

Ph.D. értekezés tézisei

**dsRNA-specifikus monoklonális ellenanyagok expressziója
transzgenikus növényekben**

Készítette: Morgun Bogdan

Témavezető: Dr. Lukács Noémi

Készült: MTA Szegedi Biológiai Központ,
Növénybiológiai Intézet

Növényélettan és Növényi Biokémia Tanszék
Budapesti Corvinus Egyetem

Természettudományi Kar
Szeged Tudományegyetem

2005.

Bevezetés

Biológiai jelentőségük és sokoldalú alkalmazhatóságuk okán az ellenanyagok már hosszú ideje intenzív tudományos vizsgálatok tárgyát képezik, így napjainkig gazdag ismeretanyag gyűlt össze szekvenciájukról, szerkezetükről, affinitásukról és transzgenikus kifejeződésükről. Mindmáig nem létezik azonban egy általánosan alkalmazható stratégia, melynek követésével a növényi illetve állati szervezetek tetszőleges sejtalkotóiban aktív antitesteket lehetne kifejezni. Biológiai szempontból különösen érdekes, ellenanyag expresszió szempontjából viszont különösen problematikus a citoplazmában történő kifejezés.

Lukács Noémi csoportjában végzett korábbi kutatások során számos RNS-specifikus egér monoklonális antitestet állítottak elő, melyek közül a benyújtott disszertáció keretében négy ellenanyag, a J2, K1, K2 és P6 génszektájával ill. növényi expressziójával foglalkoztam. A J2, K1 és K2 antitestek szigorúan duplaszálú RNS- (dsRNS)-specifikusak, azaz a dsRNS-ekhez azok nukleotid-összetételétől és szekvenciájától függetlenül kötődnek, de nem reagálnak DNS-sel, RNS-DNS hibridekkel és egyszálú RNS-ekkel (Schönborn, 1991). A P6 antitest az előzőektől abban különbözik, hogy nemcsak dsRNS-ekhez, hanem viroid-, riboszómális- és más ssRNS-ekhez is kötődik. Köztudott, hogy a dsRNS-ek számos alapvető biológiai folyamatban fontos szerepet játszanak, így az egyszálú-RNS vírusok replikációjában ill. a dsRNS-közvetített géncsökkentés folyamatában is. Mivel a növényi vírusok több mint 90 %-a RNS-vírus, a vírusreplikáció során szükségképp keletkező dsRNS-ek olyan potenciális célmolekuláknak tekinthetők, amelyeken keresztül a legtöbb növényi vírus multiplikációja befolyásolható. A növények antivirális védekezési mechanizmusában fontos szerepet játszó géncsökkentés is ezen célszerkezeten keresztül történik.

Feltételeztük, hogy ha sikerül aktív dsRNS-specifikus ellenanyagokat kifejeznünk a megfelelő sejt-kompartimentumban, akkor az antitestek befolyásolhatják a vírusreplikációt és/vagy a gazdanövény géncsökkentési reakcióit. Csoportunk korábbi kísérleteiben kimutatták, hogy a lucerna mozaikvírus *in vitro* replikációs rendszerben a J2 ellenanyag gátolja a parciálisan duplaszálú RNS-templáton történő replikációt (de Graaf *et al.*, 1995).

Célkitűzések

Mivel a dsRNS-specifikus ellenanyagok potenciálisan minden dsRNS-re alapuló virális vagy növényi folyamatot befolyásolhatnak, növényi kifejezésük mind tudományos, mind gyakorlati

szempontból ígéretesnek tűnik. Ezen megfontolásokból a jelen doktori munka keretében az alábbi célokat tűztük ki:

- (i) Olyan expressziós stratégiák kidolgozása, amelyek segítségével dohányban (*N. tabacum* cv. Xanthi) mind a citoplazmában, mind más sejtalkotókban célzottan natív szerkezetű dsRNS-specifikus antitesteket és antitest fragmentumokat lehet kifejezni;
- (ii) Olyan ellenanyag vázszerkezet azonosítása, amely a növényi citoszolban stabil kifejeződést biztosít;
- (iii) Egyszálú Fv (scFv) antitest-fragmentumok előállítása monoklonális ellenanyagokból a "fág-display" módszer segítségével;
- (iv) dsRNS-specifikus IgG és scFv-k fiziológiai hatásának vizsgálata transzgenikus dohány növényekben.

Eredmények és megvitatásuk

Először a citoszolban kifejezett intakt J2 (IgG2a) cDNS-ek fehérjetermékeinek stabilitását és az alegységek összerendeződését vizsgáltuk korábban előállított transzgenikus növényekben. Megállapítottuk, hogy míg a citoplazmában termelődött nehézlánc (H) könnyen kimutatható ELISÁ-val, addig a könnyűlánc (L) koncentrációja alig éri el a kimutatási határt. A láncok igen eltérő stabilitását mutatja, hogy a vizsgált növényekben a H:L arány nem vagy alig éri el a 10:1 értéket, míg a hibridóma sejtekben előállított J2 antitestekben az antitestekre jellemző 1:1 arány figyelhető meg. Protein A affinitáskromatográfiával tisztított frakciókban kisfokú dsRNS-kötést mutattunk ki, de CMV és PVY vírussal fertőzött transzgenikus dohányokban *in vivo* nem alakult ki sem védettség, sem tolerancia a fertőzésekkel szemben.

Ezek az eredmények arra késztettek bennünket, hogy egyszerűbb szerkezetű egyszálú antitest fragmentumokat (scFv) fejeztessünk ki növényben. A "fág-display" technika felhasználásával négy dsRNS-specifikus scFv fragmentet állítottunk elő és expresszáltattunk *E. coli* periplazmában. A J2- és K1-scFv-eket klónozott IgG cDNS-ből, míg a P6- és K2-scFv-eket a megfelelő hibridóma vonalak polyA⁺ mRNS-éből kiindulva szintetizáltuk. Mind a négy scFv protein stabilan expresszáldott. Az scFv-k aktivitását ELISA tesztekkel mutattuk ki: A J2-, K1- és K2-scFv-k specifikus dsRNS-kötést mutattak, a P6-scFv azonban preferenciálisan a riboszomális RNS-hez kötődött. Ugyanazon klónból származó különböző izolátumokat

összehasonlítva nagy eltéréseket figyeltünk meg a fehérjék aktivitásában, aminek okát feltételezésünk szerint az scFv-szerkezet instabilitásában kell keresni.

További kísérleteinkben a legaktívabbnak talált klónokat (J2.104, K1.21, P6.84) használtuk fel. A növényi expressziót a J2- és P6-scFv-kenél analizáltuk teljes körűen. E két scFv V_H doménje csak néhány aminosavban tér el egymástól, a V_L domének azonban különbözők. Mindkét scFv-vel öt konstrukciót készítettünk el, hogy a citoszolba (két konstrukció), az endoplazmatikus retikulum (ER) belsejébe vagy az apoplaztba irányítsuk a fehérjét, ill. hogy lehorgonyozzuk őket a plazmamembrán citoplazma felőli oldalán. A konstrukciókat *E. coli*-ban állítottuk elő, majd a kointegratív pGEJAE vektor és *Agrobacterium tumefaciens* felhasználásával *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi levélkorongokat transzformálva transzgenikus növényeket állítottunk elő.

Mind a 10-féle transzformánsban sikerrel kimutattuk a megfelelő scFv-t kódoló mRNS-ek szintézisét. A citoszolban a P6-scFv viszonylag magas koncentrációban expresszáldott, de a J2-scFv-t egyetlen transzformánsban sem tudtuk detektálni. Hogy az scFv-k stabilitását a citoplazmában fokozzuk, és védjük őket a fehérjebontó folyamatoktól, a fehérje C-terminális végét a KDEL ER-retenciós szignál hozzáadásával módosítottuk. Ez a szekvencia irodalmi adatok szerint egyes, növényekben expresszált scFv-kenél stabilizáló hatást mutat (Schouten et al., 1996), kísérleteink során azonban egyik scFv-nél sem figyeltünk meg változást az expresszált fehérje mennyiségében. Azt a lehetőséget is megvizsgáltuk, hogy a J2-scFv-eket a Fyn kináz zsírsav-acilálási szignáljával N-terminálisan módosítva a plazmamembránhoz (és más intracelluláris membránokhoz) horgonyozva stabilizáljuk, s egyben a vírusreplikáció helyén feldúsítsuk. Ez a megközelítés sem eredményezett kimutatható J2-scFv felhalmozódást. Mindazonáltal kísérleteink a citoszolban történő scFv-kifejezés szempontjából pozitív eredményt hoztak, mert azonosítottuk a stabilan kifejeződő P6 scFv-szekvenciát, amely további kísérletekben fehérjevázként szolgálhat más ellenanyagokból származó antigénköti hurkok átültetésére ("CDR-grafting"). Ezt a technológiát állati eredetű ellenanyagok "humanizálásánál" széles körben alkalmazzák. Megemlítendő még, hogy ha a Fyn kináz mirisztilat és palmitilát horgonyszekvenciák kapcsolódását lehetővé tevő szignálját nem J2-scFv-hez, hanem a "Green Florescent Protein"-hez (GFP) kapcsoltuk, akkor a riporter protein membránokkal való asszociációja kimutatható volt, tehát maga a szignál alkalmas arra, hogy dohányban *in vivo* a fehérje várt modifikációjához és redistribúciójához vezessen.

Az endoplazmatikus retikulumban uralkodó oxidatív milió kedvez a diszulfid-hidak kialakulásának, ezért optimális az scFv-k korrekt összerendeződése és felhalmozódása szempontjából. A J2- és P6-scFv-eket a J2 antitest eredeti egér N-terminális szignálpeptidjének segítségével irányítottuk az ER-be, ahol a fenn leírt C-terminális ER-retenciós szignál (KDEL) hatására váltak rezidenssé. Mindkét scFv-nél ezzel a stratégiával értük el a legmagasabb expressziós szinteket és a legnagyobb fajlagos dsRNS-kötő képességet. Ha a retenciós szignált eltávolítottuk, hogy a fehérje apoplaztba történő szekrécióját lehetővé tegyük, mindkét ellenanyag koncentrációja a kimutathatósági határ alá csökkent. Az eredmény arra utal, hogy bár az scFv-k minden jel szerint natív szerkezetet vesznek fel az ER-ben, az intercellulárisokban nem stabilak és hamar degradálódnak.

A J2- és P6-scFv-k fiziológiai hatását üvegházba kiültetett transzgenikus dohány növényeken vizsgáltuk. A növényeket burgonya Y vírussal (*Potato Virus Y*, PVY) fertőztük. A PVY egy viszonylag lassú vírus, amely jól meghatározott szimptómákat okoz. A vírus multiplikációját a gazdanövény a fertőzés során indukálódó dsRNS-közvetített géncsendesítéssel gátolja. Bár nem minden transzformánsunknál detektáltunk fehérjekifejeződést, minden transzformáns típust inokuláltunk három különböző PVY-koncentrációnál. Az irodalomban ugyanis több példát is találunk arra, hogy a transzgén biológiai hatása olyan esetekben is fellép, amelyekben a fehérjekoncentráció a kimutathatósági határ alatt marad.

A transzgenikus dohány genotípusok egyike sem mutatott rezisztenciát vagy toleranciát a PVY vírussal szemben. Egy szignifikáns különbséget azonban megfigyeltünk: A fertőzés a J2-scFv-t az ER-ben kifejező növények kivételével minden genotípusnál a kontrollal azonos szimptómák kialakulásához vezetett. Az ER-rezidens J2-t expresszáló növényeken azonban súlyos nekrotikus szimptómák jelentek meg, amelyek egyes levelek lankadásához, majd pusztulásához vezettek. Hasonló szimptómák esetenként felléptek ugyan a többi genotípusnál is, de mindig sokkal kevésbé súlyosan. Az apoplaztban magas koncentrációban kifejezett intakt J2-IgG nem vezetett a szimptómák megváltozásához, s a súlyos nekrotikus tüneteket az ER-rezidens P6-scFv-t expresszáló növényeknél sem figyeltük meg. Emlékeztetünk arra, hogy míg a J2 antitest dsRNS-specifikus, a P6 antitestek a dsRNS-eken kívül ssRNS-ekhez is nagy affinitással kötődnek.

A leírt megfigyelések legkézenfekvőbb magyarázatának az tűnik, hogy bár az ER lumenjében felhalmozódó dsRNS-specifikus scFv-k nem képesek a vírusmultiplikációt meggátolni, a növény dsRNS-függő géncsendesítését befolyásolni tudják pl. a virális dsRNS-

ek lefedésével. A dsRNS-hez kötött scFv-k védelmet nyújthatnak a dicer enzimmel történő feldarabolás ellen, azaz gátolhatják a géncsendesítési folyamat megindulását. Felvetődik a kérdés, hogy hogyan kerül az ER lumenjében lokalizált fehérje kapcsolatba a virális dsRNS-ekkel. A potyvírusok az endoplazmatikus retikulumból származó kiterjedt vezikuláris struktúrákhoz kapcsolódva replikálódnak. A potyvírusokhoz tartozó dohány csíkoltság vírusról (*Tobacco Etch Virus*, TEV) tudjuk, hogy a TEV-fertőzés, valószínűleg a 6 kDa vírusfehérjének az ER-hez történő kötődése következtében, az ER-hálózat kollapszusát és aggregált struktúrák kialakulást okozza (Hull, 2002). Feltételezzük, hogy az ER-rel asszociáltan replikálódó PVY esetében fennáll a lehetőség, hogy a virális RNS az ott magas koncentrációban jelenlévő scFv-kkel kapcsolatba kerül, ill. hogy az ER fragmentálódása során scFv-k válnak szabaddá s kötődnek az ER-en kívül előforduló dsRNS-ekhez. Bármelyik magyarázat is bizonyul helyesnek, eredményeink mindenesetre azt mutatják, hogy nemcsak haptén- és fehérje-specifikus antitestek, hanem nukleinsav-specifikus ellenanyagok is képesek biológiai egyensúlyok megváltoztatására *in vivo*.

A benyújtott disszertáció legfontosabb eredményei tehát a következők: Monoklonális ellenanyagokból kiindulva sikerrel expresszáltunk aktív dsRNS-kötő scFv-eket *E. coli* periplazmában. Két eltérő szekvenciájú és specifitású scFv-fragmentumot (J2 és P6) ötféle konstrukció segítségével kíséreltünk meg transzgenikus dohánynövények különböző sejtkompartimentumaiban kifejezni, s minden esetben sikerrel bizonyítottuk a megfelelő mRNS-ek szintézisét. scFv-proteinek felhalmozódását a citoplazmában kifejezett P6- ill. az ER-rezidens J2- és P6-scFv-k esetében mutattuk ki. A dsRNS-specifikus ellenanyagok vírusreplikációra gyakorolt *in vivo* hatását analizálva megállapítottuk, hogy az scFv-k nem gátolják a PVY vírus multiplikációját, sőt, az ER-rezidens J2-scFv súlyosbítja a vírusszimptómákat.

Következtetések

1. Megvizsgáltuk a *N. tabacum* cv. Xanthi citoplazmájában kifejezett J2 (IgG2a) ellenanyag komplett H- és L-láncainak összerendeződését és aktivitását, és megállapítottuk, hogy a két fehérjelánc igen eltérő koncentrációban fordul elő. ELISA-tesztekben γ - ill. κ -specifikus antitestek kombinált felhasználásával a láncok kis mérvű asszociációját detektáltuk, de növényi kivonatainkból akkor sem sikerült ezüstfestéssel kimutatható

menyiségű L-láncot kinyernünk, ha a nehézláncokat és rajtuk keresztül a velük asszociált könnyűláncokat Protein A affinitáskromatográfiával koncentráltuk. Becsléseink szerint a dohány citoplazmában a könnyűláncok több mint tízszer alacsonyabb moláris koncentrációban vannak jelen, mint a H-láncok, míg természetes ellenanyagok esetén a H:L arány 1:1-nek felel meg. Mivel a megfelelő mRNS-eknél ezt a különbséget nem figyeltük meg, arra következtetünk, hogy a H- és L-alegységek összerendeződése a citoplazmában rendkívül alacsony hatékonyságú, s a nehézláncok stabilabbak a citoszolban, mint a könnyűláncok. Az alacsony steady-state koncentrációban expresszáldó és nem-natív J2 láncok jelenléte nem befolyásolta a PVY és a CMV vírus replikációját, tehát a szeparált H- és L-láncok citoszolban történő kifejezése nem bizonyult eredményesnek a fiziológiai változás előidézésére.

2. A natív antigén kötőhely hatékonyabb kialakítására négy dsRNS-kötő monoklonális ellenanyag szekvenciából kiindulva a "fág-display" módszer segítségével egyláncú Fv fragmentumokat (single-chain Fv, scFv) állítottunk elő. Az scFv-k a H- és L-lánc antigén kötőhelyet alkotó variábilis doménjeiből tevődnek össze, amelyek között egy rövid flexibilis peptid létesít kovalens kapcsolatot. Mind a négy antitest scFv-i hatékonyan kifejeződtek *E. coli*-ban és AN-ELISA-ban RNS-kötő aktivitást mutattak. Néhány ellenanyag, különösen a K1- és K2-scFv-k esetén a fehérjemennyiségre vonatkoztatott aktivitás az egyes preparátumok között igen nagy különbségeket mutatott, és ez a variabilitás a baktériumtenyésztés, a fehérjekivonás és az ELISA-eljárás szigorú standardizálásával sem volt kiküszöbölhető. Véleményünk szerint a specifikus aktivitásban megfigyelt különbségek a baktériumokban kifejezett scFv-k inherens szerkezeti instabilitására vezethetők vissza. A P6-scFv-nél a finom specifitásban figyeltünk meg változást: jó rRNS-kötő képességet detektáltunk, de a dsRNS-kötés messze alatta maradt a kiindulási P6-IgG aktivitásának. Feltételezzük, hogy itt is bizonyos instabilitásra, a natív szerkezettől való eltérésre vezethető vissza az effektus. Az eredmények alapján az scFv-k alkalmasnak tűntek a növényben történő expresszióra.
3. Dohány transzformánsok előállítására először kiválasztottuk azokat az *E. coli* klónokat, amelyek az eredeti szekvenciához képest a legkevesebb mutációt tartalmazták és a legnagyobb RNS-kötő aktivitást mutatták, azaz a J2.104, a K1.21 és a P6.84 klónokat. Ötféle génkonstrukciót állítottunk elő, hogy a fehérjét a citoszolban, az endoplazmatikus retikulumban vagy az apoplazmban egy egér N-terminális szignálszekvencia, a C-terminális KDEL ER-retenciós szignál ill. a Fyn- és Src-kinázokból származó zsírsav-aciláló szignálok megfelelő kombinációját felhasználva

kifejezzük. A transzformációt a növényi kointegratív pGEJAE1 vektort és *A. tumefaciens*t felhasználva *N. tabacum* cv. Xanthi levélkorongokon végeztük.

4. A J2- és a P6-scFv-k expresszióját és fiziológiai hatását részletesen analizáltuk transzgenikus dohány növényekben. A két scFv közül a P6-protein fejeződött ki stabilan a citoplazmában, a J2 mindkét alkalmazott konstrukció esetén csak mRNS-szinten volt detektálható. A P6-scFv stabil kifejeződése lehetőséget kínál arra, hogy a jövőben génszabványi módszerekkel ebbe a fehérjébe ültessük át más ellenanyagok antigénköti hurkait ("CDR-grafting"), s így tetszőleges specifikus scFv-ket sikerrel kifejezzünk a citoplazmában. Mindkét scFv-nél akkor figyeltük meg a legmagasabb szintű expressziót és aktivitást, ha a fehérjét ER-rezidenssé tettük, mert ez a kompartmentum segíti elő leghatékonyabban a szerkezetstabilizáláshoz szükséges diszulfid hidak létrejöttét. Ha az ER-retenciót előidéző KDEL-szignált eltávolítottuk, aminek elvárásaink szerint az apoplastba történő szelekciót kell eredményeznie, akkor mindkét scFv szintje a kimutathatósági határ alá csökkent. Ez a megfigyelés is az scFv-k instabilitását támasztja alá, mert korábbi kísérleteinkben intakt J2-IgG molekulákat igen magas koncentrációban sikerült kifejeznünk az apoplastban. A Fyn kináz állati eredetű, mirisztilálást és palmitilálást elősegítő szignálja dohány növényekben is hatékonyan bizonyult, de csak a GFP riporter fehérje, és nem a J2-scFv esetében idézte elő a fehérje membránasszociációját. A fehérje egyes sejt-kompartmentumokban történő sikeres expressziója tehát a megfelelő szignálszekvencián túl komplex módon függ a proteinnak az adott kompartmentumban való összerendeződésétől és stabilitásától.
5. A dsRNS-specifikus scFv-k kifejezése nem vezetett a burgonya Y vírussal (PVY) fertőzött transzgenikus növények gazdaságilag hasznosítható toleranciájához vagy rezisztenciához. Az ER-ben J2-scFv-ket kifejező növényekben azonban fellépett egy tudományosan érdekes hatás, a vírusszimptómák drasztikus fokozódása. A nekrotikus szimptómák fokozott megjelenését a fertőzés késői stádiumában feltehetőleg a J2-scFv dsRNS-sel való kölcsönhatása és a dsRNS-függő géncsendesítés befolyásolása okozza. Csoportunk legújabb eredményei arra utalnak, hogy a dsRNS-specifikus antitestek a növény morfogenetikai folyamatait is befolyásolhatják. Transzgenikus növényeink 14-20 %-ánál jellegzetes morfológiai változások lépnek fel, s e változások előidézésében a géncsendesítés befolyásolása szintén szerepet játszhat.

A szerző szeretné kifejezni őszinte köszönését mindazoknak, akik segítségükkel, tudásukkal és anyagi hozzájárulásukkal segítették munkáját.

Publikációs lista

A dolgozathoz felhasznált cikkeket aláhúzás jelöli.

1. **Morgun, B.V.**, Richter, A., Deshmukh, S., Stepanyuk, V., Kálai, K., Nagy, G., Lukács, N. Targeting dsRNA-specific single-chain Fv antibody fragments to different cellular locations in *Nicotiana tabacum* L. *Acta Biologica Hungarica* (in press), 2005.
2. **Morgun, B.V.**, Deshmukh, S., Richter, A., Stepanyuk, V., Kálai, K., Nagy, G., Lukács, N. Molecular farming and antibody expression in different cell compartments in higher plants. *Acta Horticulturae* (in press), 2004.
3. Kós, P.B., Oberstrass, J., Richter, A., Likó, I., **Morgun, B.V.**, Lukács, N. Analysis of binding sites of dsRNA-specific monoclonal antibodies. In: Bajusz, S. and Hudecz, F. (Eds.), *Akadémiai Kiadó, Budapest: Peptides 1998*, pp. 600-601, 1999.
4. Veliceasa, D., Enünlü, N., Kós, P.B., Köster, S., Beuther, E., **Morgun, B.V.**, Deshmukh, S.R., Lukács, N. Searching for a new putative cryptic virus in *Pinus sylvestris* L. *Virus Genes* (in press), 2005.

Előadások és poszterek

1. **Morgun B.V.**, Deshmukh, S.R., Richter, A., Barna, B., Halász, K., Lukács, N. Effect of dsRNA-specific plantibodies on virus multiplication and morphogenesis in tobacco. GBM Annual Fall Meeting Berlin / Potsdam, September 18 – 21, 2005.
2. **Morgun B.**, Desmukh S., Richter A., Likó I., Halász K. és Lukács N. dsRNS-specifikus ellenanyagok kifejezése és biológiai hatása növényekben. VIII. Magyar Növényélettani Kongresszus, Szeged, 2005. augusztus 22-25.
3. **Morgun, B.V.**, Deshmukh, S.D., Richter, A., Barna, B., Lukacs, N. Expression of dsRNA-specific antibodies in transgenic plants and their effect on the progress of virus infection. The Protein World Conference, Budapest, Hungary, 2-7 July 2005.
4. **Morgun, B.V.**, Deshmukh, S., Richter, A., Stepanyuk, V., Kálai, K., Nagy, G., Lukács, N. Molecular farming and antibody expression in different cell compartments in higher plants. 5th International Symposium on *In Vitro* Culture and Horticultural Breeding, Debrecen, Hungary. September 12-17, 2004.

5. **Morgun, B.V.**, Deshmukh S., Stepanyuk V. Kálai, K., Richter, A. and Lukács, N. Targeting antibodies to different cell compartments in plants. Lippay - Ormos - Vas Scientific Conference, Corvinus University of Budapest, Hungary. November 6-7, 2003.
6. **Morgun, B.V.**, Deshmukh, S., Stepanyuk, V., Kálai, K., Richter, A., Lukács, N. Targeting antibodies to different cell compartments in plants. Straub Days Scientific Conference, Biological Research Centre, Szeged, Hungary, December 3, 2002.
7. Likó, I., **Morgun, B.V.**, Lukács, N. Development of combinatorial antibody libraries using “phage display” method. Straub Days Scientific Conference, Biological Research Centre, Szeged, Hungary, January 20-22, 1999.
8. Kós, P.B., Oberstrass, J., Richter, A., Likó, I., **Morgun, B.V.**, Lukács, N. Analysis of binding sites of dsRNA-specific monoclonal antibodies. 25th European peptide symposium. Budapest, Hungary, 30 August - 4 September, 1998.

Declaration

I hereby declare that the work presented in this manuscript is my own and was carried out entirely with help of literature and aid cited in the manuscript.



Bogdan Morgun

Budapest, Hungary, September 7, 2005

Nyilatkozat

Mint Morgun Bogdan Ph.D. hallgató szakvezetője és a

- Morgun et al., 2005, Acta Biologica Hungarica (nyomdában);
- Morgun et al., 2004, Acta Horticulturae (nyomdában);
- Kós et al., 1999, Peptides 1998, 600-601;
- Veliceasa et al., 2005, Virus Genes (nyomdában)

közlemények felelős szerzője, tanúsítom, hogy a Morgun Bogdan Ph.D. értekezésében tárgyalt eredmények nevezett saját kísérletes munkájából származnak.

A fent említett közleményekben közölt eredmények eléréséhez Morgun Bogdan jelentősen hozzájárult és értekezésében, hozzájárulását tükrözően, csak saját eredményeit tárgyalja.

A fenti közlemények tézisekben tárgyalt eredményei semmilyen más tudományos fokozat megszerzésére irányuló munkában nem kerülnek felhasználásra.



Dr. Lukács Noémi
egy. docens, tanszékvezető

Budapest 2005. szeptember 5.