

Aus dem Institut für Virologie
der Medizinischen Fakultät der Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Polyomavirus-abgeleitete Virus-ähnliche Partikel
als potentielle Impfstoffe**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Lawatscheck
aus Berlin

Gutachter

1. Prof. Dr. med. D. H. Krüger
2. Prof. Dr. G. Pauli
3. Prof. Dr. H. Zeichhardt

Datum der Promotion: 18.09.2009

Inhaltsverzeichnis

1.	Zusammenfassung	1
2.	Einleitung	2
3.	Zielstellung	4
4.	Methoden	4
5.	Ergebnisse	5
6.	Diskussion	9
7.	Abkürzungsverzeichnis	13
8.	Literaturverzeichnis	14
9.	Lebenslauf	17
10.	Darstellung des eigenen Anteils an den Publikationen	18
11.	Eidesstattliche Versicherung	19
12.	Verzeichnis eigener Publikationen	20

Anmerkung: Die Publikationen, die der Dissertation zugrunde liegen, sind im Text durch hervorgehobene römische Ziffern markiert

1. Zusammenfassung

Hintergrund: Krebs-spezifische Immuntherapien stellen eine vielversprechende Möglichkeit zur Ergänzung der etablierten chirurgischen, pharmakologischen und radiologischen Krebstherapien dar. Eine spezielle Immuntherapie basiert auf der Induktion von Immunantworten gegen tumorassoziierte Autoantigene, die auf Tumorzellen überexprimiert werden wie z.B. carcinoembryonales Antigen (CEA) und Mucin 1 (MUC1). Aufgrund ihrer immunologischen Eigenschaften stellen Virus-ähnliche Partikel (VLP) interessante Träger zur Entwicklung neuer Impfstoffe dar. **Zielstellung:** Das Ziel der Untersuchungen bestand in der Herstellung und Charakterisierung von autologen Polyomavirus-VLP und chimären Hamsterpolyomavirus (HaPyV)-abgeleiteten VLP. **Methoden:** Unmodifizierte Hauptkapsidproteine VP1 von Nager- und Primatenpolyomaviren sowie VP1-Fusionsproteine von HaPyV wurden in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* hergestellt. Die VLP-Reinigung erfolgte durch Ultrazentrifugation im Cäsiumchlorid-Dichtegradienten. Zum Studium der Aufnahmewege in humane dendritische Zellen (hDC) wurden die VLP mit CFDA markiert und die Aufnahme bei Verwendung von spezifischen Hemmstoffen durch FACS-Analyse charakterisiert. Die Ausreifung von humanen dendritischen Zellen nach Applikation von VLP unterschiedlicher Polyomaviren wurde durch FACS-Analyse von Oberflächenmarkern und durch funktionelle Analysen bestimmt. Die humorale Immunität von chimären VLP mit CEA-Insertionen wurde durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen und nachfolgende Enzymimmunoassay(EIA)-Untersuchungen der Mäuseren charakterisiert. Die T-Zell-Immunität von VLP mit MUC1-Inserts wurde *in vitro* durch Messung der Frequenz von MUC1-spezifischen CD8+ T-Zellen im Tetramer- und Interferon- γ -assay geprüft. **Ergebnisse:** Mit Hilfe des Hefeexpressionssystems konnten die chimären HaPyV-VP1-abgeleiteten VLP mit einem oder zwei CEA- oder MUC1-Insertionen in hoher Ausbeute produziert werden. Durch Herstellung von VLP mit der 238 Aminosäuren langen Sequenz des grünfluoreszierenden Proteins konnte die hohe Insertionskapazität des HaPyV-VP1 bestätigt werden. Die VLP der verschiedenen Polyomaviren wurden alle durch hDC mittels Makropinozytose aufgenommen, während sich die Rezeptor-vermittelten Aufnahmewege unterschieden. Die Nager-Polyomavirus-abgeleiteten VLP induzierten eine Reifung von hDC und vermittelten in einem *in vitro*-Modell eine CD8+ T-Zell-Immunität. Adjuvantfreie Immunisierungen von Balb/c-Mäusen mit chimären CEA-tragenden VLP zeigten eine Abhängigkeit der Antikörperantwort vom Insertionsort im VP1. Für ausgewählte VLP konnte in der Maus eine langanhaltende Immunität für das CEA-Fremdinsert gezeigt werden. Monoklonale Antikörper gegen MUC1-Fremdinsertion von VLP erkannten das native Mucin 1 auf Tumorzellen. **Schlußfolgerung:** HaPyV-abgeleitete chimäre VLP stellen einen interessanten Ansatzpunkt für zukünftige Impfstoffe zur Tumorthherapie beim Menschen dar.

2. Einleitung

Virus-ähnliche Partikel (VLP) können durch heterologe Synthese von viralen Kapsid- oder Hüllproteinen hergestellt werden. Die VLP ähneln den nativen, infektiösen Ursprungsviren in ihren morphologischen und immunologischen Eigenschaften, sind aber wegen des Fehlens viraler Nukleinsäure nicht infektiös. Die hohe Immunogenität von VLP spiegelt sich in der Induktion einer starken Antikörper- und T-Zellantwort wider. VLP-basierte Antigene des Hepatitis B-Virus und von humanen Papillomviren werden bereits erfolgreich als rekombinante Impfstoffe beim Menschen eingesetzt. Die vorteilhaften immunologischen Eigenschaften von VLP können auch auf Fremdproteinsegmente übertragen werden, die auf der Oberfläche sogenannter chimärer VLP präsentiert werden. Diese chimären VLP können durch Herstellung von Fusionsproteinen aus dem VLP-Trägerprotein und einem Fremdprotein-Insert gewonnen werden (Übersichten in [20, 29]).

Polyomaviren bilden die eigenständige Familie *Polyomaviridae* [14]. Zu dieser Virusfamilie gehören humane Polyomaviren (JCPyV, BKPyV, KIPyV, WUPyV und MCPyV [9]), das Simian Virus 40 (SV-40), ein Affen-Polyomavirus, und verschiedene Nager-Polyomaviren, wie das Hamster-Polyomavirus (HaPyV) und das Maus-Polyomavirus (MPyV) [9, 14]. Bei den Polyomaviren handelt es sich um unbehüllte Viren, deren Kapside aus dem Hauptkapsidprotein VP1 und den Kapsidproteinen VP2 und VP3 aufgebaut sind. Das Kapsid der Polyomaviren von ca. 45 nm Durchmesser besitzt eine ikosaedrische Struktur mit einer T=7 Symmetrie und ist aus 72 pentamerisch angeordneten Untereinheiten aufgebaut. Im Inneren des Kapsids befindet sich die ringförmige, doppelsträngige virale DNS, die mit Wirtszell-Histonen assoziiert ist [14].

Bezogen auf den Zeitpunkt der Expression unterscheidet man im Genom der Polyomaviren eine „frühe“ und eine „späte“ Region. Die „frühe“ Region kodiert für die Tumor- (T-) Antigene Groß-T- und Klein-T-Antigen, die eine Rolle in der Virusreplikation und bei der malignen Transformation von Zellen spielen. Bei den Nagerpolyomaviren wurde zusätzlich ein drittes T-Antigen (Mittel-T-Antigen) gefunden. Die „späte“ Region kodiert die viralen Kapsidproteine, wobei VP1 und VP2/VP3 in unterschiedlichen offenen Leserahmen auf der „frühen“ mRNA kodiert werden.

Für eine Vielzahl von Polyomaviren konnte *in vitro* oder *in vivo* die Bildung von VLP nach Synthese der VP1-Proteine in Bakterien [22, 23] und in Insektenzellen mittels des Baculovirussystems [6, 18] gezeigt werden.

Bei dem von uns gewählten Modellprotein zur Herstellung chimärer VLP handelt es sich um das Hauptkapsidprotein VP1 des HaPyV. Die kodierende Region des VP1 enthält zwei in-frame befindliche Translationsstartkodons, die zur Synthese von zwei VP1-Derivaten von 388 und 384 Aminosäuren (AS) Länge führen können. Die AS-Sequenzierung der amino-terminalen Region des viralen VP1 führte zur Identifikation des zweiten Startkodons als Translationsstartpunkt. Vergleiche der AS-Sequenz von HaPyV-VP1 zu den VP1-Proteinen anderer Polyomaviren zeigte die stärkste Ähnlichkeit zum VP1 des Maus-Polyomavirus [27].

Das VP1 des HaPyV kann in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* und Insektenzellen synthetisiert werden und assembliert spontan zu autologen VLP [24, 30]. Die Assemblierung eines amino-terminal um vier AS verlängerten VP1 zeigte dessen Potential als Träger zur Herstellung chimärer VLP [24]. Epitopmapping-Studien und eine Vorhersage der dreidimensionalen Struktur des VP1 führten zur Ermittlung von potentiellen Insertionsorten für Fremdsequenzen im VP1-Träger [10, 26].

Bei Insertion eines Pentapeptids aus dem preS1-Protein des Hepatitis B-Virus in jeweils einen von vier vorhergesagten Insertionsorten des HaPyV-VP1 (Ort 1: zwischen AS 80 – 89; Ort 2: zwischen AS 222 – 225; Ort 3 zwischen AS 243 – 247; Ort 4 zwischen AS 288 - 295) konnte die Bildung chimärer VLP gezeigt werden. Die Immunisierung von C57/Bl6-Mäusen führte zur Induktion VP1- und Peptid-spezifischer Antikörper [10]. Bei Insertion von 45- und 120-AS langen Sequenzen eines Hantavirus-Nukleokapsidproteins konnte die effiziente Bildung von chimären VLP gezeigt werden, die auch bei Immunisierung ohne zusätzliches Adjuvans in Balb/c-Mäusen zur Induktion von Insert-spezifischen Antikörpern und T-Zellen führte [11].

Als Modellepitope für die hier beschriebenen Arbeiten wurden zwei 9 AS lange, HLA-A2-restringierte cytotoxische T-Zell-(CTL)-Epitope zweier Tumor-assoziiertes Antigene, des carcinoembryonalen Antigens (CEA; AS-Sequenz: YLSGADLNL) und des Mucin 1 (MUC1; AS-Sequenz: STAPPVHNV [4]), ausgewählt. Beide Antigene sind seit langem als Marker für Mammakarzinomzellen bekannt, CEA ist ebenfalls ein Marker für das Kolonkarzinom. Somit stellen diese Proteine potentielle Zielstrukturen für immuntherapeutische Ansätze dar. Die ausgewählten Peptide sind bekannte CTL-Epitope, wobei das CEA-Peptid an Position 6 modifiziert ist, wodurch eine noch stärkere CTL-Antwort induziert werden kann [31].

3. Zielstellung

Das Ziel der vorliegenden Dissertation bestand in der Beantwortung folgender Fragen:

- Wie groß ist die Insertionskapazität des HaPyV-VP1 für kurze Peptidsequenzen bei simultaner Insertion in mehrere Insertionsorte?
- Beeinflusst die Insertion eines zusätzlichen flexiblen Linkers die Assemblierungsfähigkeit von VP1-Fusionsproteinen?
- Beeinflussen der Insertionsort, die Anzahl der eingefügten Peptide oder ein zusätzlicher flexibler Linker die Immunogenität des inserierten Fremdpeptids?
- Können durch Immunisierung mit chimären VLP Tumorepitop-spezifische monoklonale Antikörper hergestellt werden, die das native Protein auf Tumorzellen erkennen?
- Werden die verschiedenen VLP durch unterschiedliche Mechanismen in die hDC aufgenommen?
- Vermitteln Polyomavirus-VLP die Reifung von hDC?
- Können autologe und chimäre HaPyV-VLP *in vitro* eine CD8+ T-Zell-Antwort induzieren?

4. Methoden

Die DNS-Isolierung, Agarose-Gel-Elektrophorese und die Klonierung und Transformation von *E. coli*- und *S. cerevisiae*-Zellen erfolgten nach Standardverfahren. Für eine detaillierte Beschreibung spezieller Methoden verweise ich auf die hier mit römischen Ziffern referierten Originalarbeiten:

Methode	Originalarbeit
Klonierung	I, II, III
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	I, II, III
Western Blot	I, II, III
Fluoreszenz-Mikroskopie	I
Enzymimmunoassay (EIA)	II
Immunisierung von Balb/c-Mäusen	II
Präparation dendritischer Zellen	I, III
Durchflußzytometrie (FACS)	I, III
Tetramerassay	III
IL-12-Zytokinsekretionsassay	I, III
Interferon γ -Assay	III

5. Ergebnisse

5.1 Wie groß ist die Insertionskapazität des HaPyV-VP1 für kurze Peptidsequenzen bei simultaner Insertion in mehrere Insertionsorte?

In einer vorhergehenden Arbeit sind Plasmide hergestellt worden, die es erlauben, Insertionen an 4 verschiedenen Orten der VP1-kodierenden Sequenz von HaPyV vorzunehmen [10]. Durch die Insertion einer Gly-Ser-Ser-Gly-kodierenden Linkersequenz an den vier genannten Orten des VP1 wurden neue Expressionsvektoren generiert, die den Einbau von Fremdsequenzen in einen BgIII-Ort ermöglichen, der an den 5'- und 3'-Enden von dem genannten Linker flankiert wird. Oligonukleotidduplexe, die jeweils für 9 AS-lange CTL-Epitope von CEA oder MUC1 kodieren, wurden in verschiedenen Kombinationen mit und ohne linkerkodierende Sequenz (L) an den genannten Insertionsorten in die VP1-kodierende Sequenz eingebracht. Auf diese Weise wurden Hefeexpressionskonstrukte hergestellt, die das jeweilige Epitop in einer Kopie jeweils mit und ohne Linker an den Orten 1 (z.B. VP1/1-CEA, VP1/1L-CEA) oder 4 (z.B. VP1/4-CEA, VP1/4L-CEA), simultan an beiden Orten (z.B. VP1/1,4-CEA, VP1/1,4L-CEA) oder simultan an allen 4 Orten mit Linker (z.B. VP1/1,2,3,4L-CEA) tragen (Gesamtübersicht: II, Abb.1; III, Abb 1 a & b). Die Expressionsanalyse der 14 verschiedenen VP1-Derivate erfolgte in der Hefe *S. cerevisiae*, Stamm AH22 Derivat 214 (a/α URA3/ura3 leu2/leu2 his4/his4). Nach der Reinigung der VP1-Proteine mittels Cäsiumchlorid (CsCl)-Dichtegradienten-Ultrazentrifugation, erfolgte eine Analyse der Fraktionen in einem 12,5%igen SDS-Polyacrylamidgel. Dabei wurden für alle Konstrukte VP1-Fusionsproteine der erwarteten Molekulargewichte gezeigt, die größer waren als das nicht modifizierte VP1-Protein (42 kDa). Allerdings wanderten die Proteine mit Linkerinsertion und vor allem die VP1-Proteine mit Vierfachinserts langsamer als erwartet, was wahrscheinlich auf posttranslationale Modifikationen der rekombinanten Proteine in den Hefezellen zurückzuführen ist. Bezüglich Ausbeute und Reinheit waren alle Fusionsproteine, mit Ausnahme der Proteine mit Vierfachinserts (VP1/1,2,3,4L-CEA; VP1/1,2,3,4L-MUC1), vergleichbar mit dem nichtmodifizierten VP1 (II, Abb. 2; III, Abb. 1c). Alle Fusionsproteine, außer solche mit Vierfachinserts, wurden in der CsCl-Fraktion gefunden, in der auch das nichtmodifizierte VP1 wanderte. Daraus ließ sich ein erster Hinweis auf die Assemblierungsfähigkeit der VP1-Fusionsproteine ableiten.

Bei einer Western Blot-Analyse unter Verwendung des VP1-spezifischen monoklonalen Antikörpers 6D11 und der MUC1-Peptid-spezifischen Antikörper 12B2 und 14G2 wurden alle MUC1-Fusionsproteine nachgewiesen (III). Alle VP1-Fusionsproteine mit CEA-Inserts reagierten mit den VP1-spezifischen monoklonalen Antikörpern 6D11 und 3D10 und mit einem polyklonalen Mausserum, das gegen natives carcinoembryonales Antigen hergestellt worden war (II).

Die elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigten für alle VP1-Fusionsproteine mit einzelnen Inserts in Positionen 1 und 4 und mit simultaner Insertion in beide Orte, unabhängig von einer zusätzlichen Linkerinsertion, die Bildung von VLP. Diese chimären VLP ähnelten den

von nichtmodifiziertem VP1 gebildeten Partikeln in Größe und Struktur (II, III). Im Gegensatz dazu konnte für die Fusionsproteine mit Vierfachinserts von MUC1 bzw. CEA keine VLP-Assemblierung gefunden werden. Die Untersuchungen bestätigten somit die große Insertionskapazität des HaPyV-VP1 für einzelne und simultane Fremdinsertionen, offenbarten aber auch bestimmte Limitationen.

5.2 Beeinflusst die Position, die Anzahl oder ein zusätzlicher flexibler Linker die Immunogenität des inserierten Fremdpeptids?

Die Adjuvant-freie Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit den chimären VLP mit einem oder zwei CEA-Inserts (II, Abb. 1) resultierte in der Bildung von VP1- und CEA-spezifischen Antikörpern. Bei den mit VP1/1,2,3,4L-CEA-immunisierten Mäusen konnten weder VP1- noch CEA-spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die höchsten Titer CEA-spezifischer Antikörper wurden bei Mäusen beobachtet, die mit VP1/1-CEA und VP1/1L-CEA immunisiert worden waren. Während der Einsatz des Linkers die Antikörperantwort auf die VP1-Proteine mit Einfachinsertionen nur wenig beeinflusste, resultierte seine Einbringung bei den Proteinen mit Doppelinserts in einer wesentlichen Erhöhung der Immunogenität gegen das CEA-Peptid. Die beobachteten Titer der anti-VP1-Antikörper waren in allen mit chimären VLP immunisierten Tieren im Vergleich zu denen mit Wildtyp-VP1 immunisierten Mäusen geringer.

Eine Testung der Langzeitimmunantwort wurde für die mit den immunogensten VLP immunisierten Tieren (VP1/1-CEA, VP1/1L-CEA, VP1/1,4L-CEA) 6 Monate nach der letzten Immunisierung durchgeführt. Alle Tiere zeigten noch CEA- und VP1-spezifische Immunantworten, wobei in den Seren der Tiere, die mit VP1/1-CEA immunisiert worden waren, die geringsten Reduktionen der Antikörpertiter nachgewiesen wurden. Zusammenfassend kann damit festgehalten werden, dass die Immunogenität des Fremdinserts vor allem von der Position des Inserts im VP1-Träger abhängig ist.

5.3 Können durch Immunisierung mit chimären VLP tumorepitop-spezifische monoklonale Antikörper hergestellt werden, die das native Protein auf Tumorzellen erkennen?

Nach der Immunisierung von Mäusen mit dem VP1/1,4L-MUC1-VLP unter Verwendung von Freund-Adjuvans konnte im EIA die Bildung von MUC1-spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden, wohingegen bei Immunisierung mit BSA konjugiertem MUC1-Peptid keine MUC1-spezifischen Antikörper induziert wurden (III, Abb. 2). Durch Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit VP1/1,4L-MUC1-VLP sind zwei MUC1-spezifische monoklonale Antikörper (12B2 und 14G2) generiert worden [32]. In der vorliegenden Arbeit färbten diese beiden monoklonalen Antikörper in der FACS-Analyse MUC1-positive Adenokarzinomlinien (MDA MB 231 und Ovar3), multiple Myelomzelllinien (CAG, RPMI-8226 und U 266) und Leukämiezelllinien (Kasumi-1 und AML 193) (III, Tab. 1). Somit sind die gegen MUC1 mit Hilfe chimärer HaPyV-abgeleiteter VLP hergestellten monoklonalen Antikörper in der Lage, das nativ gefaltete Mucin 1-Protein auf Tumorzellen zu erkennen.

5.4 Werden die verschiedenen VLP durch unterschiedliche Mechanismen in die hDC aufgenommen?

Um die Aufnahme verschiedener autologer und chimärer VLP unterschiedlicher Polyomaviren in hDC per FACS-Analyse untersuchen zu können, wurden die entsprechenden VLP mit CFDA markiert. In kompetitiven Experimenten zur Aufnahme mit CFDA-markierten und nicht-markierten VLP konnte gezeigt werden, dass die CFDA-markierten VLP den authentischen VLP sehr ähnlich sind und somit für die Aufnahmeexperimente unter Verwendung von Hemmstoffen repräsentative Aussagen erlauben. Mit CFDA markierte HaPyV-VP1-VLP zeigten in der Immunfluoreszenzmikroskopie- und FACS-Analyse die höchste Fluoreszenzintensität in hDC, gefolgt von CFDA-markierten VLP von MPyV, BKPyV, JCPyV und SV40 (I, Abb.5c). Alternativ zur CFDA-Markierung wurden durch Einbringung der Sequenz des grünfluoreszierenden Proteins an Insertionsort 4 des HaPyV-VP1 chimäre VLP hergestellt. Bei Aufnahmestudien unter Verwendung von hDC wurde nach 16 Stunden Inkubation nur eine geringe intrazelluläre Fluoreszenz nachgewiesen, während nach 24-stündiger Inkubation die Aufnahme des Großteils der chimären Fusionproteine in die Zellen beobachtet wurde.

Die Testung des Aufnahmeweges unter Verwendung des Makropinozytosehemmers Cytochalasin D zeigte eine deutliche Reduzierung der Aufnahme aller getesteten Polyomavirus-abgeleiteten VLP. Chlorpromazin, ein Hemmer der Clathrin-vermittelten Aufnahme, reduzierte nur die Aufnahme von VLP der humanen Polyomaviren JCPyV und BKPyV und des MPyV. Nystatin, ein Hemmer der Caveolae-vermittelten Aufnahme, bewirkte hingegen eine Hemmung der Aufnahme von autologen VLP des SV-40 und der Nager-Polyomaviren MPyV und HaPyV sowie chimärer HaPyV-VP1/1,4L-MUC1 VLP (III, Abb. 4). Die Kombination der genannten Hemmstoffe zeigte, daß BKPyV- und JCPyV-abgeleitete VLP durch Makropinozytose und Clathrin vermittelt, SV-40-, MPyV- und HaPyV-abgeleitete VLP dagegen durch Makropinozytose und Caveolae vermittelt aufgenommen werden.

Der quantitative Vergleich der Aufnahme von chimären HaPyV-VP1-VLP mit MUC1-Insert und den entsprechenden autologen VLP ergab ähnliche Ergebnisse (III, Abb 4c). Die großen Ähnlichkeiten zwischen autologen und chimären HaPyV-VLP zeigten sich auch bei kompetitiven Aufnahmeexperimenten unter Verwendung von Cytochalasin D, Nystatin und Chlorpromazin. Sowohl autologe als auch chimäre VLP wurden in ihrer Aufnahme in hDC durch Cytochalasin D und Nystatin gehemmt, nicht jedoch durch Chlorpromazin (III, Abb. 4b). Um weitere Aussagen zur Rezeptornutzung der VLP der verschiedenen Polyomaviren machen zu können, wurde ein Hämagglutinationsassay unter Verwendung von Meerschweinchenerythrozythen durchgeführt. Bei diesem Experiment zeigten MPyV-, BKPyV- und JCPyV-abgeleitete VLP eine Hämagglutination, während bei Verwendung von SV40- und HaPyV-VLP keine Hämagglutination beobachtet wurde (I, Seite 255). Diese Studien offenbarten Unterschiede im Aufnahmeweg für die verschiedenen Polyomaviren. Diese Befunde und die beobachteten Unterschiede in der Hämagglutinationsaktivität der Polyomavirus-abgeleiteten VLP weisen auf

die Erkennung der VLP und somit wahrscheinlich der Viren durch unterschiedliche zelluläre Rezeptoren und Aufnahmemechanismen hin.

5.5 Vermitteln autologe und chimäre Polyomavirus-VLP die Reifung von hDC ?

Nach 48-stündiger Inkubation von hDC mit den VLP der Nagerpolyomaviren HaPyV und MPyV, nicht aber mit denen der Primatenpolyomaviren, konnte eine starke Erhöhung der Oberflächenreifungsmarker CD83, CD80, MHC I und MHC II beobachtet werden. Dabei fiel die gemessene Höhe der Ausreifungsmarker für HaPyV-VLP höher aus als für MPyV-VLP (I). Die Messung des Grades der Aufnahmereduzierung der Makropinozytose von Lucifer Yellow und rezeptorvermittelter Endozytose von FITC-Dextran, stellt einen funktionellen Test der Ausreifung von hDC dar. Nach Inkubation mit den VLP von MPyV und HaPyV, nicht aber mit denen von JCPyV, BKPyV und SV40, zeigten hDC eine deutlich verringerte Aufnahme von FITC-Dextran und eine geringe Reduktion der Aufnahme von Lucifer Yellow.

Unter den autologen VLP zeigten die mit HaPyV-VLP inkubierten hDC eine stärkere IL-12-Sekretion als die mit MPyV-VLP inkubierten, während VLP auf der Basis von SV40, BKPyV und JCPyV keine IL-12 Sekretion auslösten (I, Abb. 2). Chimäre HaPyV-VP1/1,4L-MUC1 VLP induzierten ebenfalls die Ausreifung von hDC. Die Reifung konnte anhand der Expression von Oberflächenmarkern (CD83, CD80, CD86, HLA Abc und HLA DRDQ) in der Durchflußzytometrie und funktionell durch Reduktion ihrer phagozytischen Aktivität und Erhöhung der IL-12-Sekretion gezeigt werden (III, Abb 6 a-c). Zusammenfassend ist damit festzuhalten, dass Polyomavirus-abgeleitete VLP, insbesondere solche von HaPyV und MPyV, in der Lage sind, die Reifung von hDC zu induzieren.

5.6 Können autologe und chimäre HaPyV-VLP *in vitro* CD8+ T-Zellen induzieren?

Um die Induktion von CD8+T-Zellen zu messen, wurden hDC nach Inkubation mit den verschiedenen autologen VLP zweimalig mit HLA-A2 restringierten PBL kokultiviert und vor der Messung mit den entsprechenden VLP restimuliert. Dabei wurde die stärkste Zunahme IFN- γ sezernierender CD8+-Zellen für HaPyV-VLP, gefolgt von MPyV-VLP, gepulsten hDC gemessen (I, Abb. 3). Durch den Vergleich aller sieben HaPyV-VP1-Fusionsproteine mit MUC1-Insertionen durch Inkubation mit hDC, anschließender hDC-PBL-Kokultivierung und Messung der Frequenz MUC1-spezifischer T-Zellinduktion im Tetramerassay, wurde das Konstrukt VP1/1,4L-MUC1 für alle weiteren Versuche ausgewählt (III, Abb. 3). Im Gegensatz zu unbehandelten hDC und hDC, die mit autologen HaPyV-VP1-VLP und gereinigten mock-Hefezellysaten behandelt worden sind, zeigten VP1/1,4L-MUC1 gepulste hDC nach Kokultivierung mit PBL und Restimulation mit MUC1-Peptid eine erhöhte Frequenz MUC1-spezifischer CD8+-T-Zellen im Tetramerassay und eine erhöhte Anzahl IFN- γ sezernierender CD8+-T-Zellen. (III, Abb.3). Somit zeigten diese Untersuchungen, dass Polyomavirus-abgeleitete VLP Epitop-spezifische IFN- γ sezernierende CD8+-T-Zellen induzieren können.

6. Diskussion

6.1 HaPyV-VP1 erlaubt die Bildung chimärer VLP mit Insertion mehrerer Peptidsequenzen

HaPyV-VP1 toleriert die Einbringung jeweils einer 9 AS langen Fremdsequenz an den Orten 1 oder 4 mit und ohne den 8 AS langen Linker (II, III) und sogar einer 238 AS langen Sequenz des grünfluoreszierenden Proteins in Ort 4 (I), ohne wesentliche Unterschiede in der Ausbeute und Assemblierung im Hefeexpressionssystem zu nativem VP1 zu zeigen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit vorhergehenden Arbeiten, in denen 5, 45 und 120 AS lange Sequenzen jeweils an Ort 1 oder 4 des VP1 eingebracht wurden [10, 11]. Ähnliche Ergebnisse konnten bei Insertion einer vollständigen Dihydrofolatreduktase in MPyV-VP1 erzielt werden [13].

Die Herstellung von chimären VLP nach simultaner Einbringung von Nonamer-Peptiden mit und ohne Linker in die Positionen 1 und 4 des VP1 (II, III) zeigt die große Kapazität des HaPyV-VP1 für Fremdinsertionen. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit vorangegangenen Veröffentlichungen, in denen 5 AS lange Peptide simultan in die Orte 1 und 2 bzw. 1 und 3 von HaPyV-VP1 inseriert wurden, ohne die Partikelassemblierung zu stören [10].

Im Gegensatz zu VP1-Derivaten mit Zweifachinserts an den Positionen 1 und 4, assemblierten die Partikel mit 4 gleichzeitigen Linker-flankierten Insertionen in keinem Fall (II, III). Diese Beobachtungen zeigen die Limitationen der Insertionskapazität des HaPyV-VP1-Trägersystems auf. In einer früher veröffentlichten Arbeit war die Nichtassemblierung von HaPyV-VP1 für Insertionen von 45 und 120 AS langen Sequenzen an den Positionen 2 und 3 beschrieben worden [11].

6.2 Die Position des Fremdinserts im VP1, seine Kopienzahl und die Einfügung eines zusätzlichen flexiblen Linkers beeinflussen dessen Immunogenität

Für die Assemblierungsfähigkeit des VP1 und die Immunogenität eines eingefügten Fremdepitops sind seine Anzahl und Länge, seine Position und die angrenzende Region innerhalb des Trägerpartikels bestimmend. Die vorliegenden Arbeiten zeigen, dass die Position des Inserts zusammen mit der erfolgreichen Assemblierung zu VLP ausschlaggebend für die Immunogenität des Fusionsproteins sind (II). So konnte die stärkste CEA-spezifische Reaktion *in vivo* bei den Fusionsproteinen beobachtet werden, die CEA-Insertionen an Ort 1 trugen. Die Immunogenität von VLP mit Insertionen an Position 1 unterschied sich zwischen Linker-tragenden und Linker-freien-VLP kaum. Dieses Ergebnis belegte die hohe Flexibilität und Oberflächenexposition dieses Ortes und unterstrich seine hervorragende Eignung für die Insertion von Fremdsequenzen [10, 11]. Im Gegensatz dazu zeigte die Verwendung des Linkers starken Einfluß auf die Immunogenität der Konstrukte mit mehreren Insertionen (VP1/1,4L-CEA aus II und VP1/1,4L-MUC1 aus III) und bestätigte die Annahme, daß die Verwendung eines Linkers zur besseren Integration der Epitope in das Ausgangsprotein beiträgt und die VP1-Struktur aufrecht erhält.

VLP, die an allen 4 Orten Inserts tragen (VP1/1,2,3,4L-CEA und VP1/1,2,3,4L-MUC1), erlaubten keine Assemblierung zu VLP und zeigten, trotz der hohen Wiederholungszahl des jeweiligen Peptids, keine CEA-spezifischen Antikörperantworten (II) oder signifikante MUC1-spezifische T-Zellfrequenzen (III). Diese Ergebnisse bestätigten, dass die Immunogenität eines VP1-Fusionsproteins durch die intakte VLP-Struktur und nicht durch die Dichte der Epitope bestimmt wird.

6.3 Gegen die MUC1-Fremdinsertion von VLP gerichtete monoklonale Antikörper erkennen das native Mucin 1 auf Tumorzellen

Die Immunisierung von Balb/c-Mäusen mit VP1/1,4L-MUC VLP führte zur Induktion einer starken MUC1-spezifischen Antikörperantwort. Im Gegensatz dazu konnte bei Immunisierung von Mäusen mit BSA-komplexiertem MUC1-Peptid keine MUC-spezifische Antikörperantwort nachgewiesen werden (III). Diese Ergebnisse bestätigten die immunstimulierende Wirkung von VLP, die bereits für andere VLP-Träger, wie Hepatitis B Virus-Core, beschrieben worden ist [16]. In weiterführenden Experimenten konnten MUC1-spezifische monoklonale Antikörper hergestellt werden. Diese monoklonalen Antikörper reagierten mit dem für die Herstellung verwendeten Antigen VP1/1,4L-MUC-1 VLP, und dem MUC1-Peptid [32]. Diese Untersuchungen zeigten, dass Polyomavirus-abgeleitete VLP zur gezielten Herstellung von monoklonalen Antikörpern eingesetzt werden können. In den hier beschriebenen Untersuchungen reagierten diese MUC1-spezifischen monoklonalen Antikörper mit Tumorzelllinien, die Mucin 1 exprimieren. Somit scheint das verwendete VLP-Trägersystem zur Herstellung von monoklonalen Antikörpern geeignet zu sein, die mit nativ gefaltetem Protein reaktiv sind.

6.4 Die Aufnahmewege von VLP auf der Basis verschiedener Polyomaviren unterscheiden sich

Die Virusaufnahme in die Zelle erfolgt durch Makropinozytose oder Endozytose, die entweder Caveolae- oder Clathrin-abhängig oder Clathrin-Caveolae-unabhängig ist. Die Aufnahme in hDC wird durch Makropinozytose vermittelt (Review [25]). In Übereinstimmung damit zeigten unsere Untersuchungen, dass alle VLP, autologe und chimäre, durch Makropinozytose aufgenommen werden. Darüberhinaus zeigten die Aufnahmehemmversuche in hDC eine Clathrin-abhängige Aufnahme für JCPyV- und BKPyV-VLP und eine durch Caveolae vermittelte Aufnahme von VLP von HaPyV, MPyV und SV-40 (III). Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit Daten zu Aufnahmeuntersuchungen mit den infektiösen Viren JCPyV und SV-40 [19, 28], wobei sich der Aufnahmeweg von MPyV mehrdeutig darstellt [12, 21].

Die chimären HaPyV-abgeleiteten VP1/1,4L-MUC1 VLP (III) und VP1/4-GFP VLP (I) zeigten ein den autologen HaPyV-VP1-VLP sehr ähnliches Aufnahmeverhalten, was auf die weitgehende strukturelle Übereinstimmung in der Oberflächenbeschaffenheit der chimären zu den autologen VLP hindeutet. In Übereinstimmung mit Daten zu den entsprechenden infektiösen Viruspartikeln [2, 15] konnten wir für die VLP von JCPyV, BKPyV und MPyV eine Agglutination von

Meerschweinchen-Erythrozythen feststellen, während HaPyV- und SV40-abgeleitete VLP keine Agglutination herbeiführten. Diese Ergebnisse, wie auch die Befunde zur Aufnahmehemmung in hDC, deuten auf Unterschiede bei der Rezeptorerkennung der verschiedenen Polyomaviren und der von ihnen abgeleiteten VLP hin (I).

6.5 Autologe und chimäre Polyomavirus-VLP vermitteln die Reifung von hDC

In den vorliegenden Arbeiten wurde bei Verwendung von VLP auf der Basis von HaPyV und MPyV das stärkste Ausreifungssignal bei Inkubation mit hDC beobachtet, während die Reifung von hDC bei Inkubation mit VLP von Primatenpolyomaviren deutlich geringer war (I). Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu Daten vorangegangener Arbeiten, bei denen die Inkubation von hDC mit in Insektenzellen erzeugten MPyV-VP1 und MPyV-VP1/t-VP3-eGFP VLP, trotz Induktion einer IL-12-Sekretion, keine Erhöhung der Reifungsmarker hervorrief [3], aber in Übereinstimmung mit einer Veröffentlichung, bei der nach Impfung transgener C57BL/6 Mäuse mit *E. coli*-exprimierten MPyV-VP1-VLP die Reifung dendritischer Zellen und die Induktion einer IL-12-Sekretion festgestellt wurde [1]. Bei Baculovirus-exprimierten JCPyV- und BKPyV-abgeleiteten VLP konnte keine phänotypische Reifung von murinen dendritischen Zellen gemessen werden, obwohl VLP-Konzentrationen eingesetzt wurden, die 100 Mal höher waren, als die von uns zur Stimulation von hDC mit Hefe-exprimierten VLP eingesetzten [17]. Die Diskrepanz in den Befunden könnte in den Unterschieden der verwendeten Konstrukte, Expressionssysteme und anderer experimenteller Details begründet liegen. Chimäre HaPyV-VP1-1,4L-MUC1 VLP zeigten in unseren Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zum Ausreifungspotenzial autologer HaPyV-VP1 VLP (III).

6.6 Autologe und chimäre HaPyV-VLP induzieren *in vitro* eine CD8+ T-Zell-Antwort

In den vorliegenden Arbeiten konnte für die mit HaPyV-VP1-VLP inkubierten hDC eine signifikante Erhöhung der VP1-spezifischen CD8+-T-Zellfrequenz im Interferon- γ -Assay ermittelt werden, gefolgt von hDC, welche mit MPyV-VLP gepulst worden waren, wohingegen VLP auf der Basis von JCPyV, BKPyV und SV40 sehr geringe T-Zell-Antworten in hDC bewirkten (I, Abb. 3). Dies steht in Übereinstimmung mit vorangegangenen Arbeiten, bei denen MPyV-Infektionen in murinen dendritischen Zellen effektive CD8+-T-Zell-Antworten hervorriefen [1, 7, 8]. In Interferon- γ - und Tetramerassays wurde das chimäre HaPyV-VP1-1,4L-MUC1 als Konstrukt mit der größten immunstimulatorischen Potenz im Vergleich mit den chimären VLP mit jeweils nur einem MUC1-Insert identifiziert. Die Erhöhung der Frequenz Interferon- γ sezernierender Zellen mit der Dichteerhöhung des Epitops steht dabei in Übereinstimmung mit einer vorangegangenen Studie mit TNF- α konjugierten Papillomavirus-abgeleiteten VLP, bei denen maximal 1,5 Epitope pro L1-Kapsidproteinmolekül verwandt wurden [5].

6.7 Ausblick

HaPyV-abgeleitete VLP stellen potente Antigen-träger zur Entwicklung von adjuvantfreien Impfstoffen gegen tumorassoziierte Antigene für eine mögliche Krebszusatztherapie beim Menschen dar. Dabei sind im weiteren die mögliche Identifizierung metastasieinitiierender Zellen nach Chemotherapie durch die gewonnenen Antikörper und ein Monitoring der gewünschten Reduktion von Tumormasse durch cytotoxische T-Zellen im Tiermodell interessant. Weiterhin stellen VLP ein vielversprechendes System zur gezielten Gewinnung monoklonaler Antikörper gegen schwach immunogene Peptidepitope zum Einsatz in Diagnostik und Grundlagenforschung dar.

7. Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäure
BKPyV	BK-Polyomavirus, humanes Polyomavirus
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CEA	CAP1-6D-Nonamer-Peptid des carcinoembryonalen Antigens
CFDA	5(6)-Carboxyfluorescein-Diacetat-Succinimidylester
CsCl	Cäsium-Chlorid
CTL	cytotoxische T-Lymphozyten
DNS	Desoxyribonukleinsäure
EIA	Enzymimmunoassay
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellanalyse, Durchflußzytometrie
GFP	grünfluoreszierendes Protein
HPV	humanes Papillomvirus
HaPyV	Hamsterpolyomavirus
HBV	Hepatitis B-Virus
hDC	humane dendritische Zellen (<i>human dendritic cells</i>)
HLA	Leukozytenhistokompatibilitätsantigen (<i>human leucocyte antigen</i>)
IFN	Interferon
JCPyV	JC-Polyomavirus, humanes Polyomavirus
KIPyV	KI-Polyomavirus, humanes Polyomavirus
MCPyV	Merkel Zell-Polyomavirus, humanes Polyomavirus
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (<i>major histocompatibility complex</i>)
MPyV	Maus-Polyomavirus
MUC1	Mucin 1-Nonamer-Peptid
PBL	Periphere Blutlymphozyten
SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
SV-40	Simian Virus-40, Polyomavirus des Rhesusaffen
VLP	Virus-ähnliche Partikel (<i>virus-like particle</i>)
VP1	Virusprotein 1, Hauptkapsidprotein der Polyomaviren
VP2	Virusprotein 2 der Polyomaviren
VP3	Virusprotein 3 der Polyomaviren
WUPyV	WU-Polyomavirus, humanes Polyomavirus

8. Literaturverzeichnis

1. Bickert T, Wohlleben G, Brinkman M, Trujillo-Vargas CM, Ruehland C, Reiser CO, Hess J and Erb KJ: Murine polyomavirus-like particles induce maturation of bone marrow-derived dendritic cells and proliferation of T cells. *Med Microbiol Immunol* 2007; 196:31-39.
2. Bolen JB and Consigli RA: Differential adsorption of polyoma virions and capsids to mouse kidney cells and guinea pig erythrocytes. *J Virol* 1979; 32:679-683.
3. Boura E, Liebl D, Spisek R, Fric J, Marek M, Stokrova J, Holan V and Forstova J: Polyomavirus EGFP-pseudocapsids: analysis of model particles for introduction of proteins and peptides into mammalian cells. *FEBS Lett* 2005; 579:6549-6558.
4. Brossart P, Heinrich KS, Stuhler G, Behnke L, Reichardt VL, Stevanovic S, Muhm A, Rammensee HG, Kanz L and Brugger W: Identification of HLA-A2-restricted T-cell epitopes derived from the MUC1 tumor antigen for broadly applicable vaccine therapies. *Blood* 1999; 93:4309-4317.
5. Chackerian B, Lenz P, Lowy DR and Schiller JT: Determinants of autoantibody induction by conjugated papillomavirus virus-like particles. *J Immunol* 2002; 169:6120-6126.
6. Chang D, Liou ZM, Ou WC, Wang KZ, Wang M, Fung CY and Tsai RT: Production of the antigen and the antibody of the JC virus major capsid protein VP1. *J Virol Methods* 1996; 59:177-187.
7. Drake DR, Moser JM, Hadley A, Altman JD, Maliszewski C, Butz E and Lukacher AE: Polyomavirus-infected dendritic cells induce antiviral CD8(+) T lymphocytes. *J Virol* 2000; 74:4093-4101.
8. Drake DR, Shawver ML, Hadley A, Butz E, Maliszewski C and Lukacher AE: Induction of polyomavirus-specific CD8(+) T lymphocytes by distinct dendritic cell subpopulations. *J Virol* 2001; 75:544-547.
9. Feng H, Shuda M, Chang Y and Moore PS: Clonal integration of a polyomavirus in human Merkel cell carcinoma. *Science* 2008; 319:1096-1100.
10. Gedvilaite A, Frommel C, Sasnauskas K, Micheel B, Ozel M, Behrsing O, Staniulis J, Jandrig B, Scherneck S and Ulrich R: Formation of immunogenic virus-like particles by inserting epitopes into surface-exposed regions of hamster polyomavirus major capsid protein. *Virology* 2000; 273:21-35.
11. Gedvilaite A, Zvirbliene A, Staniulis J, Sasnauskas K, Kruger DH and Ulrich R: Segments of Puumala hantavirus nucleocapsid protein inserted into chimeric polyomavirus-derived virus-like particles induce a strong immune response in mice. *Viral Immunol* 2004; 17:51-68.
12. Gilbert JM, Goldberg IG and Benjamin TL: Cell penetration and trafficking of polyomavirus. *J Virol* 2003; 77:2615-2622.
13. Gleiter S, Stubenrauch K and Lilie H: Changing the surface of a virus shell fusion of an enzyme to polyoma VP1. *Protein Sci* 1999; 8:2562-2569.

14. Hou J, Jensen PJ, Major EO, zur Hausen HJ, Almeida J, van der Noordaa D, Walker D, Lowy D, Bernard U, Butel JS, Cheng D, Frisque RJ and Nagashima K: Polyomaviridae. In: C.M. Fauquet, M.A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger and L.A. Ball (eds). Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, Amsterdam, London, New York, 2005, pp. 231-238.
15. Knowles WA, Pipkin P, Andrews N, Vyse A, Minor P, Brown DW and Miller E: Population-based study of antibody to the human polyomaviruses BKV and JCV and the simian polyomavirus SV40. *J Med Virol* 2003; 71:115-123.
16. Koletzki D, Biel SS, Meisel H, Nugel E, Gelderblom HR, Kruger DH and Ulrich R: HBV core particles allow the insertion and surface exposure of the entire potentially protective region of Puumala hantavirus nucleocapsid protein. *Biol Chem* 1999; 380:325-333.
17. Lenz P, Day PM, Pang YY, Frye SA, Jensen PN, Lowy DR and Schiller JT: Papillomavirus-like particles induce acute activation of dendritic cells. *J Immunol* 2001; 166:5346-5355.
18. Montross L, Watkins S, Moreland RB, Mamon H, Caspar DL and Garcea RL: Nuclear assembly of polyomavirus capsids in insect cells expressing the major capsid protein VP1. *J Virol* 1991; 65:4991-4998.
19. Norkin LC, Anderson HA, Wolfrom SA and Oppenheim A: Caveolar endocytosis of simian virus 40 is followed by brefeldin A-sensitive transport to the endoplasmic reticulum, where the virus disassembles. *J Virol* 2002; 76:5156-5166.
20. Pumpens P, Ulrich R, Sasnauskas K, Kazaks A, Ose V and Grens E: Construction of Novel Vaccines on the Basis of Virus-Like Particles: Hepatitis B Virus Proteins as Vaccine Carriers. In: Y.E. Khudyakov (ed). *Medicinal Protein Engineering*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2008 in press.
21. Richterova Z, Liebl D, Horak M, Palkova Z, Stokrova J, Hozak P, Korb J and Forstova J: Caveolae are involved in the trafficking of mouse polyomavirus virions and artificial VP1 pseudocapsids toward cell nuclei. *J Virol* 2001; 75:10880-10891.
22. Rodgers RE, Chang D, Cai X and Consigli RA: Purification of recombinant budgerigar fledgling disease virus VP1 capsid protein and its ability for in vitro capsid assembly. *J Virol* 1994; 68:3386-3390.
23. Salunke DM, Caspar DL and Garcea RL: Self-assembly of purified polyomavirus capsid protein VP1. *Cell* 1986; 46:895-904.
24. Sasnauskas K, Buzaitė O, Vogel F, Jandrig B, Razanskas R, Staniulis J, Scherneck S, Kruger DH and Ulrich R: Yeast cells allow high-level expression and formation of polyomavirus-like particles. *Biol Chem* 1999; 380:381-386.
25. Sieczkarski SB and Whittaker GR: Dissecting virus entry via endocytosis. *J Gen Virol* 2002; 83:1535-1545.
26. Siray H, Frommel C, Voronkova T, Hahn S, Arnold W, Schneider-Mergener J, Scherneck S and Ulrich R: An immunodominant, cross-reactive B-cell epitope region is located at the C-terminal part of the hamster polyomavirus major capsid protein VP1. *Viral Immunol* 2000; 13:533-545.

27. Siray H, Ozel M, Jandrig B, Voronkova T, Jia W, Zocher R, Arnold W, Scherneck S, Kruger DH and Ulrich R: Capsid protein-encoding genes of hamster polyomavirus and properties of the viral capsid. *Virus Genes* 1998; 18:39-47.
28. Suzuki S, Sawa H, Komagome R, Orba Y, Yamada M, Okada Y, Ishida Y, Nishihara H, Tanaka S and Nagashima K: Broad distribution of the JC virus receptor contrasts with a marked cellular restriction of virus replication. *Virology* 2001; 286:100-112.
29. Ulrich R, Gedvilaite A, Voronkova T, Kazaks A, Johne R and Sasnauskas K: Polyomavirus-Derived Virus-Like Particles. In: Y.E. Khudyakov (ed). *Medicinal Protein Engineering*. CRC Press, Boca Raton, Florida, 2008 in press.
30. Voronkova T, Kazaks A, Ose V, Oezel M, Scherneck S, Pumpens P and Ulrich R: Hamster polyomavirus-derived virus-like particles are able to transfer in vitro encapsidated plasmid DNA to mammalian cells. *Virus Genes* 2007; 34:303 – 314
31. Zaremba S, Barzaga E, Zhu M, Soares N, Tsang KY and Schlom J: Identification of an enhancer agonist cytotoxic T lymphocyte peptide from human carcinoembryonic antigen. *Cancer Res* 1997; 57:4570-4577.
32. Zvirbliene A, Samonskyte L, Gedvilaite A, Voronkova T, Ulrich R and Sasnauskas K: Generation of monoclonal antibodies of desired specificity using chimeric polyomavirus-derived virus-like particles. *J Immunol Methods* 2006; 311:57-70.

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

10. Darstellung des eigenen Anteils an den Publikationen

Hiermit erkläre ich, dass die beigefügten Publikationen maßgeblich von mir angefertigt worden sind. Mein eigener prozentualer Anteil an den im Anhang aufgeführten Publikationen stellt sich wie folgt dar:

Publikation	I	II	III
Ideen, Versuchsplanung	40	70	60
Versuchsdurchführung	40	90	60
Auswertung der Ergebnisse	40	85	60
Erstellung des Manuskripts	30	80	60

11. Eidesstattliche Versicherung

Ich, Robert Lawatscheck, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationschrift mit dem Titel

„Polyomavirus-abgeleitete Virus-ähnliche Partikel als potentielle Impfstoffe“

selbst und ohne die Hilfe Dritter verfasst, keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe und weder früher noch gleichzeitig ein Promotionsverfahren durchgeführt oder angemeldet wurde.

Berlin, den 01.08.2008

Robert Lawatscheck

12. Verzeichnis eigener Publikationen

In der Dissertation zusammengefasste Publikationen:

- I Gedvilaite A, Dorn DC, Sasnauskas K, Pecher G, Bulavaite A, Lawatscheck R, Staniulis J, Dalianis T, Ramqvist T, Schönrich G, Raftery MJ and Ulrich R: Virus-like particles derived from major capsid protein VP1 of different polyomaviruses differ in their ability to induce maturation in human dendritic cells. *Virology* 2006; 354:252-260.
- II Lawatscheck R, Aleksaite E, Schenk JA, Micheel B, Jandrig B, Holland G, Sasnauskas K, Gedvilaite A and Ulrich RG: Chimeric polyomavirus-derived virus-like particles: the immunogenicity of an inserted peptide applied without adjuvant to mice depends on its insertion site and its flanking linker sequence. *Viral Immunol* 2007; 20:453-460.
- III Dorn DC, Lawatscheck R, Zvirbliene A, Aleksaite E, Pecher G, Sasnauskas K, Özel M, Raftery M, Schönrich G, Ulrich RG and Gedvilaite A: Cellular and humoral immunogenicity of hamster polyomavirus-derived virus-like particles harboring a mucin 1 cytotoxic T-cell epitope. *Viral Immunol* 2008; 21:12-27.

Impact Factors 2006 laut <http://admin-apps.isiknowledge.com/JCR/JCR>
Journal Citation Reports, Thomson Reuters, 3 Times Square; New York, NY 10036

Journal: *Virology*
Impact Factor: 3.525

Journal: *Viral Immunology*
Impact Factor: 2.133