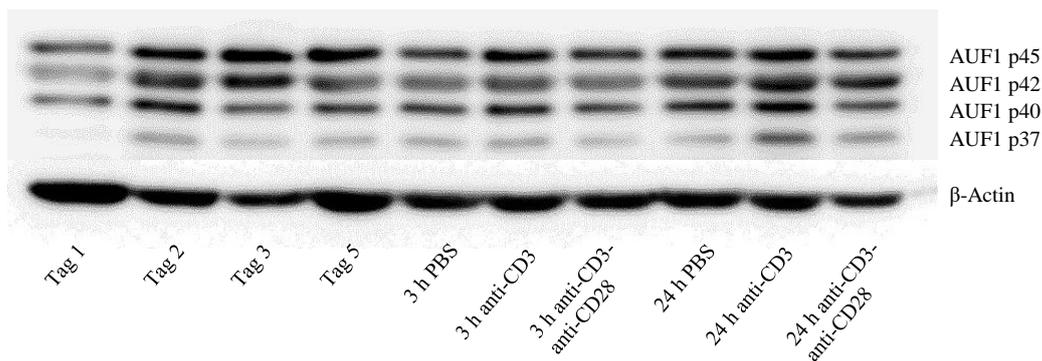


**Abbildung 9 Proteinexpression von HuR in murinen T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert. Proteine wurden zu mehreren Zeitpunkten extrahiert (Abbildung 3). Die HuR-Expression wurde mittels *Western blot* untersucht.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

### 3.1.7 Alle AUF1-Isoformen werden nach erstmaliger TZR-Stimulation in murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen auf Proteinebene hochreguliert

Die vier Isoformen von AUF1 konnten zu allen untersuchten Zeitpunkten nachgewiesen werden, wobei die kürzeste p37 Isoform deutlich schwächer als die restlichen Isoformen exprimiert wurde. Die auf mRNA-Ebene beobachtete Hochregulierung von AUF1 in der erstmaligen Aktivierung des TZR zeigte sich für alle Isoformen auch auf Proteinebene. In den folgenden Zeitpunkten blieb die Expression weiterhin erhöht (Abbildung 10).

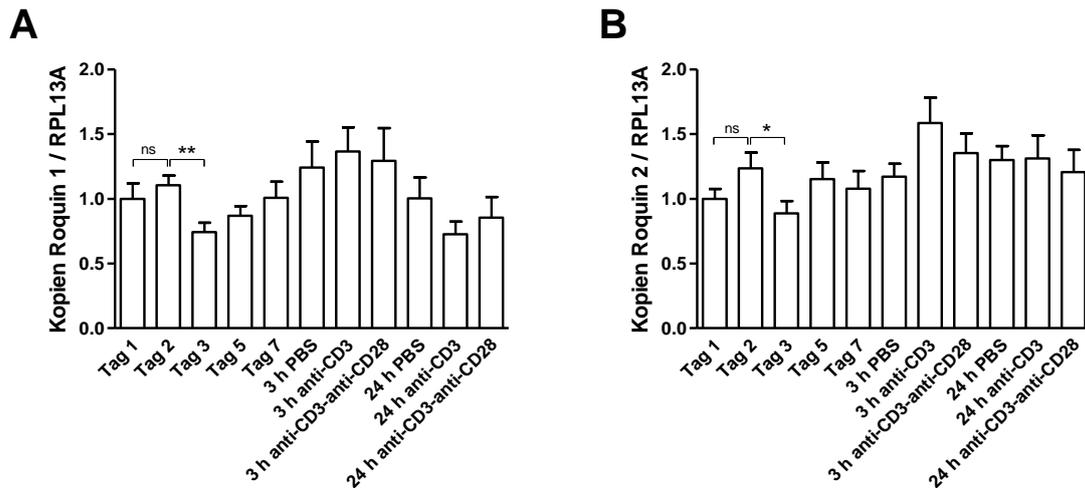


**Abbildung 10 Proteinexpression von AUF1 in murinen T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert. Proteine wurden zu mehreren Zeitpunkten extrahiert (Abbildung 3). Die AUF1-Expression wurde mittels *Western blot* untersucht.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für drei unabhängige Experimente.

### 3.1.8 Die Expression der Roquin-Proteine ändert sich auf mRNA-Ebene kaum

Roquin 1 und Roquin 2 wurden zu allen untersuchten Zeitpunkten in murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Die Expression von Roquin 1 und Roquin 2 zu den verschiedenen Zeitpunkten wurde relativ zu ihrer Expression an Tag 1 berechnet und angegeben. Insgesamt änderte sich die Expression der beiden Proteine in den untersuchten Zeitpunkten nicht wesentlich. Lediglich 48 Stunden nach erstmaliger TZR-Stimulierung sank die Expression beider Proteine im Vergleich zum Messwert 24 Stunden nach TZR-Stimulierung. Der Effekt war aber nur gering ausgeprägt (Abbildung 11 A, B).

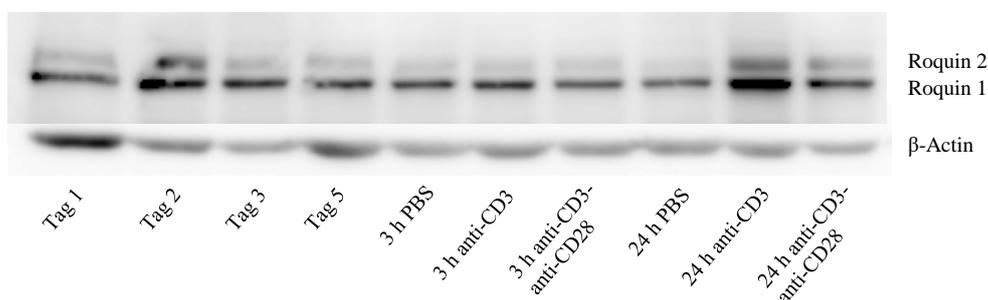


**Abbildung 11 Roquin 1- und Roquin 2-Expression in murinen T-Zellen**

CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert (Abbildung 3). Zu verschiedenen Zeitpunkten wurde die Expression von Roquin 1 (A) und Roquin 2 (B) mit *Real-time-PCR* bestimmt. RPL13A diente als Referenzgen. Alle Werte sind relativ zum Mittelwert von Tag 1. Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von neun unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), ns (nicht signifikant).

### 3.1.9 Roquin 1 und Roquin 2 werden durch TZR-Stimulation auf Proteinebene hochreguliert

Das Protein Roquin 1 wurde in unstimulierten murinen CD8<sup>+</sup> T-Zellen exprimiert. Die Expression stieg nach 24 Stunden TZR-Aktivierung an und fiel anschließend wieder auf das Ausgangslevel. In der Restimulation zeigte sich ein Anstieg der Roquin 1- und Roquin 2-Expression nach alleiniger Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern. Nach drei Stunden wurde noch keine Änderung der Expression beobachtet. Roquin 2 wurde zu allen Zeitpunkten deutlich schwächer exprimiert. Mit einem Anstieg der Expression jeweils nach 24 Stunden TZR-Stimulation schien die Regulation analog zu jener von Roquin 1 (Abbildung 12).



**Abbildung 12 Proteinexpression von Roquin 1 und Roquin 2 in murinen T-Zellen**

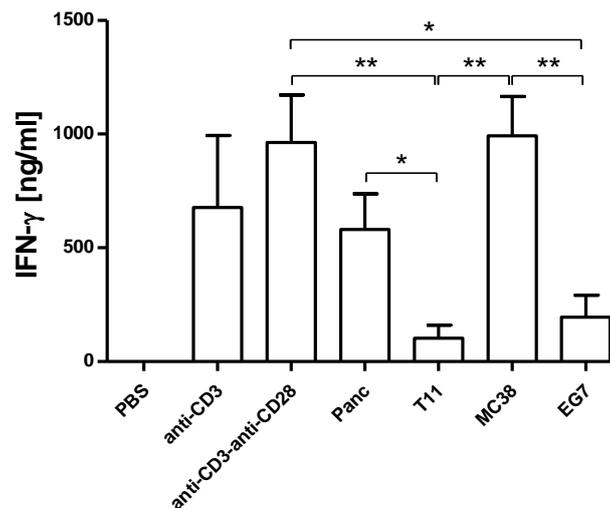
CD8<sup>+</sup> T-Zellen wurden aus Mäusen isoliert und über mehrere Tage mit Antikörpern und Interleukinen stimuliert. Proteine wurden zu mehreren Zeitpunkten extrahiert (Abbildung 3). Die Roquin 1- und Roquin 2-Expression wurde mittels *Western blot* untersucht. β-Actin diente als Ladekontrolle. Der gezeigte Blot ist repräsentativ für vier unabhängige Experimente.

### 3.2 Einfluss von Tumorzellen auf RBP

Als nächstes sollte untersucht werden, wie sich die Expression der RBP in einem physiologischeren Modell nach Kontakt mit Tumorzellen verhält. Dazu wurden murine T-Zellen mit Ovalbumin spezifischem TZR (OT1-T-Zellen) mit den Ovalbumin exprimierenden Tumorzelllinien Panc02-OVA und T11299-OVA (Pankreaskarzinom), MC38-GFP-iRFP-OVA (Kolonkarzinom) und EG7 (EG4-OVA, T-Zell-Lymphom) ko-kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Zellüberstände mittels ELISA auf IFN- $\gamma$  analysiert. Die Stärke der T-Zellaktivierung korreliert dabei mit der Ausschüttung von IFN- $\gamma$  durch die T-Zellen. Nach drei bzw. 24 Stunden wurden dieselben T-Zellen mittels MACS aufgereinigt und mittels *Real-time-PCR* auf die Expression der RBP TTP, TIS11b, TIS11d, HuR, AUF1, Roquin 1 und Roquin 2 untersucht. Als Positivkontrolle diente die Aktivierung der T-Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern, was eine optimale Aktivierung simuliert. Die Stimulation mit PBS diente als Negativkontrolle.

#### 3.2.1 Verschiedene Tumorzelllinien führen zu unterschiedlich starker T-Zellaktivierung

In den Negativkontrollen (PBS) wurde kein IFN- $\gamma$  detektiert. Die Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern führte im Mittel zu einer IFN- $\gamma$ -Ausschüttung von 677 ng/ml, die zusätzliche Stimulation mit anti-CD28 Antikörpern zu einer Ausschüttung von 963 ng/ml. Alle Tumorzellen führten zu einer Aktivierung der T-Zellen, die Höhe der IFN- $\gamma$ -Sekretion wies jedoch starke Unterschiede auf. So führte die Ko-Kultivierung der OT1-T-Zellen mit den MC38-GFP-iRFP-OVA Kolonkarzinomzellen (MC38) zu einer Ausschüttung von 993 ng/ml IFN- $\gamma$ , während die Ko-Kultivierung mit den T11299-OVA Pankreaskarzinomzellen (T11) zu einer Sekretion von 102 ng/ml und jene mit den EG4-OVA T-Zell-Lymphomzellen (EG7) zu einer Sekretion von 195 ng/ml IFN- $\gamma$  führte. Die Werte für die Ko-Kultivierung mit den Panc02-OVA Pankreaskarzinomzellen (Panc) lagen mit 581 ng/ml IFN- $\gamma$  dazwischen (Abbildung 13).

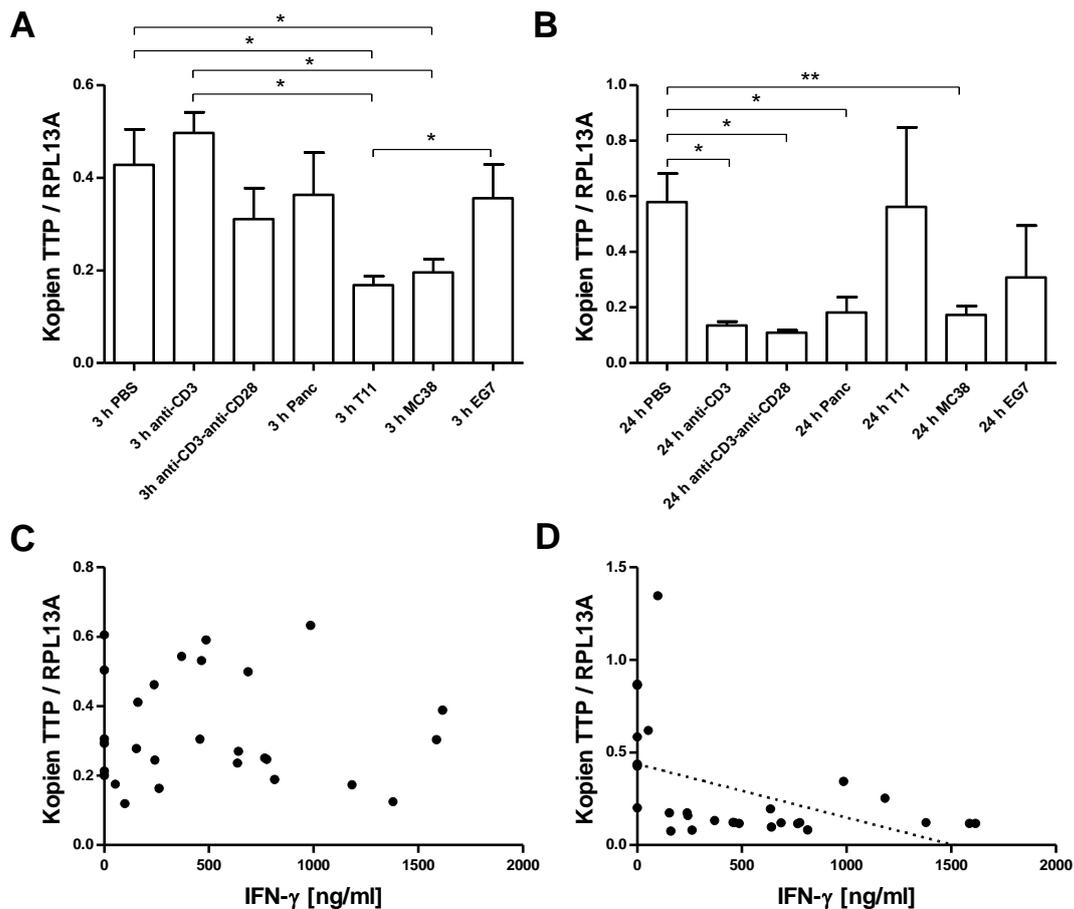


**Abbildung 13 T-Zellaktivierung durch Tumorzellen**

Murine CD8<sup>+</sup> OT1-T-Zellen wurden für 24 Stunden mit anti-CD3- oder mit anti-CD3- und anti-CD28 Antikörpern stimuliert oder mit den Ovalbumin exprimierenden Tumorzelllinien Panc02-OVA, T11299-OVA, MC38-GFP-iRFP-OVA oder EG7 ko-kultiviert. Die Überstände wurden abgenommen die IFN- $\gamma$  Konzentration mittels ELISA bestimmt. Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils zwei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

### 3.2.2 Die Verringerung der TTP-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung

Um die Vergleichbarkeit mit den bisherigen Ergebnissen zu gewährleisten, wurde die TTP-Expression in den verschiedenen Konditionen relativ zur TTP-Expression in unstimulierten T-Zellen an Tag 1 des Aktivierungsprotokolls angegeben (Abbildung 4). Die Aktivierung der T-Zellen führte nach drei Stunden zu einem Absinken der TTP-Expression im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe (43 %), wobei kein Zusammenhang zur Stärke der T-Zellaktivierung erkennbar war (Abbildung 14 C). Die niedrigste TTP-Expression wurde in der T11- (17 %) und MC38 Kondition (20 %) gemessen. In den anderen Konditionen wurde keine Expressionsänderung beobachtet (Abbildung 14 A). Nach 24 Stunden stieg die TTP-Expression in der PBS Kontrollgruppe auf 58 %. Die TTP-Expression in den T-Zellen, die mit anti-CD3 Antikörpern (14 %), anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern (11 %) und Panc (18 %) stimuliert wurden, sank deutlich ab. Die Expression in der MC38 Gruppe blieb erniedrigt (17 %). Die Expression in der EG7 Kondition änderte sich nicht, während sie in der T11 Kondition (56 %) anstieg (Abbildung 14 B). Korreliert man die TTP-Expression der T-Zellen nach 24 Stunden mit der Höhe der IFN- $\gamma$ -Ausschüttung derselben T-Zellen, fällt ein negativer Zusammenhang zwischen der IFN- $\gamma$ -Sekretion und der TTP-Expression nach 24 Stunden auf (Abbildung 14 D; Pearson  $r = -0,4641$ ;  $p = 0,01$ ). Nach drei Stunden bestand kein Zusammenhang.



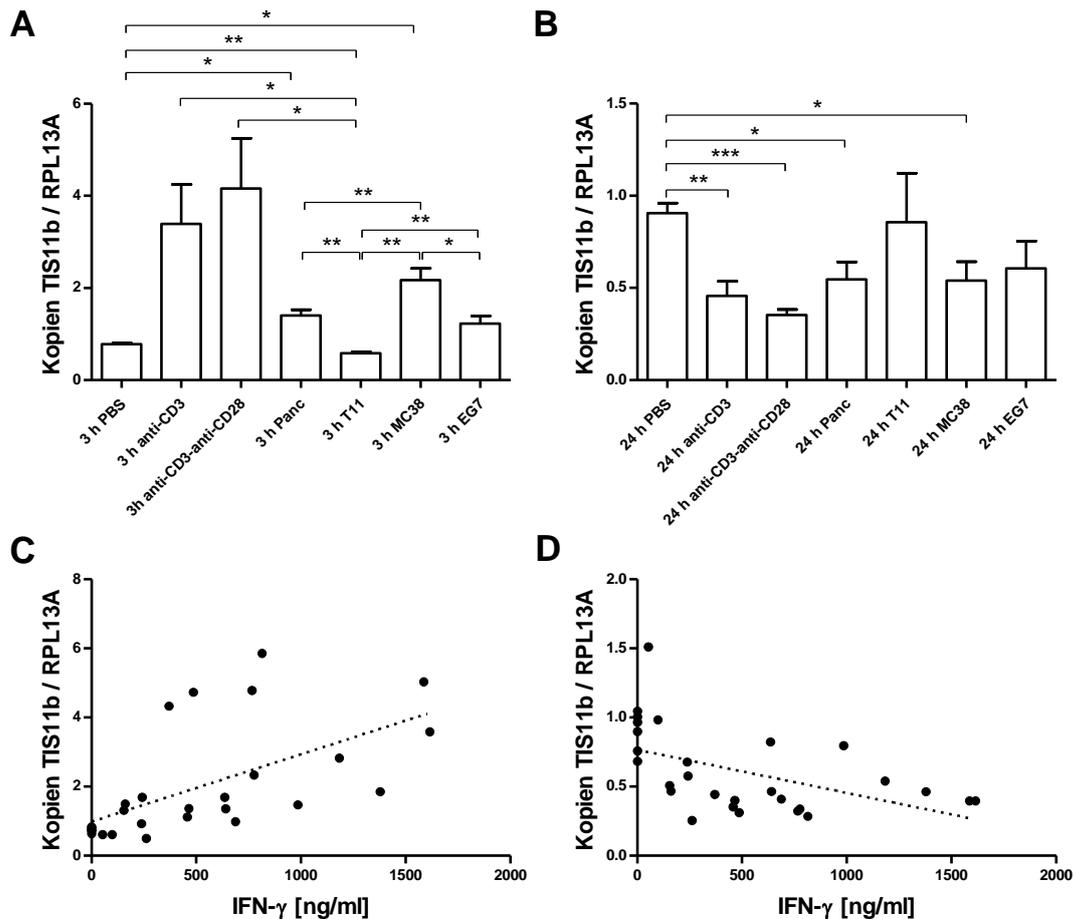
**Abbildung 14** TTP-Expression nach T-Zellaktivierung durch Tumorzellen

Murine CD8<sup>+</sup> OT1-T-Zellen wurden für drei (A, C) bzw. 24 Stunden (B, D) mit anti-CD3-, anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern oder mit den Tumorzelllinien Panc02, T11, MC38 oder EG7 inkubiert. Die T-Zellen wurden aufgereinigt und mittels *Real-time-PCR* auf TTP-Expression untersucht. RPL13A diente als Referenzgen. Die angegebene TTP-Expression ist relativ zum Mittelwert naiver unstimulierter T-Zellen (Abbildung 4 Tag 1). Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) (A,B). Korreliert wurden 28 Mittelwerte von jeweils drei technischen Replikaten der TTP-Expression mit den zugehörigen 28 Mittelwerten von jeweils zwei technischen Replikaten der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Pearson (C, D).

### 3.2.3 Das Ausmaß der kurzfristigen Hoch- und folgenden Herunterregulierung der TIS11b-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung

Die TIS11b-Expression in den verschiedenen Konditionen wurde relativ zur TIS11b-Expression in unstimulierten T-Zellen an Tag 1 angegeben (Abbildung 6 A). Die TIS11b-Expression stieg nach dreistündiger Aktivierung der T-Zellen. Die höchste TIS11b-Expression wiesen die mit Antikörpern stimulierten T-Zellen auf (anti-CD3 339 %; anti-CD3-anti-CD28 416 %), gefolgt von der MC38 Kondition (217 %). Die Panc (141 %) und EG7 Konditionen (123 %) zeigten mäßig erhöhte TIS11b-Expressionen, während die T11 Kondition (59 %) eine geringere Expression im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe (78 %) aufwies (Abbildung 15 A). Die TIS11b-Expression nach drei Stunden korrelierte linear positiv mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion

derselben T-Zellen (Abbildung 15 C; Pearson  $r = 0,6019$ ;  $p = 0,0007$ ). Nach 24 Stunden war die TIS11b-Expression am niedrigsten in den Gruppen anti-CD3-anti-CD28 (35 %) und anti-CD3 (46 %), gefolgt von MC38 (54 %) und Panc (55 %). Die TIS11b-Expression in der T11 Gruppe (86 %) befand sich in Höhe der PBS Kontrollgruppe (91 %), die Expression in der EG7 Gruppe (61 %) lag im mittleren Bereich (Abbildung 15 B). IFN- $\gamma$ -Sekretion und TIS11b-Expression nach 24 Stunden zeigten eine lineare negative Korrelation (Abbildung 15 D; Pearson  $r = -0,5102$ ;  $p = 0,006$ ).



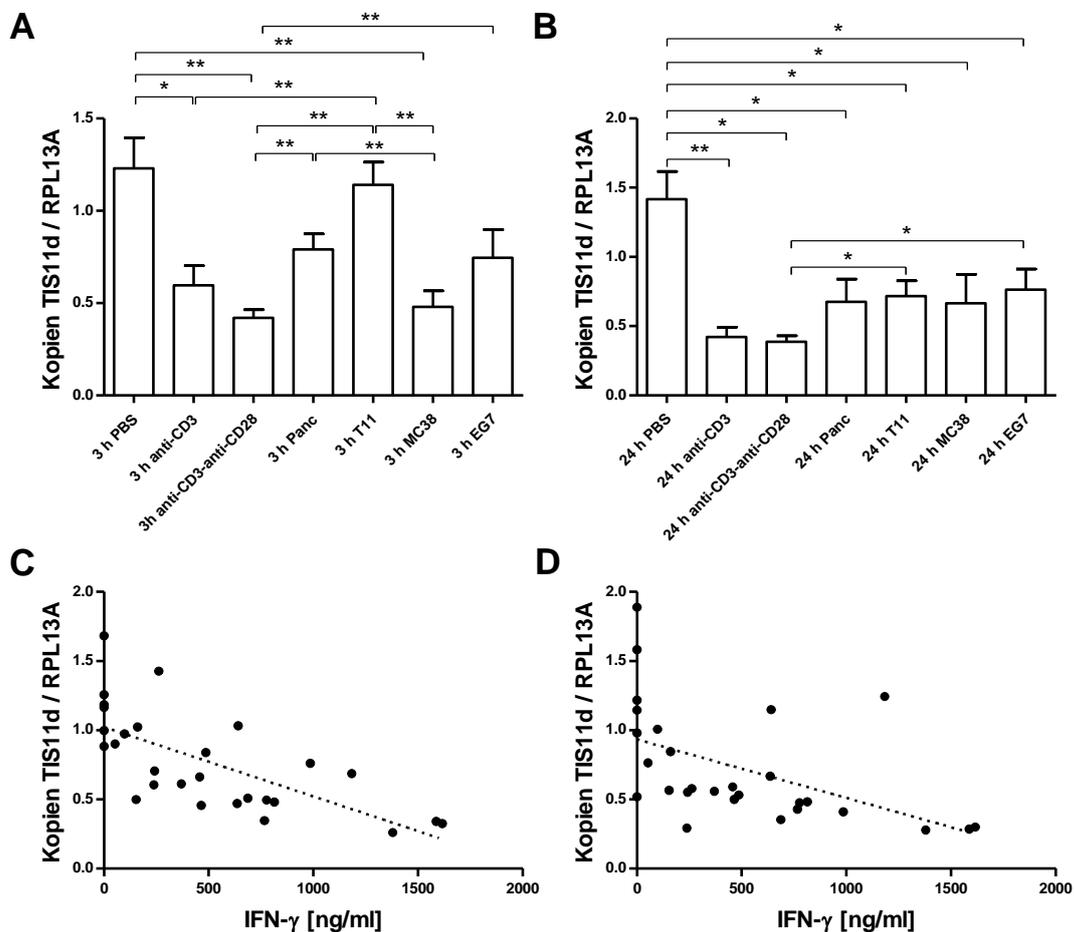
**Abbildung 15 TIS11b-Expression nach T-Zellaktivierung durch Tumorzellen**

Murine CD8<sup>+</sup> OT1-T-Zellen wurden für drei (A, C) bzw. 24 Stunden (B, D) mit anti-CD3-, anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern oder mit den Tumorzelllinien Panc02, T11, MC38 oder EG7 inkubiert. Die T-Zellen wurden aufgereinigt und mittels *Real-time-PCR* auf TIS11b-Expression untersucht. RPL13A diente als Referenzgen. Die angegebene TIS11b-Expression ist relativ zum Mittelwert naiver unstimulierter T-Zellen (Abbildung 6 A Tag 1). Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) (A,B). Korreliert wurden 28 Mittelwerte von jeweils drei technischen Replikaten der TIS11b-Expression mit den zugehörigen 28 Mittelwerten von jeweils zwei technischen Replikaten der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Pearson (C, D).

### 3.2.4 Die Verringerung der TIS11d-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung

Um die Vergleichbarkeit mit den bisherigen Ergebnissen zu gewährleisten, wurde die TIS11d-Expression in den verschiedenen Konditionen relativ zur TIS11d-Expression in unstimulierten

T-Zellen an Tag 1 angegeben (Abbildung 6 B). Nach drei Stunden sank die TIS11d-Expression im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe (123 %) in den T-Zellen, die durch anti-CD3-anti-CD28 (42 %) und anti-CD3 Antikörper (60 %) und MC38 Tumorzellen (48 %) stimuliert wurden. Die Expression in der T11 Gruppe änderte sich nicht (114 %), während sie in der Panc (79 %) und EG7 Gruppe (74 %) mäßig absank (Abbildung 16 A). Der Vergleich der TIS11d-Expression mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen zeigte eine negative lineare Korrelation (Abbildung 16, C; Pearson  $r = -0,6873$ ;  $p < 0,0001$ ). Nach 24 Stunden war die TIS11d-Expression in allen stimulierten T-Zellkonditionen deutlich erniedrigt, mit Werten zwischen 39 % (anti-CD3-anti-CD28) und 76 % (EG7) im Vergleich zu 142 % in der PBS Kontrollgruppe (Abbildung 16 B). Der Vergleich der TIS11d-Expression nach 24 Stunden mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen zeigte eine negative lineare Korrelation (Abbildung 16 D; Pearson  $r = -0,5051$ ;  $p = 0,006$ ).

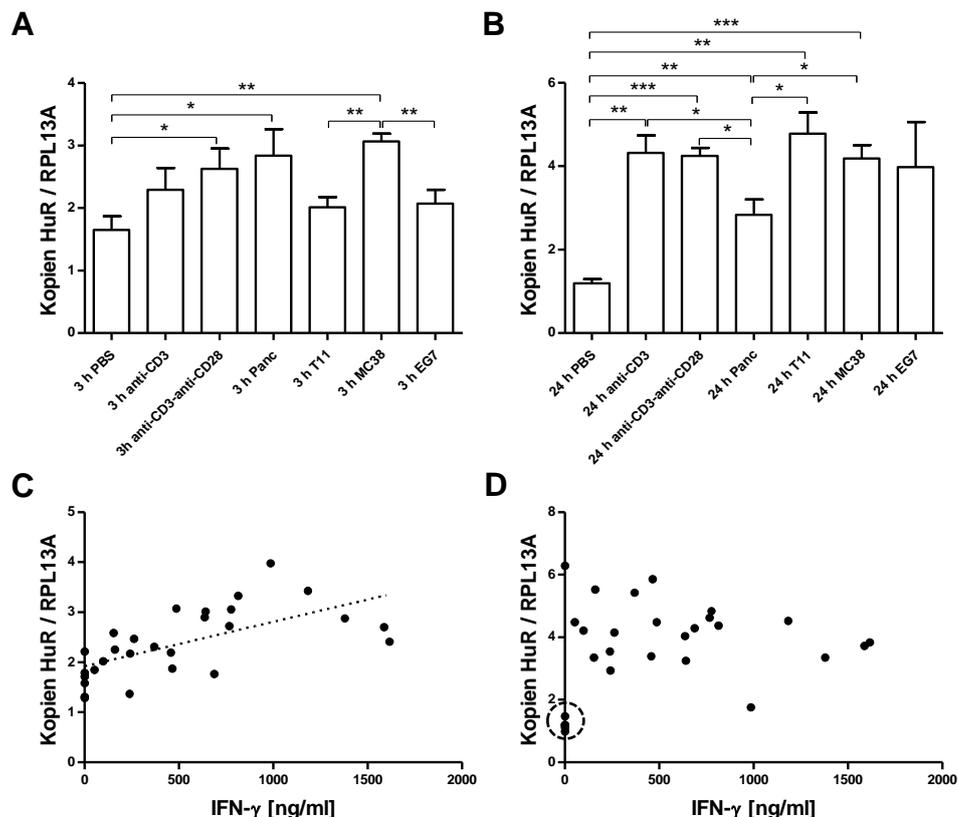


**Abbildung 16 TIS11d-Expression nach T-Zellaktivierung durch Tumorzellen**

Murine CD8<sup>+</sup> OT1-T-Zellen wurden für drei (A, C) bzw. 24 Stunden (B, D) mit anti-CD3-, anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern oder mit den Tumorzelllinien Panc02, T11, MC38 oder EG7 inkubiert. Die T-Zellen wurden aufgereinigt und mittels *Real-time-PCR* auf TIS11d-Expression untersucht. RPL13A diente als Referenzgen. Die angegebene TIS11d-Expression ist relativ zum Mittelwert naiver unstimulierter T-Zellen (Abbildung 6 B Tag 1). Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) (A,B). Korreliert wurden 28 Mittelwerte von jeweils drei technischen Replikaten der TIS11d-Expression mit den zugehörigen 28 Mittelwerten von jeweils zwei technischen Replikaten der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Pearson (C, D).

### 3.2.5 Der Anstieg der HuR-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung

Die HuR-Expression in den verschiedenen Konditionen wurde relativ zur HuR-Expression in unstimulierten T-Zellen an Tag 1 angegeben (Abbildung 8 A). Nach drei Stunden war die HuR-Expression am höchsten in den MC38 (306 %), Panc (284 %) und anti-CD3-anti-CD28 Konditionen (263 %). Die niedrigste HuR-Expression wies die PBS Kondition auf (165 %). Dazwischen lagen anti-CD3 (229 %), T11 (201 %) und EG7 (207 %; Abbildung 17 A). Nach 24 Stunden stieg die HuR-Expression in der anti-CD3, anti-CD3-anti-CD28, T11, MC38 und EG7 Gruppe auf Werte zwischen 398 % (EG7) und 478 % (T11) an. Die HuR-Expression der PBS Gruppe sank auf 119 %, während die Expression der Panc Kondition mit 283 % konstant blieb (Abbildung 17 B). Nach drei Stunden zeigte sich ein positiver linearer Zusammenhang zwischen der HuR-Expression und der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen (Abbildung 17 A; Pearson  $r = 0,639$ ;  $p = 0,0003$ ). Nach 24 Stunden war die HuR-Expression in den meisten Messungen unabhängig von der IFN- $\gamma$ -Sekretion bei etwa 400 %. Dabei stechen die in PBS inkubierten T-Zellen hervor, die als einzige kein IFN- $\gamma$  sezernierten und gleichzeitig die niedrigste HuR-Expression aufwiesen (Abbildung 17 D, eingekreist).

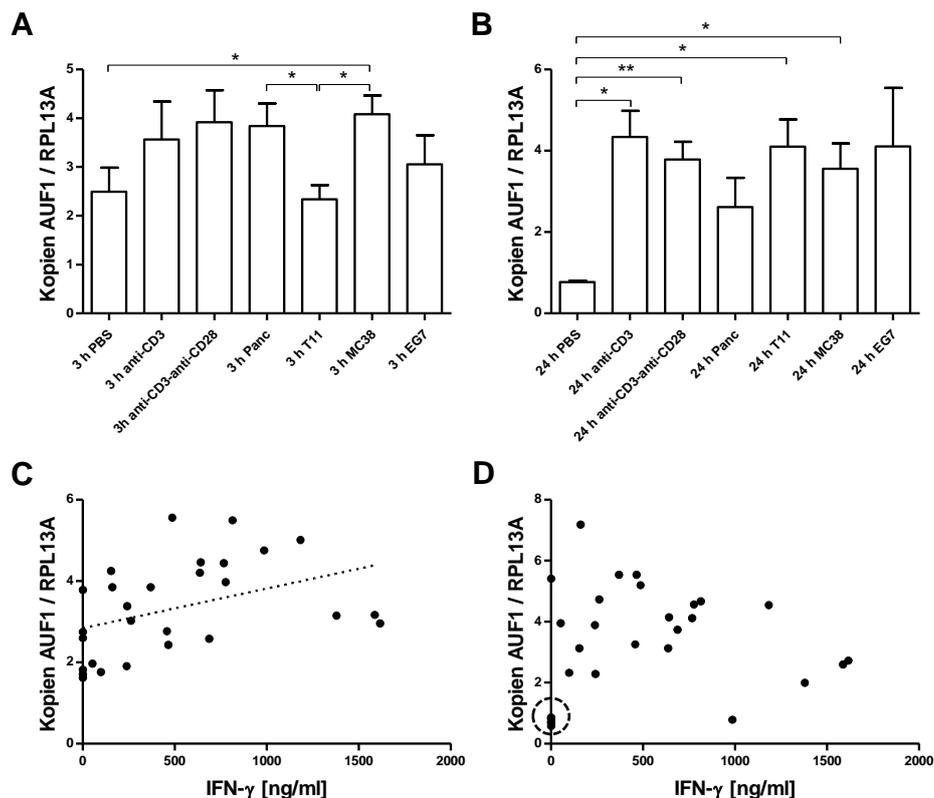


**Abbildung 17** HuR-Expression nach T-Zellaktivierung durch Tumorzellen

Murine CD8<sup>+</sup> OT1-T-Zellen wurden für drei (A, C) bzw. 24 Stunden (B, D) mit anti-CD3-, anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern oder mit den Tumorzelllinien Panc02, T11, MC38 oder EG7 inkubiert. Die T-Zellen wurden aufgereinigt und mittels *Real-time-PCR* auf HuR-Expression untersucht. RPL13A diente als Referenzen. Die angegebene HuR-Expression ist relativ zum Mittelwert naiver unstimulierter T-Zellen (Abbildung 8 A Tag 1). Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ), \*\*\* ( $p < 0,001$ ) (A,B). Korreliert wurden 28 Mittelwerte von jeweils drei technischen Replikaten der HuR-Expression mit den zugehörigen 28 Mittelwerten von je zwei technischen Replikaten der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Pearson (C, D).

### 3.2.6 Der Anstieg der AUF1-Expression korreliert mit der Stärke der T-Zellaktivierung

Aufgrund des Primer Designs wurde nur die Expression der AUF1-Isoformen p45 und p40 gemessen. Die AUF1-Expression in den verschiedenen Konditionen wurde relativ zur AUF1-Expression in unstimulierten T-Zellen an Tag 1 angegeben (Abbildung 8 B). Die AUF1-Expression war nach drei Stunden am höchsten in der MC38 (408 %), Panc (384 %) und anti-CD3-anti-CD28 Kondition (392 %). Die PBS (249 %) und T11 Gruppe (238 %) exprimierten AUF1 auf vergleichsweise niedrigem Level. Die anti-CD3 (357 %) und EG7 Gruppe (307 %) lagen dazwischen (Abbildung 18 A). Nach 24 Stunden stieg die AUF1-Expression in der anti-CD3, T11 und EG7 Kondition an und erreichte Werte zwischen 410 % (T11) und 434 % (anti-CD3). In der anti-CD3-anti-CD28 (378 %), Panc (261 %) und MC38 Kondition (356 %) sank die Expression wieder leicht ab. Die mit Abstand niedrigste AUF1-Expression wies die PBS Gruppe auf (77 %; Abbildung 18 B). Die AUF1-Expression nach drei Stunden korrelierte schwach positiv mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen (Abbildung 18 C; Pearson  $r = 0,4109$ ;  $p = 0,03$ ). Die in PBS Gruppe ohne IFN- $\gamma$ -Sekretion wies nach 24 Stunden die niedrigste AUF1-Expression auf (Abbildung 18 D, eingekreist).

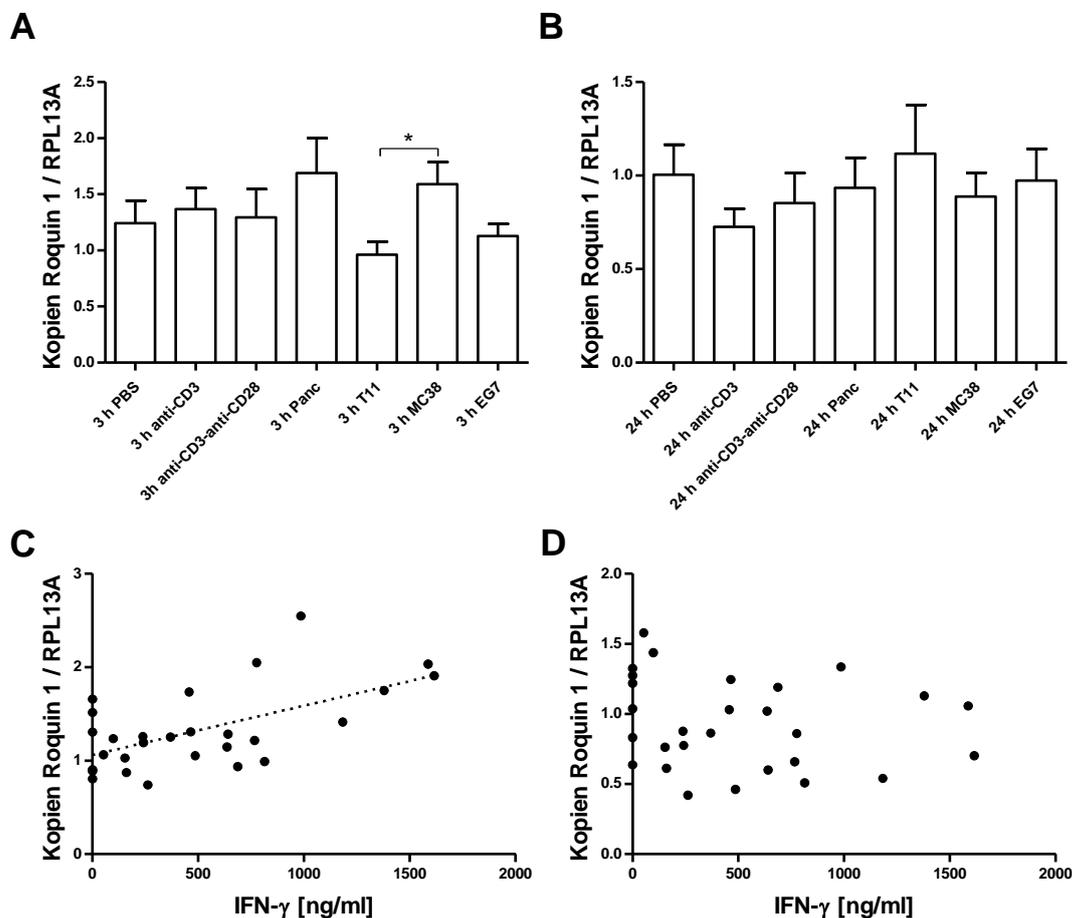


**Abbildung 18 AUF1-Expression nach T-Zellaktivierung durch Tumorzellen**

Murine CD8<sup>+</sup> OT1-T-Zellen wurden für drei (A, C) bzw. 24 Stunden (B, D) mit anti-CD3-, anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern oder mit den Tumorzelllinien Panc02, T11, MC38 oder EG7 inkubiert. Die T-Zellen wurden aufgereinigt und mittels *Real-time-PCR* auf AUF1-Expression untersucht. RPL13A diente als Referenzgen. Die angegebene AUF1-Expression ist relativ zum Mittelwert naiver unstimulierter T-Zellen (Abbildung 8 B Tag 1). Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) (A,B). Korreliert wurden 28 Mittelwerte von jeweils drei technischen Replikaten der AUF1-Expression mit den zugehörigen 28 Mittelwerten von jeweils zwei technischen Replikaten der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Pearson (C, D).

### 3.2.7 Die Roquin 1-Expression wird durch Tumorzellen beeinflusst

Die Roquin 1-Expression in den verschiedenen Konditionen wurde relativ zur Roquin 1-Expression in unstimulierten T-Zellen an Tag 1 angegeben (Abbildung 11 A). Die Roquin 1-Expression änderte sich insgesamt nur wenig. Dennoch war die Roquin 1-Expression nach drei Stunden in der MC38 Kondition höher als in der T11 Kondition. Die übrigen Konditionen blieben unbeeinflusst (Abbildung 19 A). Im Vergleich der Roquin 1-Expression nach drei Stunden mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen zeigte sich eine positive lineare Korrelation (Abbildung 19 C; Pearson  $r = 0,5953$ ;  $p = 0,0008$ ). Die Korrelation bestand dabei ausschließlich für die durch Tumorzellen stimulierten T-Zellen. Nach 24 Stunden wurde keine Änderung der Expression beobachtet (Abbildung 19 B, D).

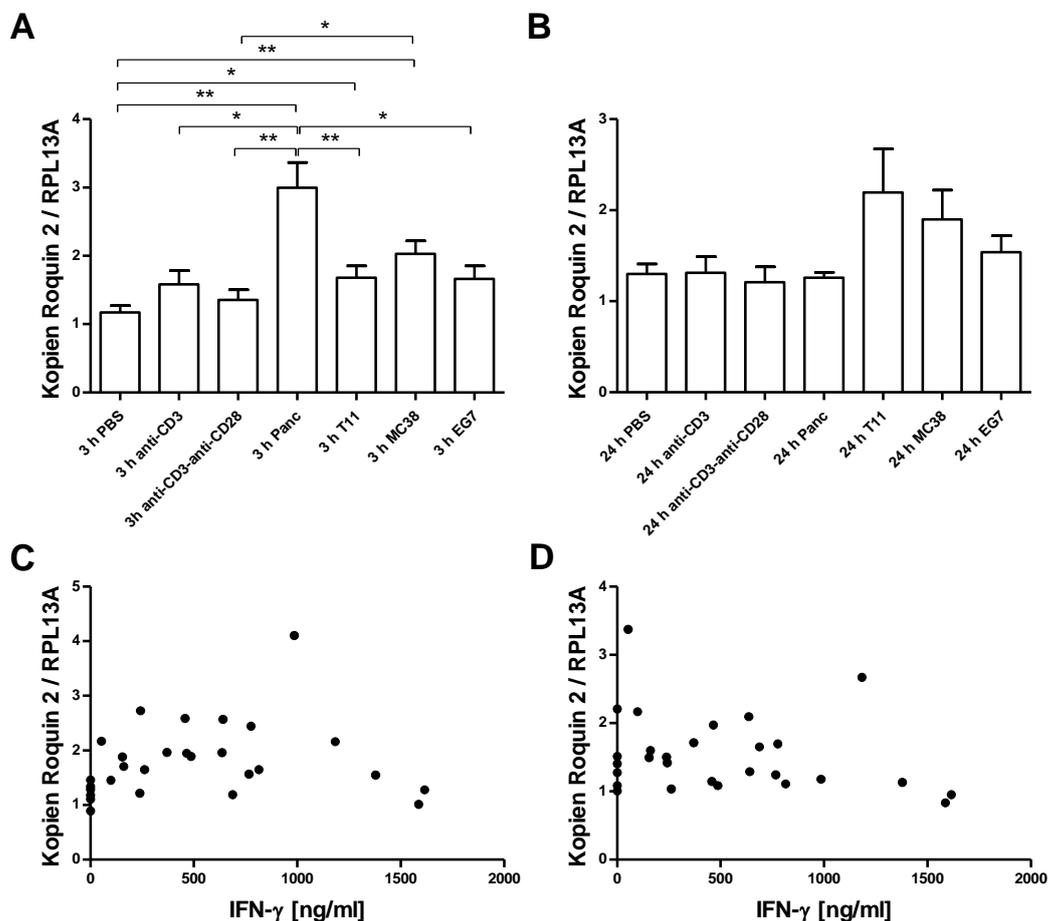


**Abbildung 19** Roquin 1-Expression nach T-Zellaktivierung durch Tumorzellen

Murine CD8<sup>+</sup> OT1-T-Zellen wurden für drei (A, C) bzw. 24 Stunden (B, D) mit anti-CD3-, anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern oder mit den Tumorzelllinien Panc02, T11, MC38 oder EG7 inkubiert. Die T-Zellen wurden aufgereinigt und mittels *Real-time-PCR* auf Roquin 1-Expression untersucht. RPL13A diente als Referenzen. Die angegebene Roquin 1-Expression ist relativ zum Mittelwert naiver unstimulierter T-Zellen (Abbildung 11 A Tag 1). Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ) (A,B). Korreliert wurden 28 Mittelwerte von jeweils drei technischen Replikaten der Roquin 1-Expression mit den zugehörigen 28 Mittelwerten von je zwei technischen Replikaten der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Pearson (C, D).

### 3.2.8 Die Roquin 2-Expression wird spezifisch durch Tumorzellen hochreguliert

Die Roquin 2-Expression wurde relativ zur Roquin 2-Expression in unstimulierten T-Zellen an Tag 1 angegeben (Abbildung 11 B). Die Roquin 2-Expression änderte sich in den Ko-Kulturen mit Tumorzellen zum Teil deutlich. Insbesondere die Ko-Kultur mit den Panc Tumorzellen führte nach drei Stunden zu einem starken Anstieg der Roquin 2-Expression auf 300 % des Ausgangswertes. Auch die T11 (168 %) und MC38 Konditionen (203 %) zeigten einen Anstieg der Roquin 2-Expression im Vergleich zur PBS Kontrollgruppe (117 %), während die EG7 Kondition keinen Unterschied aufwies (166 %;  $p = 0,06$ ). In den mit Antikörpern stimulierten T-Zellen zeigte sich nach drei Stunden keine Expressionsänderung (Abbildung 20 A). Nach 24 Stunden ergaben sich keine Expressionsunterschiede (Abbildung 20 B). Die Roquin 2-Expression hing nicht von der Stärke der T-Zellaktivierung ab (Abbildung 20 C, D).



**Abbildung 20** Roquin 2-Expression nach T-Zellaktivierung durch Tumorzellen

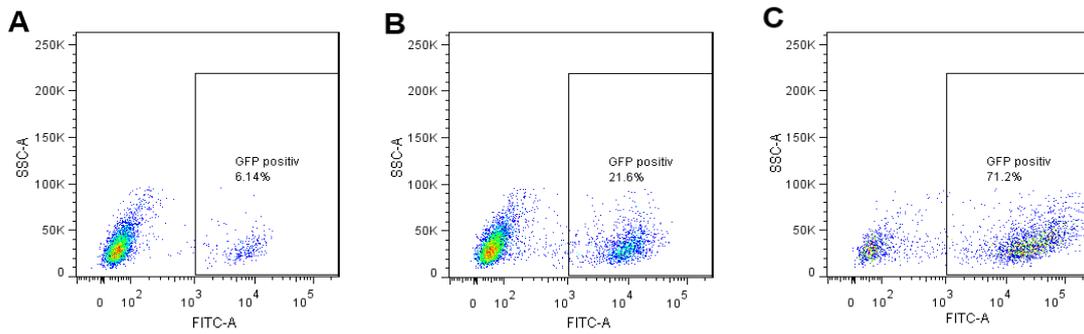
Murine CD8<sup>+</sup> OT1-T-Zellen wurden für drei (A, C) bzw. 24 Stunden (B, D) mit anti-CD3-, anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern oder mit den Tumorzelllinien Panc02, T11, MC38 oder EG7 inkubiert. Die T-Zellen wurden aufgereinigt und mittels *Real-time-PCR* auf Roquin 2-Expression untersucht. RPL13A diente als Referenzgen. Die angegebene Roquin 2-Expression ist relativ zum Mittelwert naiver unstimulierter T-Zellen (Abbildung 11 B Tag 1). Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von vier unabhängigen Experimenten mit jeweils drei technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ) (A,B). Korreliert wurden 28 Mittelwerte von jeweils drei technischen Replikaten der Roquin 2-Expression mit den zugehörigen 28 Mittelwerten von jeweils zwei technischen Replikaten der IFN- $\gamma$ -Sekretion derselben T-Zellen. Die Korrelationsanalyse erfolgte nach Pearson (C, D).

### 3.3 Überexpression von RBP in murinen T-Zellen

#### 3.3.1 HuR, TTP und TIS11b wurden durch Transduktion in B3Z überexprimiert

Überexpression oder *knock-out* von RBP sind eine Möglichkeit T-Zellfunktionen zu beeinflussen. Die TTP-Proteinfamilie reguliert die mRNA Halbwertszeit der T-Zell-assoziierten Zytokine TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  und IL-2 und Mäuse mit TTP-, TIS11b- oder TIS11d-*knock-out* zeigten starke Funktionsänderungen der Immunsystems (Ciais, Cherradi, & Feige, 2013). Mäuse mit systemischem AUF1-*knock-out* zeigten eine verstärkte Proliferation von T-Zellen und erhöhte Spiegel von T-Zell-assoziierten Zytokinen (Sadri & Schneider, 2009). Die Inhibition von HuR führte zu einem Ausbleiben der Zytokinsekretion nach T-Zellaktivierung (Meisner et al., 2007) und eine Roquin Funktionsverlustmutation führte zu Autoimmunität mit verstärkter T-Zellaktivierung (Vinuesa et al., 2005). Zur Klärung der genauen Funktion dieser RBP in zytotoxischen T-Zellen sind sowohl Überexpressions- als auch *knock-out*-Versuche sinnvoll. Die retrovirale Transduktion ist eine Methode, die die stabile Überexpression von Genen ermöglicht. Aufgrund der Expertise unserer Arbeitsgruppe, wurde diese Methode zunächst genutzt, um die Auswirkung der Überexpression der genannten RBP auf zytotoxische T-Zellen zu untersuchen.

Zunächst wurde mRNA von TTP, TIS11b, HuR, AUF1, Roquin 1 und Roquin 2 aus Splenozyten isoliert, in cDNA umgeschrieben und mittels Restriktion und Ligation in einen retroviralen Vektor integriert. Um eine einfache Detektion zu ermöglichen, wurde die cDNA der RBP über eine 2A *self-cleaving peptide* Sequenz mit der cDNA von GFP markiert (Abbildung 21 A, B, C). Die mRNA von TIS11d ließ sich nicht isolieren. Anschließend wurde die zytotoxische T-Zell Hybridomlinie B3Z mit den Vektoren transduziert. B3Z sind immortalisierte murine CD8<sup>+</sup> T-Zellen, die durch ihren Ovalbumin spezifischen TZR in der Lage sind, Ovalbumin exprimierende Tumorzellen zu erkennen. Sie können somit als Modell verwendet werden, um die Funktion von RBP in der Erkennung von Tumorzellen und Aktivierung der T-Zellen über einen längeren Zeitraum zu untersuchen. Die RBP Roquin 1, Roquin 2 und AUF1 ließen sich nicht überexprimieren. TTP, TIS11b und HuR wurden erfolgreich überexprimiert (Abbildung 21). Die Markierung mit GFP ermöglichte die Generierung von TTP-, TIS11b-, und HuR-überexprimierenden Einzelzellklonen mittels FACS. Die TTP-, TIS11b-, und HuR-Überexpression wurde anschließend direkt mittels *Western blot* nachgewiesen. Pro Konstrukt wurden fünf Klone mit hoher TTP-, TIS11b-, oder HuR-Expression ausgewählt, um Zelllinien für weitere Versuche zu generieren.

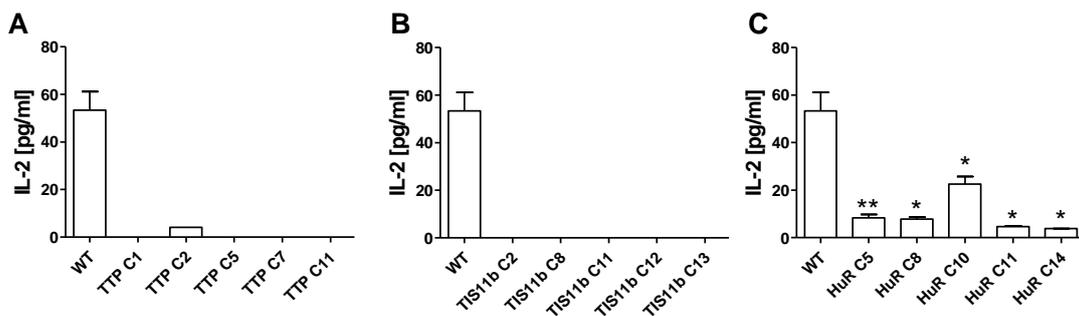


**Abbildung 21 TTP-, TIS11b- und HuR-Überexpression in B3Z**

B3Z Zellen wurden mit TTP-2A-GFP (A), TIS11b-2A-GFP (B) oder HuR-2A-GFP (C) transduziert. Je  $10^5$  B3Z wurden mittels FACS auf ihre GFP-Expression (FITC-A) untersucht. Intakte B3Z wurden mit FSC-A vs SSC-A *gating* ausgewählt. Zell-Dubletten wurden mittels FSC-A vs FSC-H *gating* exkludiert.

### 3.3.2 TTP-, TIS11b- und HuR-Überexpression führt zu verminderter T-Zellaktivierung durch Pankreaskarzinomzellen

Um einen möglichen Einfluss von RBP auf die Aktivierung von zytotoxischen T-Zellen durch Tumorzellen zu untersuchen, wurden die oben genannten B3Z Klone für 24 Stunden mit den Ovalbumin exprimierenden Pankreaskarzinomzellen Panc02-OVA und T110299-OVA, den T-Zell-Lymphomzellen EG7 (EL4-OVA) und den Kolonkarzinomzellen MC38-GFP-iRFP-OVA ko-kultiviert. Die Aktivierung der T-Zellen wurde mittels IL-2 ELISA gemessen. Als Kontrollgruppe dienten Wildtyp B3Z Zellen. In den Ko-Kulturen mit Panc und EG7 wurde keine IL-2 Produktion nachgewiesen (Ergebnisse nicht gezeigt). In den Ko-Kulturen mit T11 sekretierten die Wildtyp B3Z im Mittel 53 pg/ml IL-2. Alle untersuchten HuR überexprimierenden B3Z Klone produzierten weniger IL-2 zwischen 4 pg/ml und 23 pg/ml (Abbildung 22 C). In einer der Ko-Kulturen mit TTP überexprimierenden B3Z wurden minimale Mengen von 4 pg/ml IL-2 gemessen, in den restlichen Ko-Kulturen mit TTP oder TIS11b überexprimierenden B3Z lag die IL-2 Menge unter der Nachweisgrenze von 3 pg/ml (Abbildung 22 A, B).

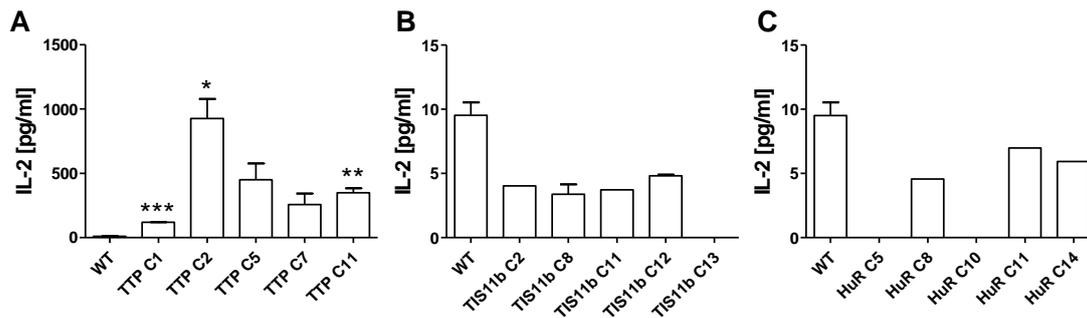


**Abbildung 22 Aktivierung RBP überexprimierender B3Z durch T11 Tumorzellen**

TTP (A), TIS11b (B) oder HuR (C) überexprimierende B3Z und Wildtyp B3Z wurden mit Ovalbumin exprimierenden T11 Tumorzellen ko-kultiviert. Nach 24 Stunden wurde die IL-2-Sekretion bestimmt. Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

### 3.3.3 TTP-Überexpression führt zu verstärkter T-Zellaktivierung durch Kolonkarzinomzellen

In den Ko-Kulturen mit MC38 Kolonkarzinomzellen produzierten die Wildtyp B3Z nur geringe Mengen von 10 pg/ml IL-2. Die Überexpression von HuR und TIS11b führte zu keiner relevanten Änderung der IL-2-Sekretion (Abbildung 23 B, C). Ein völlig konträres Ergebnis lieferten die TTP überexprimierenden B3Z Klone mit stark erhöhten IL-2 Mengen zwischen 118 pg/ml und 927 pg/ml (Abbildung 23 A).



**Abbildung 23 Aktivierung RBP überexprimierender B3Z durch MC38 Tumorzellen**

TTP (A), TIS11b (B) oder HuR (C) überexprimierende B3Z und Wildtyp B3Z wurden mit Ovalbumin exprimierenden T11 Tumorzellen ko-kultiviert. Nach 24 Stunden wurde die IL-2-Sekretion bestimmt. Gezeigt sind gepoolte Daten aus den Mittelwerten von drei unabhängigen Experimenten mit jeweils vier technischen Replikaten. Die Balken entsprechen dem arithmetischen Mittel + SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \* ( $p < 0,05$ ), \*\* ( $p < 0,01$ ).

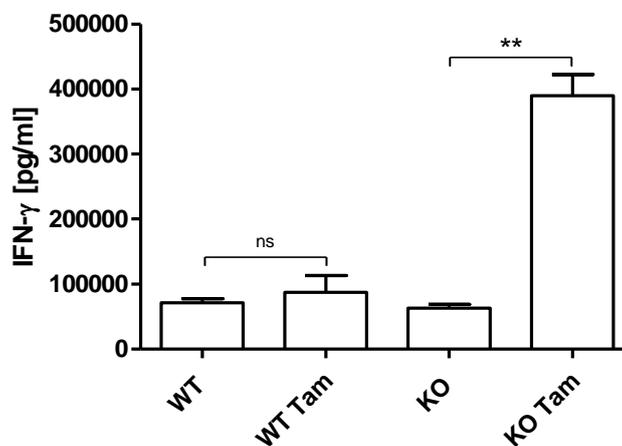
## 3.4 Roquin-knock-out in murinen T-Zellen

### 3.4.1 Roquin-knock-out erhöht die IFN- $\gamma$ -Sekretion von T-Zellen *in vitro*

Neben der Überexpression von RBP bietet der *knock-out* von RBP eine Möglichkeit zur Veränderung von T-Zellfunktionen. Die Bereitstellung von Roquin 1-Roquin 2-*double-knock-out* Mäusen durch Prof. Heissmeyer gab uns ein ideales Modell, um die Auswirkungen eines Roquin-*knock-outs* auf CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen. Bereits zuvor konnten Tavernier et al. zeigen, dass CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Roquin 1 Funktionsverlustmutation nach TZR-Stimulation verstärkt aktiviert werden und vermehrt Zytokine im Vergleich zu Wildtyp T-Zellen sekretieren (P. P. Chang et al., 2012; Tavernier et al., 2019). In dieser Arbeit sollte nun untersucht werden, wie sich der Roquin-*knock-out* auf die anti-tumorale Effektivität von CD8<sup>+</sup> T-Zellen auswirkt.

Hierfür wurden zunächst CD8<sup>+</sup> T-Zellen von Rc3h1fl/fl; Rc3h2fl/fl; CD4 Cre-ERT2 Mäusen isoliert und mit dem Ovalbumin spezifischen OT1-TZR transduziert. Anschließend wurde der *knock-out* von Roquin 1 und Roquin 2 durch die Zugabe von Tamoxifen induziert. Die T-Zellen wurden anschließend mit Ovalbumin exprimierenden T110299 Tumorzellen ko-kultiviert. Die Aktivierung der T-Zellen und das *killing* der Tumorzellen wurden lichtmikroskopisch kontrolliert und die Ko-Kulturen gestoppt, nachdem in der ersten Kondition fast alle

Tumorzellen gestorben waren. Die Stärke der T-Zellantwort wurde mittels IFN- $\gamma$  ELISA bestimmt. Als Kontrolle dienten die gleichen T-Zellen ohne Tamoxifen Behandlung mit normaler Roquin-Expression. Um unspezifische Effekte von Tamoxifen auf T-Zellen auszuschließen, wurden zusätzlich Wildtyp T-Zellen mit Tamoxifen behandelt und mit unbehandelten T-Zellen verglichen. Der *knock-out* von Roquin führte in allen Experimenten lichtmikroskopisch zu einem schnelleren *killing* der Tumorzellen und zu stark erhöhter IFN- $\gamma$ -Sekretion durch die T-Zellen (zweifach bis 40-fach) im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die Tamoxifen Behandlung hatte keinen Effekt auf Wildtyp T-Zellen (Abbildung 24). Um eine unspezifische Aktivierung der T-Zellen durch Roquin-*knock-out* auszuschließen, wurden die Tamoxifen behandelten T-Zellen für den gleichen Zeitraum ohne Tumorzellen kultiviert. Es wurden keine nennenswerten IFN- $\gamma$  Mengen gemessen (Daten nicht gezeigt).



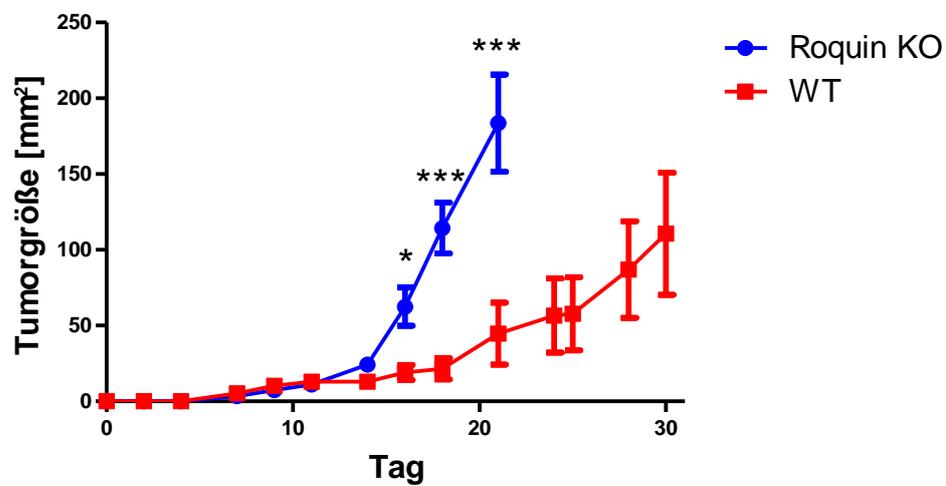
**Abbildung 24 Roquin-*knock-out* in vitro Ko-Kultur**

T-Zellen von Wildtyp (WT) und Rc3h1fl/fl; Rc3h2fl/fl; Cre-ERT2 (KO) Mäusen wurden isoliert und mit dem Ovalbumin spezifischen OT1-TZR transduziert. Anschließend wurde der *knock-out* von Roquin 1 und Roquin 2 in T-Zellen mittels Tamoxifen induziert (KO Tam). Die T-Zellen wurden dann mit Tumorzellen ko-kultiviert. Zur Kontrolle wurden Wildtyp T-Zellen mit Tamoxifen behandelt (WT Tam). Gezeigt sind Mittelwerte + SEM von vier semi-biologischen Replikaten. Der gezeigte ELISA ist repräsentativ für vier unabhängige Experimente. Die statistische Analyse erfolgte mittels Zweistichproben-t-Test für unabhängige Stichproben. \*\* ( $p < 0,01$ ), ns (nicht signifikant).

### 3.4.2 Roquin-*knock-out* in T-Zellen führt zu beschleunigtem Tumorwachstum *in vivo*

Als nächstes sollte untersucht werden, ob die *in vitro* beobachtete verstärkte Aktivierung von T-Zellen mit Roquin-*knock-out* nach Tumorzellkontakt einen Einfluss auf das Tumorwachstum *in vivo* hat. Hierzu wurde das Tumorwachstum von Wildtyp Mäusen und Roquin 1-Roquin 2 *double-knock-out* Mäusen verglichen. Alle Mäuse hatten nach sieben bis neun Tagen einen tastbaren Tumor unter der Haut an der Injektionsstelle. Alle Tumore bis auf einen waren durchgehend größenprogredient. Eine Wildtyp Maus erreichte eine Stagnation der Tumorgöße nach zwei Wochen. Der Roquin 1-Roquin 2-*double-knock-out* in T-Zellen führte nach zwei Wochen zu einem stark beschleunigten Tumorwachstum *in vivo*. Die erste *knock-out* Maus

wurde nach 21 Tagen nach Erreichen einer Tumorgröße von 225 mm<sup>2</sup> getötet, die erste Wildtyp Maus nach 30 Tagen (Abbildung 25).



**Abbildung 25 Tumorwachstum in Roquin-knock-out Mäusen**

2\*10<sup>6</sup> Panc02-OVA Tumorzellen wurden subkutan in die Flanken von Wildtyp (WT) und Rc3h1fl/fl; Rc3h2fl/fl; CD4-Cre (Roquin KO) Mäusen injiziert. Anschließend wurden alle ein bis drei Tage Länge und Breite des Tumors mittels Schiebelehre gemessen und die Tumorgröße mittels Flächenberechnung abgeschätzt. Die Kurven sind bis zum Tod der ersten Maus der jeweiligen Gruppe gezeigt. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM von jeweils fünf Mäusen aus einem Experiment. Die statistische Analyse erfolgte mittels zweifacher Varianzanalyse. \* (p < 0,05), \*\*\* (p < 0,001).

## 4 Diskussion

Der Einsatz gentechnisch modifizierter T-Zellen hat die Krebstherapie mit therapeutischem Ansprechen auch in fortgeschrittenen Tumorerkrankungen revolutioniert (Baruch, Berg, Besser, Schachter, & Markel, 2017). Damit noch mehr Patienten von T-Zelltherapien profitieren können, besteht Bedarf diese weiter zu verbessern. Eingreifen in posttranskriptionelle Regulation hat drastische Auswirkungen auf das Immunsystem (Kontoyiannis, Pasparakis, Pizarro, Cominelli, & Kollias, 1999). RBP gehören zu den wichtigsten Effektoren der posttranskriptionellen Regulation in Immunzellen (Ivanov & Anderson, 2013). In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die immunregulatorischen RBP TTP, TIS11b, TIS11d, HuR, AUF1, Roquin 1 und Roquin 2 genutzt werden können, um die anti-tumorale Effektivität von T-Zellen zu optimieren. Dazu wurde zunächst die Rolle der RBP in der T-Zellaktivierung durch Expressionsanalysen mittels *Real-time-PCR* und *Western blot* analysiert. Anschließend wurde ein möglicher Einfluss von Tumorzellen auf die Expression der RBP untersucht. Schließlich wurden Auswirkungen von Überexpression oder *knock-out* der RBP auf die anti-tumorale Aktivität der T-Zellen untersucht. Der Vergleich mit der Literatur soll helfen die Ergebnisse zu interpretieren.

### 4.1 TTP-Familie

#### 4.1.1 Die Expression der TTP-Familie wird durch TZR-Stimulierung stark beeinflusst

In der vorliegenden Arbeit wurde nach 24 Stunden TZR-Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern eine über Tage anhaltende Herunterregulierung von TTP und den verwandten Proteinen TIS11b und TIS11d auf mRNA Level in murinen T-Zellen gemessen. Passend zu unseren Ergebnissen ist im Gene Expression Atlas, einer umfassenden Genexpressions-Datenbank des European Bioinformatics Institute, eine Herunterregulierung der TTP-, TIS11b- und TIS11d-Expression auf mRNA-Ebene vier Tage nach T-Zellstimulation beschrieben (EMBL-EBI, 2019). Im Kontrast zur langfristigen Herunterregulierung beobachteten wir nach drei Stunden eine Hochregulierung der TIS11b-Expression auf mRNA-Ebene. Auch im Gene Expression Atlas ist ein Anstieg der TIS11b-Expression nach 30 min in T-Zellen beschrieben (EMBL-EBI, 2019). Raghavan et al. zeigten diesen kurzfristigen Expressionsanstieg innerhalb von 30 min nach T-Zellaktivierung auch für TTP. Nach 90 min war die TTP-Expression auf mRNA Level in dieser Publikation bereits wieder auf basalem Niveau. Dies erklärt, warum wir nach drei Stunden keinen Expressionsanstieg gemessen haben (Raghavan et al., 2001).

Auf Proteinebene zeigten unsere Daten eine starke Hochregulierung der Expression von TTP und TIS11b nach drei Stunden. Nach 24 Stunden war die Expression wieder abgesunken und im Verlauf nicht mehr nachweisbar. Kongruent zu unseren Ergebnissen ist in der Literatur eine Hochregulierung von TTP und TIS11b auf Proteinebene nach T-Zellaktivierung beschrieben. TTP und TIS11b waren, analog zu unseren Daten, in unstimulierten T-Zellen auf Proteinebene nicht nachweisbar, erreichten nach wenigen Stunden TZR-Stimulation die maximale Expression und waren nach wenigen Tagen nicht mehr nachweisbar (Raghavan et al., 2001; Moore et al., 2018). Für TIS11d konnten wir aufgrund eines insgesamt schwachen Signals keine Aussage zur Proteinexpression treffen. Interessanterweise konnten auch Moore et al. TIS11d auf Proteinebene nicht in ruhenden oder aktivierten T-Zellen nachweisen (Moore et al., 2018).

Berücksichtigt man die Rolle von TTP, TIS11b und TIS11d als negative Regulatoren von zahlreichen Zytokinen, ist es wahrscheinlich, dass sie auch in T-Zellen als negative Regulatoren deren Immunantwort hemmen (Lai & Blackshear, 2001; Lai et al., 2000). Moore et al. kommen in ihrer Publikation zum Schluss, dass die TTP-Proteinfamilie besonders in der frühen Phase der T-Zellaktivierung eine Rolle spielt (Moore et al., 2018). Die von uns gezeigte Korrelation von TIS11b und TIS11d drei Stunden nach T-Zellstimulation mit der Stärke der T-Zellaktivierung stützt diese These. Darüber hinaus konnten wir nach 24 Stunden eine negative Korrelation von TTP, TIS11d und TIS11b mit der IFN- $\gamma$ -Sekretion zeigen. Ob dieser Zusammenhang kausaler Natur ist, lässt sich mit den Daten dieser Arbeit nicht bestimmen. Da TTP in der Literatur als negativer Regulator von IFN- $\gamma$  beschrieben ist, ist dies jedoch denkbar (Ogilvie et al., 2009). Möglicherweise sind TTP Proteine somit auch an der Aufrechterhaltung der Immunantwort bei anhaltendem Stimulus beteiligt.

#### 4.1.2 Wirkung von Tumorzellen auf die Expression von TTP, TIS11b und TIS11d

In der Literatur ist die Herunterregulierung von TTP in Tumorzellen in verschiedenen humanen Krebserkrankungen beschrieben und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Park, Lee, & Kang, 2018). Durch die Erhöhung der PD-L1-Expression von Tumorzellen wurde auch ein immunsuppressiver Effekt der verringerten TTP-Expression in Tumorzellen beschrieben (Guo et al., 2018). Da die TTP-Proteinfamilie in Immunzellen selbst immunmodulatorische Effekte hat, wäre auch eine Beeinflussung der Expression der TTP Proteine in T-Zellen durch die Tumorzellen ein denkbarer immunsuppressiver Mechanismus (Schott & Stoecklin, 2010). In der vorliegenden Arbeit untersuchten wir erstmals den Einfluss von Tumorzellen auf die Expression der TTP-Proteinfamilie in T-Zellen. Die Ergebnisse entsprachen, mit Hochregulierung von TIS11b nach drei Stunden und Herunterregulierung von TTP, TIS11b und TIS11d 24 Stunden nach Tumorzellkontakt, jenen durch reine TZR-Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern. Somit fanden

wir keinen Hinweis auf eine direkte, vom TZR unabhängige, Beeinflussung der TTP, TIS11b oder TIS11d-Expression in T-Zellen durch Tumorzellen.

#### 4.1.3 Überexpression von TTP und TIS11b verändert T-Zellfunktionen

Die Manipulation der Expression der TTP-Proteinfamilie in T-Zellen ist eine Möglichkeit die Funktion von T-Zellen zu beeinflussen. Moore et al. beschrieben eine verstärkte anti-virale Effektivität von TTP-*knock-out* T-Zellen im Vergleich zu Wildtyp T-Zellen. Die Autoren schlugen vor diesen Effekt auch in der Tumorthherapie zu untersuchen (Moore et al., 2018). Wir untersuchten erstmals den Einfluss einer TTP- und TIS11b-Überexpression in der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Hybridlinie B3Z auf deren anti-tumorale Immunantwort (Karttunen, Sanderson, & Shastri, 1992). In der vorliegenden Arbeit führte die Überexpression von TTP und TIS11b zu keiner relevanten Änderung der IL-2-Sekretion nach Kontakt mit den Pankreaskarzinomzellen T11. Unerwarteterweise sekretierten TTP-überexprimierende T-Zellen jedoch zehnfach bis 100-fach erhöhte IL-2 Mengen nach Ko-Kultur mit den Kolonkarzinomzellen MC38. Das Ergebnis ist umso überraschender, da TTP in der Literatur als negativer Regulator von IL-2 beschrieben ist. So beschrieben Ogilvie et al. eine erhöhte IL-2-Sekretion durch primäre T-Zellen von TTP-*knock-out* Mäusen im Vergleich zu T-Zellen von Wildtyp Mäusen nach deren Aktivierung (Ogilvie et al., 2005). In der Literatur gibt es einige Fälle, in denen *knock-out* und Überexpression eines Proteins nicht zu den erwarteten entgegengesetzten Effekten führten. Eine mögliche Erklärung sind Störungen in der Komplexbildung durch die veränderte Stöchiometrie (Prelich, 2012). Da auch TTP Komplexe mit zahlreichen Proteinen bildet ist dies ein denkbare Phänomen (Casolaro et al., 2008). Zu berücksichtigen sind außerdem mögliche Artefakte durch das Verwenden von Einzelzellklonen: Durch die artifizielle Umgebung, Manipulationen und häufige Zellteilung entstehen genetische Mutationen in kultivierten Zellen. Dadurch können sich einzelne Zellen einer Zellkultur voneinander unterscheiden (Ng, Gisonni-Lex, & Azizi, 2017). Es ist damit theoretisch denkbar, dass die erhöhte IL-2-Sekretion der generierten B3Z Zelllinien auf der klonalen Expansion einer zufällig mutierten Zelle basiert. Da jedoch alle fünf aus verschiedenen Einzelzellen generierten B3Z Zelllinien mit TTP-Überexpression eine erhöhte IL-2-Sekretion im Vergleich zu Wildtyp B3Z aufwiesen, ist ein solcher klonaler Effekt nahezu ausgeschlossen. Schlussendlich ist der Schluss von B3Z auf primäre T-Zellen, wie bei allen Zelllinien, nur bedingt möglich, da sich diese naturgemäß unterscheiden (Karttunen et al., 1992). Die beobachteten Effekte müssen somit in primären T-Zellen verifiziert werden.

## 4.2 HuR und AUF1

### 4.2.1 Die Expression von HuR und AUF1 wird durch TZR-Stimulierung stark beeinflusst

In dieser Arbeit wurde 24 Stunden nach Stimulation mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern eine starke Hochregulation von HuR auf mRNA-Ebene in murinen T-Zellen gemessen. Dazu passend ist im Gene Expression Atlas ein Anstieg der HuR-Expression in murinen T-Zellen auf mRNA-Ebene vier Tage nach Stimulation mit anti-CD3-anti-CD28 beads beschrieben (EMBL-EBI, 2019). Auch auf Proteinebene zeigte sich in der vorliegenden Arbeit ein Anstieg der HuR-Expression 24 Stunden nach TZR-Stimulierung. Dazu passend beschrieben Atasoy et al. einen Expressionsanstieg von HuR ein und zwei Tage nach Stimulation von murinen Splenozyten mit anti-CD3 Antikörpern im *Western blot*. Raghavan et al. beschreiben einen HuR-Expressionsanstieg bereits ein, drei und sechs Stunden nach T-Zellstimulation mit Phorbolmyristat-acetat plus Ionomycin (Atasoy, Watson, Patel, & Keene, 1998; Raghavan et al., 2001). Darüber hinaus zeigten unsere Daten, dass die Expression von HuR drei Stunden nach T-Zellaktivierung positiv mit der IFN- $\gamma$  derselben T-Zellen korreliert. Wang et al. beschrieben eine Stabilisierung von IFN- $\gamma$  mRNA durch HuR in T-Zellen nach Ko-Aktivierung der T-Zellen mit LFA-1 (J. G. Wang et al., 2006). Unsere Daten lassen die Stabilisierung von IFN- $\gamma$  mRNA durch HuR auch nach TZR- und CD28 Aktivierung vermuten. Dies deckt sich auch mit einer Publikation, die eine generelle Stabilisierung von Zytokin mRNA durch HuR nach TZR-Stimulation postuliert (Atasoy et al., 1998). Zusätzlich ist HuR durch die Stabilisierung von mRNA an der Koordination von essenziellen Signalwegen der Zellvitalität und der Regulation des Signalweges der CD28-Familie in T-Zellen beteiligt (Blackinton & Keene, 2016; Techasintana, Davis, Gubin, Magee, & Atasoy, 2015).

Zur Funktion von AUF1 in T-Zellen ist weniger bekannt. Die erhöhte Proliferationsrate und verstärkte Sekretion von IL-2, TNF- $\alpha$  und IL1 $\beta$  von T-Zellen in AUF1-*knock-out* Mäusen liefern jedoch Hinweise auf eine mögliche Rolle von AUF1 in T-Zellen (Sadri & Schneider, 2009). In dieser Arbeit wurde ein Anstieg der AUF1-Expression nach T-Zellaktivierung auf mRNA- und Proteinebene beobachtet. Dazu passend ist in der Literatur ein Anstieg der AUF1-Expression auf mRNA-Ebene zehn Stunden nach T-Zellstimulation mit IL-2 beschrieben (EMBL-EBI, 2019). Damit ist eine T-Zell-intrinsische Funktion und eine Rolle in der T-Zellaktivierung von AUF1 wahrscheinlich. Besonders auffällig war in dieser Arbeit das nahezu identische Expressionsprofil von AUF1 und HuR. In der Literatur gibt es zahlreiche Versuche, die zeigen, dass HuR und AUF1 funktionell miteinander interagieren, zusammenarbeiten und konkurrieren (N. Chang et al., 2010; David et al., 2007; Lal et al., 2004). Eine gemeinsame Regulation bzw. Interaktion in T-Zellen liegt nahe und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

#### 4.2.2 Wirkung von Tumorzellen auf die Expression von HuR und AUF1

In der Literatur ist die Hochregulierung von HuR und AUF1 in verschiedenen humanen Karzinomen beschrieben und mit einer schlechten Prognose assoziiert (Kumar et al., 2015; Trojanowicz et al., 2009; H. Wang, Ding, Guo, Xia, & Ruan, 2016; J. Wang et al., 2013; Yang et al., 2014). Mäuse mit AUF1-Überexpression entwickeln spontan Tumore (Gouble et al., 2002). Aufgrund der großen Bedeutung von HuR und AUF1 für die Funktion von Immunzellen wäre eine Manipulation der Expression von HuR oder AUF1 in T-Zellen durch Tumorzellen ein denkbarer Mechanismus der Immunsuppression (Papadaki et al., 2009), (Sadri & Schneider, 2009), (Y. L. Chen et al., 2006). In dieser Arbeit wurde erstmals der Einfluss von Tumorzellen auf die Expression von HuR und AUF1 in T-Zellen untersucht. Mit einem Anstieg der HuR- und AUF1-Expression nach Tumorzellkontakt, waren die Ergebnisse jedoch identisch zur T-Zellstimulation mit anti-CD3 bzw. anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern.

#### 4.2.3 Überexpression von HuR verringert die IL-2-Sekretion von T-Zellen

Wir untersuchten erstmals den Einfluss einer HuR-Überexpression in der CD8<sup>+</sup> T-Zell-Hybridlinie B3Z auf deren anti-tumorale Immunantwort (Karttunen et al., 1992). Betrachtet man die prinzipiell mRNA stabilisierende Funktion von HuR, so würde man eine vermehrte Sekretion von Zytokinen nach T-Zellaktivierung erwarten (Fan & Steitz, 1998; Dean et al., 2001; Yarovsky et al., 2006; Casolaro et al., 2008; Sung et al., 2009). Unerwarteterweise führte die HuR Überexpression in B3Z zu verringerter IL-2-Sekretion nach Kontakt mit Pankreaskarzinomzellen. Passend dazu zeigten zwei Publikationen eine ebenfalls unerwartet erhöhte IL-2-Sekretion von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit konditionellem HuR-*knock-out* (Gubin et al., 2014; Techasintana et al., 2017). Damit scheint HuR ein negativer Regulator von IL-2 in T-Zellen zu sein. Aufgrund der stabilisierenden Funktion von HuR für die zentralen T-Zell-Effektormoleküle TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  ist ein positiver Effekt einer HuR-Überexpression auf die anti-tumorale Wirkung von CD8<sup>+</sup> T-Zellen dennoch denkbar (J. G. Wang et al., 2006). Zur definitiven Klärung sind weitere Experimente in primären T-Zellen notwendig.

### 4.3 Roquin-Proteine

#### 4.3.1 Roquin-Proteine werden durch TZR-Aktivierung auf Proteinebene hochreguliert

In der vorliegenden Arbeit wurde keine Expressionsänderung von Roquin 1 oder Roquin 2 im Verlauf des Aktivierungsprotokolls auf mRNA-Ebene in murinen T-Zellen gemessen. Konträr dazu listet der Gene Expression Atlas ein Experiment, das eine Herunterregulierung von Roquin 1 nach viertägiger Stimulation von humanen T-Zellen mit anti-CD3-anti-CD28 Beads auf

mRNA-Ebene zeigt (EMBL-EBI, 2019). Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist die unterschiedliche Dauer der T-Zellstimulation.

Im *Western blot* wurde Roquin 1 zu allen Zeitpunkten deutlich stärker exprimiert als Roquin 2. Dies steht im Einklang mit einer Publikation, die eine fünf Mal höhere Roquin 1-Expression im Vergleich zu Roquin 2 in T-Zellen beschreibt (Vogel et al., 2013). Unsere Daten zeigten zudem eine Zunahme der Roquin 1- und Roquin 2-Expression auf Proteinebene durch TZR-Stimulation, insbesondere durch alleinige Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern. Jeltsch et al. zeigten das Verschwinden der Roquin 1 Bande im *Western blot* nach Aktivierung der T-Zellen mit PMA für einige min bis drei Stunden und bei gleichzeitigem Auftreten eines schneller migrierenden Spaltprodukts. Dieses Spaltprodukt trat auch nach Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern auf. Die Roquin 1-Expression blieb nach Stimulation mit anti-CD3-anti-CD28 Antikörpern jedoch konstant und stieg nach Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern sogar an (Jeltsch et al., 2014). Dies spricht für eine Hochregulierung von Roquin 1 auf Proteinebene, die spezifisch für die Aktivierung des TZR-Signalwegs ist und nicht durch PMA induziert wird.

#### 4.3.2 Tumorzellen erhöhen die Roquin-Expression

Mäuse mit heterozygoter Roquin Mutation entwickeln T-Zell-Lymphome (Ellyard et al., 2012). Ein Verlust der Roquin Funktion in T-Zellen führt zu dysregulierten Immunantworten und Autoimmunität (Vinuesa et al., 2005). Eine Beeinflussung der Roquin-Expression in T-Zellen durch Tumorzellen wäre ein denkbarer immunregulatorischer Mechanismus. In dieser Arbeit wurde dieser mögliche Einfluss durch Ko-Kultur von Ovalbumin exprimierenden Tumorzellen und Ovalbumin spezifischen T-Zellen untersucht. Stark immunogene Tumorzellen führten zu einer höheren Roquin 1-Expression im Vergleich zu schwach immunogenen Tumorzellen. Roquin 2 zeigte eine Erhöhung der Zahl der mRNA Kopien drei Stunden nach Kontakt mit drei von vier untersuchten Tumorzelllinie. Da in den mit anti-CD3 und anti-CD28 Antikörpern stimulierten T-Zellen keine Expressionsänderung auf mRNA-Ebene festgestellt wurde, deutet dies auf eine vom TZR unabhängige Beeinflussung der Roquin-Expression durch Tumorzellen hin. ICOS-Expression ist für eine korrekte T-Zellfunktion essenziell (Dong et al., 2001). Da Roquin zum Abbau von ICOS und weiteren kostimulatorischen Molekülen führt, könnte es sich hierbei um eine immunsuppressive Strategie der Tumorzellen handeln (Vogel et al., 2013).

#### 4.3.4 Roquin-*knock-out* verändert T-Zellfunktionen und Tumorwachstum

Murine und humane CD8<sup>+</sup> T-Zellen mit Roquin 1 Funktionsverlustmutation führten nach Stimulation mit anti-CD3 Antikörpern bzw. Phorbolmyristat-acetat plus Ionomycin zu erhöhter IFN- $\gamma$ -Sekretion im Vergleich zu Wildtyp T-Zellen (P. P. Chang et al., 2012; Tavernier et al., 2019). Wir untersuchten erstmals den Effekt eines Roquin 1-Roquin 2-*double-knock-outs* auf die IFN- $\gamma$ -Sekretion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorzellkontakt und auf deren Tumorzelllyse. Die Roquin *knock-out* T-Zellen lysierten die Tumorzellen schneller und sezernierten stark erhöhte Mengen von IFN- $\gamma$  im Vergleich zu Wildtyp T-Zellen. Unerwarteterweise zeigten Mäuse mit T-zellspezifischem Roquin 1-Roquin 2-*double-knock-out* ein stark beschleunigtes Tumorwachstum *in vivo* im Vergleich zu Wildtyp Mäusen.

Eine mögliche Erklärung für diese Diskrepanz ist T-Zell *exhaustion*. T-Zell *exhaustion* ist ein Status von T-Zelldysfunktion, der durch chronische T-Zellaktivierung entstehen kann und unter anderem das Wachstum von Tumoren begünstigt (Wherry, 2011). In einem Patienten mit Roquin 1 Funktionsverlustmutation exprimierten CD8<sup>+</sup> T-Zellen vermehrt die *exhaustion* Marker PD1 und CD11b (Tavernier et al., 2019). Zur Klärung, ob T-Zell *exhaustion* das beobachtete beschleunigte Tumorwachstum in Mäusen mit Roquin defizienten T-Zellen verursacht, sollten die T-Zellen dieser Mäuse auf die Expression von *exhaustion* Markern untersucht werden. Einen weiteren möglichen Grund für die gegensätzlichen Ergebnisse der *in vitro* und *in vivo* Versuche könnten die vom Roquin-*knock-out* betroffenen T-Zellpopulationen darstellen. Beim *in vivo* Versuch betraf der Roquin-*knock-out* im Gegensatz zu den *in vitro* Versuchen nicht nur die CD8<sup>+</sup> T-Zellen, sondern alle Subpopulationen. Da Roquin eine zentrale Funktion in der Differenzierung von T-Zellen besitzt, könnte eine Veränderung der Zusammensetzung der T-Zellpopulation für das beobachtete schnellere Tumorwachstum verantwortlich sein (Heissmeyer & Vogel, 2013).

#### 4.4 Klinische Bedeutung und Ausblick

In den letzten Jahrzehnten wurde neben der großen Bedeutung posttranskriptioneller Regulation für grundlegende Zellbiologie auch zunehmend die klinische Bedeutung von RBP evident. So werden vor allem Autoimmunerkrankung mit veränderter Expression von RBP in Zusammenhang gebracht (Taylor et al., 1996; Skriner et al., 2008; Yu et al., 2007). Des Weiteren häufen sich die Hinweise, dass Veränderungen in der Regulation von RBP auch in der Tumorgenese eine wichtige Rolle spielen und möglicherweise therapeutisch genutzt werden können (H. Wang et al., 2016; J. Wang et al., 2013; Zucconi & Wilson, 2011).

Moore et al. zeigten im Mausmodell eine schnellere Viruselimination durch beschleunigte und verstärkte Immunantwort durch TTP-*knock-out* in T-Zellen. Sie schlugen vor, einen möglichen Benefit eines TTP-*knock-outs* in der T-Zelltherapie von Tumoren zu untersuchen (Moore et al., 2018). Unsere Daten zeigten jedoch unerwarteterweise eine erhöhte IL-2-Sekretion durch TTP überexprimierende T-Zellen nach Tumorzellkontakt. IL-2 ist ein T-Zellwachstumsfaktor, der in CD8<sup>+</sup> T-Zellen zu Proliferation und Differenzierung in Gedächtnis- und Effektorzellen führt und notwendig für die Aufrechterhaltung der Funktionalität von T-Zellen ist. Mit Regressionen in Patienten mit metastasiertem Melanom und Nierenzellkarzinom war die Infusion von IL-2 die erste nachgewiesene effektive Immuntherapie von humanen Krebserkrankungen (Rosenberg, 2014). Rekombinantes IL-2 ist in Europa und den USA zur Therapie von Nierenzellkarzinomen zugelassen (Dutcher, 2002). Im adoptiven T-Zelltransfer könnte die Überexpression von TTP in CD8<sup>+</sup> T-Zellen genutzt werden, um eine effektive und prolongierte anti-tumorale Immunantwort durch vermehrte IL-2-Sekretion zu erhalten.

Chang et al. beschrieben eine verstärkte Sekretion von Interleukinen durch T-Zellen mit Roquin-*knock-out* nach artifizierter Aktivierung mit Antikörpern (P. P. Chang et al., 2012). Wir zeigten erstmals eine verstärkte Sekretion von IFN- $\gamma$  durch CD8<sup>+</sup> Roquin-*knock-out* T-Zellen nach Tumorzellkontakt. IFN- $\gamma$  spielt eine zentrale Rolle in der anti-tumoralen Immunantwort. Es beschleunigt die Tumorelimination, indem es die Immunogenität der Tumorzellen erhöht. In IFN- $\gamma$ -insensitiven Mäusen werden Tumore nicht effektiv abgestoßen (Dunn, Koebel, & Schreiber, 2006). Die höhere IFN- $\gamma$ -Sekretion durch CD8<sup>+</sup> Roquin-*knock-out* T-Zellen könnte im adoptiven T-Zelltransfer genutzt werden, um eine effektivere anti-tumorale Immunantwort und eine schnellere Elimination der Tumorzellen zu erhalten.

Wir konnten in dieser Arbeit zeigen, dass die RBP TTP, TIS11b, TIS11d, HuR, AUF1, Roquin 1 und Roquin 2 in T-Zellen exprimiert werden und, im Einklang mit bestehender Literatur, eine Rolle in der T-Zellaktivierung spielen. Zudem konnten wir nachweisen, dass T-Zellfunktionen durch T-Zell intrinsischen *knock-out* oder Überexpression dieser RBP beeinflusst werden können. Wang et al. zeigten bereits ein verlangsamtes Tumorwachstum in Mäusen mit systemischem TTP-*knock-out* (Q. Wang et al., 2017). Unsere Daten zeigten erstmals ein verändertes Tumorwachstum durch den T-Zell-intrinsischen *knock-out* eines RBP. Mit Roquin und TTP konnten wir zudem zwei Kandidaten mit potenziellem Nutzen für den adoptiven T-Zelltransfer identifizieren. Damit sind die Ergebnisse dieser Arbeit ein erster Schritt auf dem Weg zu einem besseren Verständnis und einer therapeutischen Nutzung von RBP in CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Kontext der Tumorummuntherapie.

Zur definitiven Klärung eines möglichen Benefits sind weiterführende Experimente notwendig. Die von uns beobachtete erhöhte IL-2-Sekretion durch TTP-Überexpression muss zunächst in primären T-Zellen verifiziert werden und anschließend *in vivo* im Mausmodell untersucht werden. Ein wichtiger nächster Schritt ist außerdem die Untersuchung des Effekts eines CD8<sup>+</sup> spezifischen Roquin-*knock-outs* auf das Tumorstadium *in vivo* oder ein adoptiver T-Zelltransfer von Roquin-*knock-out* T-Zellen im Mausmodell. Weiterführende AUF1- und HuR-Überexpressions- und *knock-out*-Versuche werden benötigt, um zu klären, ob auch diese Proteine zur Verbesserung des adoptiven T-Zelltransfers genutzt werden können.

## 5 Zusammenfassung

Die Immuntherapie hat sich als eigene Säule in der Tumorthherapie etabliert. Es bedarf weiterer Forschung, um den Patienten einen noch stärkeren und anhaltenderen Nutzen zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang bisher wenig untersucht sind posttranskriptionelle Regulationsmechanismen in Tumor-gerichteten T-Zellen durch RNA-bindende Proteine. Ziel der vorliegenden Arbeit ist es, die Bedeutung der RNA-bindenden Proteine TTP, TIS11b, TIS11d, HuR, AUF1, Roquin 1 und Roquin 2 in zytotoxischen T-Zellen im Kontext ihrer anti-tumoralen Aktivität zu untersuchen.

Die Expression der Proteine TTP und TIS11b wurde nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors mit schneller Kinetik hochreguliert um anschließend längerfristig abzusinken, während für TIS11d eine Herunterregulierung beobachtet wurde. Das Ausmaß der Expressionsänderung war bei allen drei Proteinen von der Stärke der T-Zellaktivierung abhängig. TIS11b-Überexpression führte nach Tumorzellkontakt zu einer verringerten IL-2-Sekretion durch die T-Zellen, TTP-Überexpression zu einer stark erhöhten IL-2-Sekretion.

Die RNA-bindenden Proteine HuR und AUF1 wiesen ein nahezu identisches Expressionsmuster auf. Dies lässt auf eine ähnliche oder gleiche Regulation schließen. Beide Proteine wurden nach Aktivierung des T-Zell-Rezeptors auf mRNA- und Proteinebene stark erhöht exprimiert, wobei der Expressionsanstieg positiv linear mit der T-Zellaktivierung korrelierte. Die Überexpression von HuR führte nach Tumorzellkontakt zu verminderter IL-2-Sekretion durch T-Zellen.

Roquin 1 und Roquin 2 zeigten keine wesentliche Expressionsänderung nach alleiniger T-Zell-Rezeptor-Aktivierung durch Antikörper. Der Kontakt mit Pankreaskarzinomzellen führte zu einem starken Expressionsanstieg von Roquin 2. Möglicherweise wird die Roquin-2-Expression über T-Zell-Rezeptor-unabhängige Signale durch Tumorzellen beeinflusst. Ein Roquin 1-Roquin 2-*double-knock-out* führte *in vitro* zu stark erhöhter IFN- $\gamma$ -Sekretion durch primäre CD8<sup>+</sup> T-Zellen nach Tumorzellkontakt und zu einem beschleunigten Tumorwachstum *in vivo*.

Die Daten dieser Arbeit weisen auf eine Rolle von TTP, TIS11b, TIS11d, HuR und AUF1 in der Aktivierung von T-Zellen und eine mögliche Beeinflussung der Roquin-Expression durch Bindung an Tumorzellen hin. Sie zeigen außerdem, dass die Aktivierung und Funktion von CD8<sup>+</sup> T-Zellen und das Tumorwachstum im Mausmodell durch die Manipulation der Expression von RNA-bindenden Proteine beeinflusst werden kann. Die Ergebnisse dieser Arbeit bilden einen Beitrag zum Verständnis und zu einer möglichen therapeutischen Nutzung RNA-bindender Proteine als Targets in CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Kontext der Tumormimmuntherapie.

## Literaturverzeichnis

- Anderson, P. (2008). Post-transcriptional control of cytokine production. *Nat Immunol*, 9(4), 353-359.
- Appay, V., Douek, D. C., & Price, D. A. (2008). CD8+ T cell efficacy in vaccination and disease. *Nat Med*, 14(6), 623-628.
- Atasoy, U., Watson, J., Patel, D., & Keene, J. D. (1998). ELAV protein HuA (HuR) can redistribute between nucleus and cytoplasm and is upregulated during serum stimulation and T cell activation. *J Cell Sci*, 111 ( Pt 21), 3145-3156.
- Baruch, E. N., Berg, A. L., Besser, M. J., Schachter, J., & Markel, G. (2017). Adoptive T cell therapy: An overview of obstacles and opportunities. *Cancer*, 123(S11), 2154-2162.
- Beck, A. R., Medley, Q. G., O'Brien, S., Anderson, P., & Streuli, M. (1996). Structure, tissue distribution and genomic organization of the murine RRM-type RNA binding proteins TIA-1 and TIAR. *Nucleic Acids Res*, 24(19), 3829-3835.
- Bertossi, A., Aichinger, M., Sansonetti, P., Lech, M., Neff, F., Pal, M., Wunderlich, F. T., Anders, H. J., Klein, L., & Schmidt-Supprian, M. (2011). Loss of Roquin induces early death and immune deregulation but not autoimmunity. *J Exp Med*, 208(9), 1749-1756.
- Blackinton, J. G., & Keene, J. D. (2016). Functional coordination and HuR-mediated regulation of mRNA stability during T cell activation. *Nucleic Acids Res*, 44(1), 426-436.
- Bohjanen, P. R., Moua, M. L., Guo, L., Taye, A., & Vlasova-St Louis, I. A. (2015). Altered CELF1 binding to target transcripts in malignant T cells. *RNA*, 21(10), 1757-1769.
- Carballo, E., Lai, W. S., & Blakeshear, P. J. (1998). Feedback inhibition of macrophage tumor necrosis factor-alpha production by tristetraprolin. *Science*, 281(5379), 1001-1005.
- Carballo, E., Lai, W. S., & Blakeshear, P. J. (2000). Evidence that tristetraprolin is a physiological regulator of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor messenger RNA deadenylation and stability. *Blood*, 95(6), 1891-1899.
- Casolaro, V., Fang, X., Tancowny, B., Fan, J., Wu, F., Srikantan, S., Asaki, S. Y., De Fanis, U., Huang, S. K., Gorospe, M., Atasoy, U. X., & Stellato, C. (2008). Posttranscriptional regulation of IL-13 in T cells: role of the RNA-binding protein HuR. *J Allergy Clin Immunol*, 121(4), 853-859 e854.
- Chang, N., Yi, J., Guo, G., Liu, X., Shang, Y., Tong, T., Cui, Q., Zhan, M., Gorospe, M., & Wang, W. (2010). HuR uses AUF1 as a cofactor to promote p16INK4 mRNA decay. *Mol Cell Biol*, 30(15), 3875-3886.

- Chang, P. P., Lee, S. K., Hu, X., Davey, G., Duan, G., Cho, J. H., Karupiah, G., Sprent, J., Heath, W. R., Bertram, E. M., & Vinuesa, C. G. (2012). Breakdown in repression of IFN-gamma mRNA leads to accumulation of self-reactive effector CD8<sup>+</sup> T cells. *J Immunol*, *189*(2), 701-710.
- Chang, X. (2016). RNA-binding protein hnRNPLL as a critical regulator of lymphocyte homeostasis and differentiation. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *7*(3), 295-302.
- Cheadle, C., Fan, J., Cho-Chung, Y. S., Werner, T., Ray, J., Do, L., Gorospe, M., & Becker, K. G. (2005). Control of gene expression during T cell activation: alternate regulation of mRNA transcription and mRNA stability. *BMC Genomics*, *6*, 75.
- Chen, C. Y., Gherzi, R., Andersen, J. S., Gaietta, G., Jurchott, K., Royer, H. D., Mann, M., & Karin, M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev*, *14*(10), 1236-1248.
- Chen, C. Y., Gherzi, R., Ong, S. E., Chan, E. L., Raijmakers, R., Pruijn, G. J., Stoecklin, G., Moroni, C., Mann, M., & Karin, M. (2001). AU binding proteins recruit the exosome to degrade ARE-containing mRNAs. *Cell*, *107*(4), 451-464.
- Chen, Y. L., Huang, Y. L., Lin, N. Y., Chen, H. C., Chiu, W. C., & Chang, C. J. (2006). Differential regulation of ARE-mediated TNF $\alpha$  and IL-1 $\beta$  mRNA stability by lipopolysaccharide in RAW264.7 cells. *Biochem Biophys Res Commun*, *346*(1), 160-168.
- Ciais, D., Cherradi, N., & Feige, J. J. (2013). Multiple functions of tristetraprolin/TIS11 RNA-binding proteins in the regulation of mRNA biogenesis and degradation. *Cell Mol Life Sci*, *70*(12), 2031-2044.
- David, P. S., Tanveer, R., & Port, J. D. (2007). FRET-detectable interactions between the ARE binding proteins, HuR and p37AUF1. *RNA*, *13*(9), 1453-1468.
- Dean, J. L., Wait, R., Mahtani, K. R., Sully, G., Clark, A. R., & Saklatvala, J. (2001). The 3' untranslated region of tumor necrosis factor alpha mRNA is a target of the mRNA-stabilizing factor HuR. *Mol Cell Biol*, *21*(3), 721-730.
- Dong, C., Juedes, A. E., Temann, U. A., Shresta, S., Allison, J. P., Ruddle, N. H., & Flavell, R. A. (2001). ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*, *409*(6816), 97-101.
- Dunn, G. P., Koebel, C. M., & Schreiber, R. D. (2006). Interferons, immunity and cancer immunoediting. *Nat Rev Immunol*, *6*(11), 836-848.
- Dunn, G. P., Old, L. J., & Schreiber, R. D. (2004). The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*, *22*, 329-360.
- Dutcher, J. P. (2002). Current status of interleukin-2 therapy for metastatic renal cell carcinoma and metastatic melanoma. *Oncology (Williston Park)*, *16*(11 Suppl 13), 4-10.

- Ellyard, J. I., Chia, T., Rodriguez-Pinilla, S. M., Martin, J. L., Hu, X., Navarro-Gonzalez, M., Garcia, J. F., Delfau-Larue, M. H., Montes-Moreno, S., Gaulard, P., Cook, M. C., Walters, G., Piris, M. A., & Vinuesa, C. G. (2012). Heterozygosity for Roquinsan leads to angioimmunoblastic T-cell lymphoma-like tumors in mice. *Blood*, *120*(4), 812-821.
- EMBL-EBI. (2019). Gene Expression Atlas. Differential expression. Abgerufen am 22.07.2019. <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>
- Esnault, S., Shen, Z. J., Whitesel, E., & Malter, J. S. (2006). The peptidyl-prolyl isomerase Pin1 regulates granulocyte-macrophage colony-stimulating factor mRNA stability in T lymphocytes. *J Immunol*, *177*(10), 6999-7006.
- Fan, X. C., & Steitz, J. A. (1998). Overexpression of HuR, a nuclear-cytoplasmic shuttling protein, increases the in vivo stability of ARE-containing mRNAs. *EMBO J*, *17*(12), 3448-3460.
- Galloway, A., Saveliev, A., Lukasiak, S., Hodson, D. J., Bolland, D., Balmanno, K., Ahlfors, H., Monzon-Casanova, E., Mannurita, S. C., Bell, L. S., Andrews, S., Diaz-Munoz, M. D., Cook, S. J., Corcoran, A., & Turner, M. (2016). RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 promote cell quiescence. *Science*, *352*(6284), 453-459.
- Garnon, J., Lachance, C., Di Marco, S., Hel, Z., Marion, D., Ruiz, M. C., Newkirk, M. M., Khandjian, E. W., & Radzioch, D. (2005). Fragile X-related protein FXR1P regulates proinflammatory cytokine tumor necrosis factor expression at the post-transcriptional level. *J Biol Chem*, *280*(7), 5750-5763.
- Gil, D., Gutierrez, D., & Alarcon, B. (2001). Intracellular redistribution of nucleolin upon interaction with the CD3epsilon chain of the T cell receptor complex. *J Biol Chem*, *276*(14), 11174-11179.
- Gouble, A., Grazide, S., Meggetto, F., Mercier, P., Delsol, G., & Morello, D. (2002). A new player in oncogenesis: AUF1/hnRNP overexpression leads to tumorigenesis in transgenic mice. *Cancer Res*, *62*(5), 1489-1495.
- Gratacos, F. M., & Brewer, G. (2010). The role of AUF1 in regulated mRNA decay. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *1*(3), 457-473.
- Gubin, M. M., Techasintana, P., Magee, J. D., Dahm, G. M., Calaluze, R., Martindale, J. L., Whitney, M. S., Franklin, C. L., Besch-Williford, C., Hollingsworth, J. W., Abdelmohsen, K., Gorospe, M., & Atasoy, U. (2014). Conditional knockout of the RNA-binding protein HuR in CD4(+) T cells reveals a gene dosage effect on cytokine production. *Mol Med*, *20*, 93-108.
- Guo, J., Qu, H., Shan, T., Chen, Y., Chen, Y., & Xia, J. (2018). Tristetraprolin overexpression in gastric cancer cells suppresses PD-L1 expression and inhibits tumor progression by enhancing antitumor immunity. *Mol Cells*, *41*(7), 653-664.
- Hau, H. H., Walsh, R. J., Ogilvie, R. L., Williams, D. A., Reilly, C. S., & Bohjanen, P. R. (2007). Tristetraprolin recruits functional mRNA decay complexes to ARE sequences. *J Cell Biochem*, *100*(6), 1477-1492.

- Heissmeyer, V., & Vogel, K. U. (2013). Molecular control of Tfh-cell differentiation by Roquin family proteins.  
*Immunol Rev*, 253(1), 273-289.
- Hentze, M. W., Castello, A., Schwarzl, T., & Preiss, T. (2018). A brave new world of RNA-binding proteins.  
*Nat Rev Mol Cell Biol*, 19(5), 327-341.
- Hodson, D. J., Janas, M. L., Galloway, A., Bell, S. E., Andrews, S., Li, C. M., Pannell, R., Siebel, C. W., MacDonald, H. R., De Keersmaecker, K., Ferrando, A. A., Grutz, G., & Turner, M. (2010). Deletion of the RNA-binding proteins ZFP36L1 and ZFP36L2 leads to perturbed thymic development and T lymphoblastic leukemia.  
*Nat Immunol*, 11(8), 717-724.
- Houot, R., Schultz, L. M., Marabelle, A., & Kohrt, H. (2015). T-cell-based immunotherapy: Adoptive cell transfer and checkpoint inhibition.  
*Cancer Immunol Res*, 3(10), 1115-1122.
- Ivanov, P., & Anderson, P. (2013). Post-transcriptional regulatory networks in immunity.  
*Immunol Rev*, 253(1), 253-272.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., & Shlomchik, M. J. (2001). *Immunobiology: The immune system in health and disease* (5th edition ed.). New York, N.Y.: Garland Science.
- Jeltsch, K. M., Hu, D., Brenner, S., Zoller, J., Heinz, G. A., Nagel, D., Vogel, K. U., Rehage, N., Warth, S. C., Edelmann, S. L., Gloury, R., Martin, N., Lohs, C., Lech, M., Stehklein, J. E., Geerlof, A., Kremmer, E., Weber, A., Anders, H. J., Schmitz, I., Schmidt-Supprian, M., Fu, M., Holtmann, H., Krappmann, D., Ruland, J., Kallies, A., Heikenwalder, M., & Heissmeyer, V. (2014). Cleavage of roquin and regnase-1 by the paracaspase MALT1 releases their cooperatively repressed targets to promote T(H)17 differentiation.  
*Nat Immunol*, 15(11), 1079-1089.
- Kalos, M., & June, C. H. (2013). Adoptive T cell transfer for cancer immunotherapy in the era of synthetic biology.  
*Immunity*, 39(1), 49-60.
- Karttunen, J., Sanderson, S., & Shastri, N. (1992). Detection of rare antigen-presenting cells by the lacZ T-cell activation assay suggests an expression cloning strategy for T-cell antigens.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, 89(13), 6020-6024.
- Kontoyiannis, D., Pasparakis, M., Pizarro, T. T., Cominelli, F., & Kollias, G. (1999). Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements: implications for joint and gut-associated immunopathologies.  
*Immunity*, 10(3), 387-398.
- Kosinski, P. A., Laughlin, J., Singh, K., & Covey, L. R. (2003). A complex containing polypyrimidine tract-binding protein is involved in regulating the stability of CD40 ligand (CD154) mRNA.  
*J Immunol*, 170(2), 979-988.
- Kumar, M., Matta, A., Masui, O., Srivastava, G., Kaur, J., Thakar, A., Shukla, N. K., RoyChoudhury, A., Sharma, M., Walfish, P. G., Michael Siu, K. W., Chauhan, S. S., & Ralhan, R. (2015). Nuclear heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D is associated with poor prognosis and interactome analysis reveals its novel binding partners in oral cancer.  
*J Transl Med*, 13, 285.

- La Porta, J., Matus-Nicodemos, R., Valentin-Acevedo, A., & Covey, L. R. (2016). The RNA-binding protein, polypyrimidine tract-binding protein 1 (PTBP1) is a key regulator of CD4 T cell activation.  
*PLoS One*, *11*(8), e0158708.
- Lai, W. S., & Blackshear, P. J. (2001). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA: tristetraprolin-mediated AU-rich element-dependent mRNA degradation can occur in the absence of a poly(A) tail.  
*J Biol Chem*, *276*(25), 23144-23154.
- Lai, W. S., Carballo, E., Thorn, J. M., Kennington, E. A., & Blackshear, P. J. (2000). Interactions of CCCH zinc finger proteins with mRNA. Binding of tristetraprolin-related zinc finger proteins to Au-rich elements and destabilization of mRNA.  
*J Biol Chem*, *275*(23), 17827-17837.
- Lai, W. S., Kennington, E. A., & Blackshear, P. J. (2003). Tristetraprolin and its family members can promote the cell-free deadenylation of AU-rich element-containing mRNAs by poly(A) ribonuclease.  
*Mol Cell Biol*, *23*(11), 3798-3812.
- Lal, A., Mazan-Mamczarz, K., Kawai, T., Yang, X., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2004). Concurrent versus individual binding of HuR and AUF1 to common labile target mRNAs.  
*EMBO J*, *23*(15), 3092-3102.
- Lee, H. H., Yoon, N. A., Vo, M. T., Kim, C. W., Woo, J. M., Cha, H. J., Cho, Y. W., Lee, B. J., Cho, W. J., & Park, J. W. (2012). Tristetraprolin down-regulates IL-17 through mRNA destabilization.  
*FEBS Lett*, *586*(1), 41-46.
- Leppek, K., Schott, J., Reitter, S., Poetz, F., Hammond, M. C., & Stoecklin, G. (2013). Roquin promotes constitutive mRNA decay via a conserved class of stem-loop recognition motifs.  
*Cell*, *153*(4), 869-881.
- Lin, W. J., Zheng, X., Lin, C. C., Tsao, J., Zhu, X., Cody, J. J., Coleman, J. M., Gherzi, R., Luo, M., Townes, T. M., Parker, J. N., & Chen, C. Y. (2011). Posttranscriptional control of type I interferon genes by KSRP in the innate immune response against viral infection.  
*Mol Cell Biol*, *31*(16), 3196-3207.
- Lu, J. Y., Sadri, N., & Schneider, R. J. (2006). Endotoxic shock in AUF1 knockout mice mediated by failure to degrade proinflammatory cytokine mRNAs.  
*Genes Dev*, *20*(22), 3174-3184.
- Lykke-Andersen, J., & Wagner, E. (2005). Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1.  
*Genes Dev*, *19*(3), 351-361.
- Mallory, M. J., Allon, S. J., Qiu, J., Gazzara, M. R., Tapescu, I., Martinez, N. M., Fu, X. D., & Lynch, K. W. (2015). Induced transcription and stability of CELF2 mRNA drives widespread alternative splicing during T-cell signaling.  
*Proc Natl Acad Sci U S A*, *112*(17), E2139-2148.
- Matsushita, K., Takeuchi, O., Standley, D. M., Kumagai, Y., Kawagoe, T., Miyake, T., Satoh, T., Kato, H., Tsujimura, T., Nakamura, H., & Akira, S. (2009). Zc3h12a is an RNase essential for controlling immune responses by regulating mRNA decay.  
*Nature*, *458*(7242), 1185-1190.

- Maus, M. V., & June, C. H. (2016). Making better chimeric antigen receptors for adoptive T-cell therapy.  
*Clin Cancer Res*, 22(8), 1875-1884.
- Meisner, N. C., Hintersteiner, M., Mueller, K., Bauer, R., Seifert, J. M., Naegeli, H. U., Ottl, J., Oberer, L., Guenat, C., Moss, S., Harrer, N., Woisetschlaeger, M., Buehler, C., Uhl, V., & Auer, M. (2007). Identification and mechanistic characterization of low-molecular-weight inhibitors for HuR.  
*Nat Chem Biol*, 3(8), 508-515.
- Moore, M. J., Blachere, N. E., Fak, J. J., Park, C. Y., Sawicka, K., Parveen, S., Zucker-Scharff, I., Moltedo, B., Rudensky, A. Y., & Darnell, R. B. (2018). ZFP36 RNA-binding proteins restrain T cell activation and anti-viral immunity.  
*Elife*, 7.
- Moulton, V. R., Kyttaris, V. C., Juang, Y. T., Chowdhury, B., & Tsokos, G. C. (2008). The RNA-stabilizing protein HuR regulates the expression of zeta chain of the human T cell receptor-associated CD3 complex.  
*J Biol Chem*, 283(29), 20037-20044.
- Mukherjee, N., Corcoran, D. L., Nusbaum, J. D., Reid, D. W., Georgiev, S., Hafner, M., Ascano, M., Jr., Tuschl, T., Ohler, U., & Keene, J. D. (2011). Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability.  
*Mol Cell*, 43(3), 327-339.
- Ng, S., Gisonni-Lex, L., & Azizi, A. (2017). New approaches for characterization of the genetic stability of vaccine cell lines.  
*Hum Vaccin Immunother*, 13(7), 1669-1672.
- Ogilvie, R. L., Abelson, M., Hau, H. H., Vlasova, I., Blackshear, P. J., & Bohjanen, P. R. (2005). Tristetraprolin down-regulates IL-2 gene expression through AU-rich element-mediated mRNA decay.  
*J Immunol*, 174(2), 953-961.
- Ogilvie, R. L., Sternjohn, J. R., Rattenbacher, B., Vlasova, I. A., Williams, D. A., Hau, H. H., Blackshear, P. J., & Bohjanen, P. R. (2009). Tristetraprolin mediates interferon-gamma mRNA decay.  
*J Biol Chem*, 284(17), 11216-11223.
- Palucka, A. K., & Coussens, L. M. (2016). The basis of oncoimmunology.  
*Cell*, 164(6), 1233-1247.
- Papadaki, O., Milatos, S., Grammenoudi, S., Mukherjee, N., Keene, J. D., & Kontoyiannis, D. L. (2009). Control of thymic T cell maturation, deletion and egress by the RNA-binding protein HuR.  
*J Immunol*, 182(11), 6779-6788.
- Park, J. M., Lee, T. H., & Kang, T. H. (2018). Roles of tristetraprolin in tumorigenesis.  
*Int J Mol Sci*, 19(11).
- Pieczyk, M., Wax, S., Beck, A. R., Kedersha, N., Gupta, M., Maritim, B., Chen, S., Gueydan, C., Krusys, V., Streuli, M., & Anderson, P. (2000). TIA-1 is a translational silencer that selectively regulates the expression of TNF-alpha.  
*EMBO J*, 19(15), 4154-4163.

- Prelich, G. (2012). Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics*, *190*(3), 841-854.
- Raghavan, A., Ogilvie, R. L., Reilly, C., Abelson, M. L., Raghavan, S., Vasdewani, J., Krathwohl, M., & Bohjanen, P. R. (2002). Genome-wide analysis of mRNA decay in resting and activated primary human T lymphocytes. *Nucleic Acids Res*, *30*(24), 5529-5538.
- Raghavan, A., Robison, R. L., McNabb, J., Miller, C. R., Williams, D. A., & Bohjanen, P. R. (2001). HuA and tristetraprolin are induced following T cell activation and display distinct but overlapping RNA binding specificities. *J Biol Chem*, *276*(51), 47958-47965.
- Raineri, I., Wegmueller, D., Gross, B., Certa, U., & Moroni, C. (2004). Roles of AUF1 isoforms, HuR and BRF1 in ARE-dependent mRNA turnover studied by RNA interference. *Nucleic Acids Res*, *32*(4), 1279-1288.
- Rosenberg, S. A. (2014). IL-2: the first effective immunotherapy for human cancer. *J Immunol*, *192*(12), 5451-5458.
- Rosenberg, S. A., Yang, J. C., Sherry, R. M., Kammula, U. S., Hughes, M. S., Phan, G. Q., Citrin, D. E., Restifo, N. P., Robbins, P. F., Wunderlich, J. R., Morton, K. E., Laurencot, C. M., Steinberg, S. M., White, D. E., & Dudley, M. E. (2011). Durable complete responses in heavily pretreated patients with metastatic melanoma using T-cell transfer immunotherapy. *Clin Cancer Res*, *17*(13), 4550-4557.
- Sadri, N., & Schneider, R. J. (2009). Auf1/Hnrnpd-deficient mice develop pruritic inflammatory skin disease. *J Invest Dermatol*, *129*(3), 657-670.
- Salerno, F., & Wolkers, M. C. (2015). T-cells require post-transcriptional regulation for accurate immune responses. *Biochem Soc Trans*, *43*(6), 1201-1207.
- Sandler, H., Kreth, J., Timmers, H. T., & Stoecklin, G. (2011). Not1 mediates recruitment of the deadenylase Caf1 to mRNAs targeted for degradation by tristetraprolin. *Nucleic Acids Res*, *39*(10), 4373-4386.
- Sarkar, B., Xi, Q., He, C., & Schneider, R. J. (2003). Selective degradation of AU-rich mRNAs promoted by the p37 AUF1 protein isoform. *Mol Cell Biol*, *23*(18), 6685-6693.
- Sarkar, S., Sinsimer, K. S., Foster, R. L., Brewer, G., & Pestka, S. (2008). AUF1 isoform-specific regulation of anti-inflammatory IL10 expression in monocytes. *J Interferon Cytokine Res*, *28*(11), 679-691.
- Schott, J., & Stoecklin, G. (2010). Networks controlling mRNA decay in the immune system. *Wiley Interdiscip Rev RNA*, *1*(3), 432-456.
- Schuster, S. J., Svoboda, J., Chong, E. A., Nasta, S. D., Mato, A. R., Anak, O., Brogdon, J. L., Pruteanu-Malinici, I., Bhoj, V., Landsburg, D., Wasik, M., Levine, B. L., Lacey, S. F., Melenhorst, J. J., Porter, D. L., & June, C. H. (2017). Chimeric antigen receptor T cells in refractory B-cell lymphomas. *N Engl J Med*, *377*(26), 2545-2554.

Shi, L., Godfrey, W. R., Lin, J., Zhao, G., & Kao, P. N. (2007). NF90 regulates inducible IL-2 gene expression in T cells.

*J Exp Med*, 204(5), 971-977.

Singh, K., Laughlin, J., Kosinski, P. A., & Covey, L. R. (2004). Nucleolin is a second component of the CD154 mRNA stability complex that regulates mRNA turnover in activated T cells.

*J Immunol*, 173(2), 976-985.

Skriner, K., Hueber, W., Suleymanoglu, E., Hofler, E., Krenn, V., Smolen, J., & Steiner, G. (2008). AUF1, the regulator of tumor necrosis factor alpha messenger RNA decay, is targeted by autoantibodies of patients with systemic rheumatic diseases.

*Arthritis Rheum*, 58(2), 511-520.

Stoecklin, G., Colombi, M., Raineri, I., Leuenberger, S., Mallaun, M., Schmidlin, M., Gross, B., Lu, M., Kitamura, T., & Moroni, C. (2002). Functional cloning of BRF1, a regulator of ARE-dependent mRNA turnover.

*EMBO J*, 21(17), 4709-4718.

Stoecklin, G., Ming, X. F., Looser, R., & Moroni, C. (2000). Somatic mRNA turnover mutants implicate tristetraprolin in the interleukin-3 mRNA degradation pathway.

*Mol Cell Biol*, 20(11), 3753-3763.

Sung, S. C., Kim, K., Lee, K. A., Choi, K. H., Kim, S. M., Son, Y. H., Moon, Y. S., Eo, S. K., & Rhim, B. Y. (2009). 7-Ketocholesterol upregulates interleukin-6 via mechanisms that are distinct from those of tumor necrosis factor-alpha, in vascular smooth muscle cells.

*J Vasc Res*, 46(1), 36-44.

Tavernier, S. J., Athanasopoulos, V., Verloo, P., Behrens, G., Staal, J., Bogaert, D. J., Naesens, L., De Bruyne, M., Van Gassen, S., Parthoens, E., Ellyard, J., Cappello, J., Morris, L. X., Van Gorp, H., Van Isterdael, G., Saeys, Y., Lamkanfi, M., Schelstraete, P., Dehoorne, J., Bordon, V., Van Coster, R., Lambrecht, B. N., Menten, B., Beyaert, R., Vinuesa, C. G., Heissmeyer, V., Dullaers, M., & Haerynck, F. (2019). A human immune dysregulation syndrome characterized by severe hyperinflammation with a homozygous nonsense Roquin-1 mutation.

*Nat Commun*, 10(1), 4779.

Taylor, G. A., Carballo, E., Lee, D. M., Lai, W. S., Thompson, M. J., Patel, D. D., Schenkman, D. I., Gilkeson, G. S., Broxmeyer, H. E., Haynes, B. F., & Blackshear, P. J. (1996). A pathogenetic role for TNF alpha in the syndrome of cachexia, arthritis, and autoimmunity resulting from tristetraprolin (TTP) deficiency.

*Immunity*, 4(5), 445-454.

Techasintana, P., Davis, J. W., Gubin, M. M., Magee, J. D., & Atasoy, U. (2015).

Transcriptomic-wide discovery of direct and indirect huR RNA targets in activated CD4+ T cells.

*PLoS One*, 10(7), e0129321.

Techasintana, P., Ellis, J. S., Glascock, J., Gubin, M. M., Ridenhour, S. E., Magee, J. D., Hart, M. L., Yao, P., Zhou, H., Whitney, M. S., Franklin, C. L., Martindale, J. L., Gorospe, M., Davis, W. J., Fox, P. L., Li, X., & Atasoy, U. (2017). The RNA-binding Protein HuR posttranscriptionally regulates IL-2 homeostasis and CD4(+) Th2 differentiation.

*Immunohorizons*, 1(6), 109-123.

Tiedje, C., Ronkina, N., Tehrani, M., Dhamija, S., Laass, K., Holtmann, H., Kotlyarov, A., & Gaestel, M. (2012). The p38/MK2-driven exchange between tristetraprolin and HuR regulates AU-rich element-dependent translation.

*PLoS Genet*, 8(9), e1002977.

Trojanowicz, B., Brodauf, L., Sekulla, C., Lorenz, K., Finke, R., Dralle, H., & Hoang-Vu, C. (2009). The role of AUF1 in thyroid carcinoma progression.

*Endocr Relat Cancer*, 16(3), 857-871.

van Kooten, C., & Banchereau, J. (2000). CD40-CD40 ligand.

*J Leukoc Biol*, 67(1), 2-17.

Varnum, B. C., Ma, Q. F., Chi, T. H., Fletcher, B., & Herschman, H. R. (1991). The TIS11 primary response gene is a member of a gene family that encodes proteins with a highly conserved sequence containing an unusual Cys-His repeat.

*Mol Cell Biol*, 11(3), 1754-1758.

Verma, N. K., & Kelleher, D. (2017). Not just an adhesion molecule: LFA-1 contact tunes the T lymphocyte program.

*J Immunol*, 199(4), 1213-1221.

Vinuesa, C. G., Cook, M. C., Angelucci, C., Athanasopoulos, V., Rui, L., Hill, K. M., Yu, D., Domaschek, H., Whittle, B., Lambe, T., Roberts, I. S., Copley, R. R., Bell, J. I., Cornall, R. J., & Goodnow, C. C. (2005). A RING-type ubiquitin ligase family member required to repress follicular helper T cells and autoimmunity.

*Nature*, 435(7041), 452-458.

Vlasova, I. A., Tahoe, N. M., Fan, D., Larsson, O., Rattenbacher, B., Sternjohn, J. R., Vasdewani, J., Karypis, G., Reilly, C. S., Bitterman, P. B., & Bohjanen, P. R. (2008). Conserved GU-rich elements mediate mRNA decay by binding to CUG-binding protein 1.

*Mol Cell*, 29(2), 263-270.

Vogel, K. U., Bell, L. S., Galloway, A., Ahlfors, H., & Turner, M. (2016). The RNA-binding proteins Zfp3611 and Zfp3612 enforce the thymic beta-selection checkpoint by limiting DNA damage response signaling and cell cycle progression.

*J Immunol*, 197(7), 2673-2685.

Vogel, K. U., Edelmann, S. L., Jeltsch, K. M., Bertossi, A., Heger, K., Heinz, G. A., Zoller, J., Warth, S. C., Hoefig, K. P., Lohs, C., Neff, F., Kremmer, E., Schick, J., Repsilber, D., Geerlof, A., Blum, H., Wurst, W., Heikenwalder, M., Schmidt-Supprian, M., & Heissmeyer, V. (2013). Roquin paralogs 1 and 2 redundantly repress the Icos and Ox40 costimulator mRNAs and control follicular helper T cell differentiation.

*Immunity*, 38(4), 655-668.

Wagner, B. J., DeMaria, C. T., Sun, Y., Wilson, G. M., & Brewer, G. (1998). Structure and genomic organization of the human AUF1 gene: alternative pre-mRNA splicing generates four protein isoforms.

*Genomics*, 48(2), 195-202.

Wang, H., Ding, N., Guo, J., Xia, J., & Ruan, Y. (2016). Dysregulation of TTP and HuR plays an important role in cancers.

*Tumour Biol*, 37(11), 14451-14461.

Wang, J., Guo, Y., Chu, H., Guan, Y., Bi, J., & Wang, B. (2013). Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis.

*Int J Mol Sci*, 14(5), 10015-10041.

- Wang, J. G., Collinge, M., Ramgolam, V., Ayalon, O., Fan, X. C., Pardi, R., & Bender, J. R. (2006). LFA-1-dependent HuR nuclear export and cytokine mRNA stabilization in T cell activation.  
*J Immunol*, 176(4), 2105-2113.
- Wang, Q., Ning, H., Peng, H., Wei, L., Hou, R., Hoft, D. F., & Liu, J. (2017). Tristetraprolin inhibits macrophage IL-27-induced activation of antitumour cytotoxic T cell responses.  
*Nat Commun*, 8(1), 867.
- Wherry, E. J. (2011). T cell exhaustion.  
*Nat Immunol*, 12(6), 492-499.
- Yang, Y., Kang, P., Gao, J., Xu, C., Wang, S., Jin, H., Li, Y., Liu, W., & Wu, X. (2014). AU-binding factor 1 expression was correlated with metadherin expression and progression of hepatocellular carcinoma.  
*Tumour Biol*, 35(3), 2747-2751.
- Yannelli, J. R., Hyatt, C., McConnell, S., Hines, K., Jacknin, L., Parker, L., Sanders, M., & Rosenberg, S. A. (1996). Growth of tumor-infiltrating lymphocytes from human solid cancers: summary of a 5-year experience.  
*Int J Cancer*, 65(4), 413-421.
- Yarovinsky, T. O., Butler, N. S., Monick, M. M., & Hunninghake, G. W. (2006). Early exposure to IL-4 stabilizes IL-4 mRNA in CD4+ T cells via RNA-binding protein HuR.  
*J Immunol*, 177(7), 4426-4435.
- Yu, D., Tan, A. H., Hu, X., Athanasopoulos, V., Simpson, N., Silva, D. G., Hutloff, A., Giles, K. M., Leedman, P. J., Lam, K. P., Goodnow, C. C., & Vinuesa, C. G. (2007). Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger RNA.  
*Nature*, 450(7167), 299-303.
- Zucconi, B. E., & Wilson, G. M. (2011). Modulation of neoplastic gene regulatory pathways by the RNA-binding factor AUF1.  
*Front Biosci (Landmark Ed)*, 16, 2307-2325.

## Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ARE	Adenine-uridine-rich element
AUF1	AU-rich element RNA-binding protein 1
BSA	Bovines Serum-Albumin
bzw.	Beziehungsweise
CAR	<i>Chimeric antigen receptor</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CD40L	CD40-Ligand
cDNA	Complementary Desoxyribonukleinsäure
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CP	<i>Crossing point</i>
CUGBP1	<i>CUG triplet repeat, RNA binding protein 1</i>
CUGBP2	<i>CUG triplet repeat, RNA binding protein 2</i>
Dcp	<i>Decapping</i> Enzym
ddH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Nukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EG7	EL4-OVA
FACS	Durchflusszytometrie
FBS	Fetales Kälberserum
Fwd	Vorwärts
FXR1P	<i>Fragile X-related protein 1</i>
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s <sup>2</sup> )
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Kolonie-stimulierender Faktor
h	Stunde
HCL	Salzsäure
hnRNPLL	<i>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L-like</i>
HRP	Meerrettichperoxidase
HuR	<i>Human antigen R</i>
ICOS	<i>Inducible costimulatory molecule</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
KO	<i>knock-out</i>

---

KSRP	<i>KH-type splicing regulatory protein</i>
LB-Medium	Lysogeny broth Nährmedium
LFA1	Lymphocyte function associated antigen 1
log <sub>2</sub>	Logarithmus zur Basis 2
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MC38	MC38-OVA-iRFP-GFP
mg	Milligramm
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minute
ml	Milliliter
MLK	Milchprotein
mM	Millimolar
mm <sup>2</sup>	Quadratmillimeter
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
mRNP	Messenger Ribonukleoprotein
mTTP	murines TTP
n	Anzahl
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaCl	Natriumchlorid
NF90	Nuclear Factor 90
ng	Nanogramm
ns	Nicht signifikant
OVA	Ovalbumin
p	p-Wert (Signifikanzwert)
Panc	Panc02-OVA
PARN	Poly(A)-spezifische Ribonuklease
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Pikogramm
PIN1	<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase NIMA-interacting 1</i>
PTBP1	<i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBP	RNA-bindende Proteine
Rev	Rückwärts
RFP	Rot fluoreszierendes Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	<i>Standard error of the mean</i>
T11	T110299-OVA
Tam	Tamoxifen
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween20
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TIA-1	<i>T-cell intracellular antigen 1</i>
TIA-R	<i>TIA-1-related protein</i>

TIL	Tumordinfiltrierende Lymphozyten
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TTP	Tristetraprolin
TZR	T-Zellrezeptor
UTR	Untranslatierter Bereich
V	Volt
VEGF	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
WT	Wildtyp
XRN	5'-3' Exoribonuklease
YB-1	<i>Y box binding protein 1</i>

## Danksagung

Mein Dank gilt zunächst meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Sebastian Kobold für das Thema der Promotion und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe. Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. med. Sebastian Kobold und Prof. Dr. med. Stefan Endres für die Möglichkeit danken, meine Dissertation im Rahmen des Förderprogramms für Forschung und Lehre in der Abteilung für Klinische Pharmakologie abzulegen.

Mein besonderer Dank gilt außerdem Dr. Felicitas Stein für die hervorragende Betreuung, die Anleitung beim Erlernen von Methoden, die Diskussion der Ergebnisse und weiterführenden Versuche und die persönliche Unterstützung.

Dem gesamten Team der Klinischen Pharmakologie möchte ich für die Zusammenarbeit, die gemeinsame Zeit und die Unterstützung auf unterschiedlichste Art und Weise danken. Besonders hervorheben möchte ich M. Sc. Bruno Cadilha, der viel Zeit und Geduld in die Einführung zahlreicher Methoden und die Fehlersuche bei missglückten Experimenten gesteckt hat.

Prof. Dr. rer. nat. Vigo Heissmeyer und seiner Arbeitsgruppe möchte ich für die freundliche Bereitstellung der Roquin-*knock-out* Mäuse danken.

Abschließend danke ich meiner Familie und meinen Freunden für die private Unterstützung, insbesondere Josef Mallaun und Michael Hilby für das Korrekturlesen.