

Автореферат

**Експресія моноклональних антитіл, специфічних до
дволанцюгової РНК в трансгенних рослинах**

Богдан Моргун

Під керівництвом
Др. Ноемі Лукач

Інститут біології рослин
Біологічний дослідницький центр
Угорська академія наук

Кафедра фізіології та біохімії рослин
Будапештський університет ім. Корвінуса

Факультет природничих наук
Університет Сегеда

2005

Вступ

Антитіла привертали увагу дослідників протягом багатьох років. На сьогодні вже отримано багато даних щодо послідовностей антитіл, їх згортання, спорідненості, трансгенної експресії. Проте, до цього часу залишається невирішеною проблема експресії активних молекул антитіл в різних субклітинних компартментах гетерологічних систем. Найкритичнішим місцем для експресії антитіл залишається цитоплазма, середовище реплікації багатьох РНК вірусів рослин.

Раніше групою Ноемі Лукач (Noémi Lukács) було отримано ряд мишачих моноклональних антитіл, названих J2, K1, K2, P6 (Schönborn та ін., 1991). Антитіла J2, K1 і K2 специфічно розпізнають конструктивні особливості дволанцюгової РНК (длРНК) незалежно від послідовності нуклеотидів, а їх зв'язування з одноланцюговою РНК (олРНК), дволанцюговою ДНК, або РНК-ДНК-гібридами є нижче межі вимірювання. Особливістю антитіла P6 є те, що, окрім зв'язування з дволанцюговою РНК незалежно від її послідовності, воно також зв'язується з одноланцюговою РНК, наприклад, з віроїдною або рибосомальною РНК. Відомо, що дволанцюгова РНК відіграє важливу роль у декількох основних біологічних процесах, серед яких – реплікація одноланцюгових РНК-вірусів та мовчання генів, опосередковане дволанцюговою РНК. Оскільки більше 90 % усіх рослинних вірусів є РНК-віруси, длРНК, що обов'язково виникає при реплікації, стає потенційною цілью, через яку можна впливати на розмноження більшості рослинних вірусів. длРНК також є цілью при длРНК-опосередкованому мовчанні генів, сайленсингу, одна з функцій якого, захист рослини від вірусного множення. Ми висунули гіпотезу, що шляхом експресії длРНК-специфічних антитіл у відповідному внутрішньоклітинному компартменті трансгенних рослин можна перешкоджати реплікації длРНК (імунізація) або механізму мовчання генів, опосередкованому длРНК (імуномодуляція). Як було показано в ранніх експериментах *in vitro* в нашій групі, антитіло J2 запобігає реплікації частково дволанцюгової матриці вірусу мозаїки люцерни (de Graaff та ін., 1995).

Мета досліджень

Визначаючи науковий напрямок, важливо брати до уваги можливий фундаментальний і практичний потенціал експресії длРНК-специфічних антитіл у вищих рослинах. Ці білки могли б впливати на перебіг вірусних та/або рослинних метаболічних шляхів. Тому в даній кандидатській роботі ми ставимо перед собою такі цілі:

- (i) розробити стратегії експресії правильно згорнутих длРНК-специфічних антитіл або фрагментів антитіл усередині цитоплазми, а також в інших внутрішньоклітинних компартментах в *Nicotiana tabacum*;
- (ii) ідентифікувати структури антитіл, які можуть стійко експресуватися в цитоплазмі;
- (iii) сконструювати одноланцюгові фрагменти антитіл з повнорозмірних моноклональних антитіл, використовуючи техніку фагового дисплею;
- (iv) дослідити фізіологічні ефекти длРНК-специфічних антитіл та фрагментів антитіл у трансгенних рослинах, в яких вони експресовані.

Результати

Спочатку ми досліджували стабільність і збирання суцільного антитіла J2 (IgG2a), синтезованого в цитозолі. Ми з'ясували, що в той час, коли важкий (H) ланцюг антитіла J2 міг бути легко виявлений імунологічним методом ELISA, концентрація легкого (L) ланцюга залишилася на фоновому рівні. Співвідношення „H:L” було оцінено як 10:1, на відміну від співвідношення 1:1 у антитіла, синтезованого гібридомою J2. Після хроматографічного очищення на афінній колонці з Білком А інтенсивність зв'язування елюйованих плантитіл з длРНК була низькою. Інфікування трансгенного тютюну вірусом мозаїки огірка або Y-вірусом картоплі не виявило істотного захисту або стійкості до цих вірусів.

Низький рівень збирання плантитіл спонукав нас експресувати їх одноланцюгові фрагменти (ОЛФВ). Нами було припущено, що вони будуть збиратися ефективніше і їм не потрібні незалежні поліпептидні ланцюги для формування сайту зв'язування з антигеном. Використовуючи техніку фагового дисплею, чотири ОЛФВ, специфічні до длРНК, були сконструйовані і експресовані в *E. coli*. ОЛФВ J2 і K1 походили від клонованих кДНК імуноглобулінів, в той час як ОЛФВ Р6 і K2 були безпосередньо ампліфіковані з мРНК, виділених з відповідних гібридомних ліній. Усі ОЛФВ були стійко виражені в периплазмі *E. coli*. Їх антиген-зв'язуючу активність було продемонстровано методом ELISA: ОЛФВ J2, K1 і K2 зв'язують длРНК, в той час як ОЛФВ Р6 переважно зв'язувався з рРНК. Ми виявили, що ELISA-активність деяких ОЛФВ широко варіює від партії до партії, можливо, через нестабільність самих ОЛФВ-білків.

Найактивніші клони, а саме – J2.104, K1.21 і Р6.84, були вибрані для експресії у вищих рослинах. Дослідження експресії було завершено для J2 і Р6 ОЛФВ, які мають надзвичайно гомологічні області VH-домінів і різномірні області VL. Для обох зазначених ОЛФВ було розроблено п'ять видів конструкцій: дві конструкції для експресії у цитозолі, по одній – усередині ендоплазматичного ретикулуму (ЕР), в апопласті та на цитоплазматичній мембрані з боку цитоплазми. Конструкції були переміщені з *E. coli* до ко-інтегративного експресуючого рослинного вектора pGEJAE1. Трансгенні рослини *N. tabacum* L. сорту Xanthi були отримані за допомогою опосередкованої бактеріями *Agrobacterium tumefaciens* трансформації листкових дисків.

Синтез мРНК спостерігався у всіх видах трансформантів. Досліджуючи прояв ОЛФВ-білків у цитоплазмі ми виявили стійку вираженість ОЛФВ Р6 у той час, коли ОЛФВ J2 не виявлявся в жодному з трансформантів. З метою збільшення стабільності фрагментів антитіл у цитоплазмі та захисту їх від протеолітичної деградації ми приєднували ЕР-утримуючий KDEL-сигнал до карбоксильного кінця. Було показано, що послідовність KDEL стабілізує деякі ОЛФВ в цитоплазмі. Водночас вважалось, що близькість до плазматичної мембрани стабілізуватиме фрагменти антитіл і підвищить їх концентрацію на місці реплікації вірусу. З метою підвішування ОЛФВ до плазматичної мембрани та, можливо, до інших внутрішньоклітинних мембран ми використовували аміно-термінально-зв'язаний жирний ацилюючий сигнал Fup-кінази. Жодна з вищезгаданих стратегій не привела до накопичення ОЛФВ J2, які можна було б виявити. Проте стійко виражений Р6 міг би забезпечити структуру антитіла, в якій антиген-зв'язуючі CDR-петлі інших антитіл могли бути пересаджені для цитоплазматичної експресії і досліджені у ході подальших експериментів. У контрольному експерименті використовувався зелений флуоресцентний білок (GFP) для оцінки діяльності Fup-сигналу. Цей сигнал відповідає за міристолювання і пальмітилювання поліпептиду, а, отже, і за мембранне націлювання. З цієї причини мембранна асоціація маркерного білку в рослинах тютюну могла бути чітко виявлена.

Окисне середовище всередині ендоплазматичного ретикулуму є оптимальним для формування і накопичення правильно згорнутих ОЛФВ. Тому ми направили J2 і Р6 ОЛФВ в люмен ЕР за допомогою мишачого N-термінального IgG J2 лідерного пептиду і зробили їх ЕР-резидентними, додаючи С-термінальний KDEL-сигнал затримання. Для обох антитіл найвищі рівні експресії, як і найвища длРНК-зв'язуюча активність були досягнуті за допомогою зазначеного підходу. Проте, коли сигнал ЕР-затримання був вилучений з метою досягнення секреції ОЛФВ в апопласті, жоден з ОЛФВ не був виявлений методом імуноблотингу. Це означає їх нестійкість і швидку деградацію в міжклітинному просторі.

Щоб проаналізувати ефект РНК-специфічних антитіл на реплікацію вірусів, ми інфікували трансгенні рослини Y-вірусом картоплі (PVY). Цей відносно повільний вірус індукує чіткі симптоми і, як відомо, піддається мовчанню генів, опосередкованому длРНК. Незважаючи на те, що ОЛФВ-білок не був виявлений у всіх генотипах трансформантів, ми інфікували всі трансформанти в трьох різних вірусних концентраціях. Таке рішення було обумовлено тим, що в декількох описаних в літературі дослідженнях біологічний ефект трансгена спостерігався у випадках, коли концентрація білку була нижчою за рівень його виявлення. Серед трансгенних рослин тютюну ніякої істотної толерантності або стійкості до PVY знайдено не було. Проте, поміж трансгенними лініями спостерігалася одна істотна різниця: після PVY-інфекції всі трансгенні лінії поводяться подібно до контролю окрім лінії, що експресувала ЕР-резидентний J2-ОЛФВ. Крім того, що хвороботворні симптоми в цій лінії спостерігалися раніше у порівнянні з іншими лініями, було також виявлено очевидне збільшення інтенсивності хвороби, викликаной вірусом. Так, починаючи з третього листка над заражуванням у рослини спостерігався інтенсивний некроз; при цьому декілька листків в'яли і відмирили. Такі симптоми спостерігалися також в інших контрольних та трансгенних лініях, проте вони з'являлися пізніше і були менш гострими. ЕР-резидентний Р6 не індукував такого патогенезу. Слід наголосити, що, хоча Р6-антитіло зв'язується з длРНК, воно початково було отримане після імунізації віроїдною РНК і, таким чином, реагує також з олРНК. J2-антитіло є виключно специфічним до довгих, повністю спарених молекул РНК. Підсилення симптомів хвороби спостерігалось лише тоді, коли ОЛФВ J2 направлявся в порожнину ЕР. У той же час, J2 IgG, експресований в апопласті або цитоплазмі, не дав такого підсилення некротичних симптомів.

Такий результат свідчить про те, що J2-ОЛФВ, синтезований в ЕР, не може захистити рослину від поширення PVY, але водночас може вплинути на длРНК-опосередкований сайленсинг сприяючи, в такий спосіб, реплікації вірусу. Залишається незрозумілим, як ЕР-резидентний білок впливає на процес розмноження вірусу в цитоплазмі. Відомо, що потівіруси реплікуються в асоціації з великими везикулярними структурами, які походять з ендоплазматичного ретикулуму. Для гравірного вірусу тютюну (TEV) було показано, що після інфікування ЕР-мережа розпадається на агреговані структури, і цей процес, вірогідно, починається з прикріплення 6-кДа-білку вірусу до ЕР-мембрани (Hull, 2002). На нашу думку, у разі реплікації PVY в асоціації з ЕР існує велика імовірність того, що надзвичайно сконцентрований ОЛФВ вступає в контакт з реплікаційним комплексом. Також не виключається, що під час фрагментації ЕР ОЛФВ звільняється і може функціонувати й за межами ЕР. Незалежно від того, яке з припущень вірне, отримані нами результати свідчать про те, що не лише гаптен-специфічні або білок-специфічні антитіла, але й їх одноланцюгові фрагменти, специфічні до нуклеїнових кислот, можуть ефективно впливати на рівновагу *in vivo*.

Вищевикладене свідчить, що розроблені нами стратегії для експресії антитіл та їхніх фрагментів в цитоплазмі вищих рослин були успішно реалізовані. Так, одноланцюгові фрагменти антитіл були створені в *E. coli*, а потім експресовані як

плантитіла. Накопичення ОЛФВ спостерігалось в цитоплазмі і в ЕР. Крім того, фізіологічні ефекти ЕР-локалізованої експресії двох ОЛФВ-фрагментів, як і длРНК-специфічного IgG J2, були досліджені в *N. tabacum*, інфікованого вірусом PVY *in vivo*. У випадку J2-ОЛФВ було знайдено чіткий ефект на патогенез вірусу.

Висновки

1. Було досліджено збирання та активність інтактних IgG J2 Н- і L-ланцюгів, експресованих в цитоплазмі *N. tabacum* сорту Xanthi. Методом ELISA, використовуючи в якості імунореагентів γ - або κ -специфічні антитіла, ми встановили існування певної асоціації між Н- і L-ланцюгами. Водночас, після осадження сульфатом амонію і афінної хроматографії на Білку А лише важкі ланцюги детектувалися гель-електрофорезом і фарбуванням сріблом. Ми оцінюємо, що співвідношення „Н:Л” цитоплазматично експресованого J2 в *N. tabacum* складало як мінімум 10:1 на відміну від співвідношення 1:1 для антитіла, синтезованого гібридомою. Оскільки у співвідношенні Н- і L-ланцюгів мРНК подібної різниці не спостерігалось, ми стверджуємо, що спонтанне збирання двох ланцюгів є неефективним і що ізольовані Н-ланцюги, ймовірно, більш стійкі в цитоплазмі у порівнянні з L-ланцюгами. Зараження цих трансгенних рослин вірусами CMV або PVY не показало ніякого впливу експресії гена J2 на реплікацію вірусу або розвиток симптомів.

2. Чотири одноланцюгові варіабельні фрагменти, специфічні до длРНК, були сконструйовані з кДНК гібридного походження з використанням техніки фагового дисплею. ОЛФВ J2 і K1 походили від клонованої кДНК, в той час коли ОЛФВ Р6 і K2 – від загальної поліА⁺ мРНК гібридомних ліній. Всі ОЛФВ було успішно експресовано в *E. coli*, і їх РНК-зв'язуюча активність була продемонстрована методом AN-ELISA. Деякі приготування ОЛФВ, особливо K1- і K2-ОЛФВ, показали велику варіабельність у зв'язуванні з антигеном, яку не могла навіть виключити сувора стандартизація культивування, екстрагування і умов ELISA-тестів. Ми припускаємо, що така мінливість виникає завдяки нестійкості структури бактеріально-експресованого ОЛФВ, який, можливо, інактивується зв'язуванням з ELISA-чашкою. У разі ОЛФВ Р6 спостерігалися більш специфічні зміни: рРНК-зв'язуюча активність залишалася високою, але длРНК-зв'язування було набагато нижче, ніж зв'язування оригінального IgG Р6. Ця зміна специфічності, можливо, викликається тонкими структурними змінами в антиген-зв'язуючому сайті бактеріально-експресованого ОЛФВ Р6, оскільки ЕР-резидентний ОЛФВ, наявний у тютюні, не показав такого ефекту. Для експресії в тютюні були вибрані найактивніші клони J2.104, K1.21 і Р6.84 з найнижчим числом мутацій в даному генотипі.

3. П'ять типів генетичних конструкцій були створені для проявлення ОЛФВ в цитозолі, в ендоплазматичному ретикулумі або в апопласті. Мишачий N-термінальний лідерний пептид, С-термінальний KDEL-сигнал ЕР-затримання та жирні ацилюючі сигнали з Fup- і Sgc-кіназ приєднувалися в різних комбінаціях до ОЛФВ або GFP послідовностей. Гени були клоновані в ко-інтегративний експресуючий вектор рослин pGEJAE1 і трансгенні рослини *N. tabacum* були отримані з листкових дисків, трансформованих *Agrobacterium tumefaciens*.

4. Було вивчено експресію ОЛФВ J2 і Р6 в трансгенному тютюні та її фізіологічний ефект на рослині. Як було показано імуноблотингом, ОЛФВ Р6 був стійко виражений у цитоплазмі, тоді як жодна з двох конструкцій ОЛФВ J2 не привела до його накопичення в цитоплазмі. Завдяки стійкому прояву Р6 в цитоплазмі структура цього антитіла може використовуватися в подальших експериментах для експресії ОЛФВ з різною специфічністю в цитоплазмі шляхом пересадження CDR-регіонів.

Найвищі рівні обох ОЛФВ спостерігалися, коли білки в ЕР були резидентними. На відміну від повнорозмірної молекули J2 IgG, ані J2-, ані Р6-ОЛФВ не були виявлені в апопласті. Модифікація маркерного GFP жирним ацилюючим сигналом Fyn-кінази привела до його асоціації з клітинними мембранами, але така ж модифікація не призвела до достовірного накопичення ОЛФВ J2 в мембранних фракціях.

5. Було виявлено, що в рослинах, які експресують ЕР-резидентний ОЛФВ J2, вірусні симптоми з'являлися дещо раніше, ніж в інших генотипах. При цьому на листках розвивалися некротичні пошкодження, які спричиняли їх відмирання. Можна припустити, що яскраво виражені некротичні симптоми пов'язані із взаємодією дЛРНК-специфічного ОЛФВ J2 з РНК сайленсингом. Отримані в нашій лабораторії дані показали, що 14 - 20 % незаражених трансгенних рослин, як правило, розвивають характерні морфологічні зміни, які також можуть бути результатом взаємодії з механізмом заглушення генів. У наших дослідженнях ми вперше демонструємо фізіологічні ефекти, викликані експресією РНК-специфічних антитіл в трансгенних рослинах.

Отриманий трансгенний тютюн хоча й не представляє значної цінності для сільського господарства, оскільки не є стійким або толерантним до PVY-інфекції, проте, становить суттєвий інтерес для продовження фундаментальних досліджень у галузі молекулярної генетики вищих рослин та розробки новітніх біотехнологій.

Подяки

В першу чергу, автор висловлює глибоку вдячність своєму керівникові, Доктору Ноемі Лукач (Noémi Lukács), яка під час мого навчання в її групі створила належні умови для проведення досліджень та допомогла мені сформуватися як науковцю.

Автор зобов'язаний також своїм колегам Докторові Іштвану Ліко (István Likó), Докторові Петру Кошу (Péter Kós), Докторові Дюлі Шурані (Gyula Surányi), Володимирі Степанюку, Доріні Велічасі (Dorina Veliceasa), Наталії Енюнлю (Natalya Enünlü), які великодушно ділилися своїм науковим досвідом.

Автор інформує, що в рамках даного кандидатського проекту опрацьовували свої дипломні роботи студенти Будапештського Університету ім. Корвінуса Каталін Калаї (Katalin Kálai) та Габор Нодь (Gábor Nagy).

Автор висловлює також свою вдячність наступним ученим: Габору Ріго (Gábor Rigó), Доктору Тарасу Пастернаку за їх допомогу з культивуванням та трансформацією рослин і клітин; Доктору Ласло Бако (László Bakó) за обговорення і щирі допомогу в складних ситуаціях; Доктору Герт Де Єгеру (Geert De Jaeger) за експресуємий вектор pGEJAE1, хелперний штам pRK2013/НВ101 *E. coli* і штам C58C1Rif^R (pGV2260) *Agrobacterium tumefaciens*; Доктору Удо Конрад (Udo Conrad) за анти-с-мус моноклональне антитіло; Сачіну Дешмукх (Sachin Deshmukh) за регенований тютюн, трансформований геном ОЛФВ Fyn-J2; Доктору Шандору Ботка (Sándor Bottka) за синтез олігонуклеотидів; Доктор Аніко Пай (Anikó Páy) і Жужані Косо (Zsuzsanna Kószó) за сиквенування ДНК; Доктору Ласло Муштарді (László Mustárdy) за електронного-мікроскопічні дослідження рослинних зразків; Доктору Ласло Палковичу (László Palkovics), Професору Доктору Ервіну Болажу (Ervin Balázs), Доктору Золтану Дівейкі (Zoltán Divéki), Зенону Старчевські (Zenon Starchevski) за допомогу з вірусними експериментами на трансгенному тютюні; Томашу Алексін (Tamás Alexin) за надання імуноглобулінової кДНК з гібридом K2 і Р6; Юргену Оберштрассу (Jürgen Oberstrass), Андреасу Ріхтеру (Andreas Richter) за клоновані гени імуноглобулінів J2 і K1.

Автор зобов'язаний Ержебет Бардові (Erzsébet Bárdosi), Габріелі Флейт (Gabriella Fleit) і Ілдіко Пазманді (Ildikó Pázmándi) за надану ними технічну допомогу у дослідях.

Автор був матеріально підтриманий стипендією Яноша Бояї (János Bolyai) Угорської Академії Наук.

Список публікацій

Дисертаційна робота базується на наступних статтях:

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, 57(2), 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.
5. **Моргун Б.В.**, Дешмук С., Степанюк В., Пастернак Т., Лукач Н. Сайт специфическая экспрессия одноцепочечных фрагментов антител в *Nicotiana tabacum*. Цитология и генетика, т. 39, № 3, С. 43-49, 2005.
6. **Моргун Б.В.**, Степанюк В.Л. Конструювання та експресія в *Escherichia coli* одноланцюгових фрагментів антитіл специфічних до дволанцюгової РНК. Науковий вісник Ужгородського національного університету, Серія Біологія, Випуск 16, С. 110-113, 2005.
7. **Моргун Б.В.**, Степанюк В.Л. Сучасні інструменти біоінформатики для клонування та експресії антитіл. Физиология и биохимия культурных растений, т. 37, № 2, С. 175-182, 2005.
8. Тищенко Е.Н., **Моргун Б.В.** Экспрессия трансгеннов. Проблемы и стратегии для практического применения. Физиология и биохимия культурных растений, т. 36, № 4, С. 279-290, 2004.

Список виступів

Наступне - найголовніші конференції де тези були представлені:

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.V.**, Deshmukh S., Richter A., Likó I., Halász K., 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., Lukács, N. Expression of dsRNA-specific antibodies in transgenic plants and their effect on the progress of virus infection. The Protein World Conference, Budapest, Hungary, July 2-7, 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., 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, August 30 - September 4, 1998.
9. **Моргун Б.В.**, Ріхтер А., Дешмук С., Степанюк В., Калаї К., Пастернак Т., Палковіч Л., Кучук М., Лукач Н. Експресія моноклональних антитіл специфічних до дЛРНК в трансгенних рослин. Наукова конференція молодих учених, м. Ужгород, Україна, 1-3 грудня 2005 р.
10. **Моргун Б.В.** Дослідження проблем генної трансформації рослин. 7 з'їзд Українського товариства Генетиків і селекціонерів ім. М.І. Вавілова, Крим 2002.
11. **Morgun, B.V.**, Stepanyuk, V., Richter, A., Palkovics, L., Oberstrass, J., Balázs, E., Lukács, N. Expression of dsRNA-specific monoclonal antibody fragments in transgenic plants. VII Конференція молодих вчених по Проблемам фізіології рослин і генетики на рубежі третього тисячоліття. Київ, Україна, 18-20 жовтня, 2000 р.

Декларація

Таким чином, автор оголошує, що робота, представлена в цьому рукописі, є його власною роботою і здійснювалася цілком і повністю на базі літератури і допомоги, зазначених у рукописі.

Богдан Моргун

м. Київ, Україна, 5 лютого, 2006 року