

Б.В. МОРГУН¹, С. ДЕШМУК², В. СТЕПАНЮК²,
Т. ПАСТЕРНАК¹, Н. ЛУКАЧ³

¹ Институт клеточной биологии и генетической инженерии
НАН Украины, ул. Заболотного, 148, 03143 Киев, Украина;
E-mail: bmorgun@bluebottle.com

² Institute of Plant Biology, Biological Research Center, Hungary

³ Department of Plant Physiology and Plant Biochemistry,
Corvinus University of Budapest, Hungary

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКАЯ ЭКСПРЕССИЯ ОДНОЦЕПОЧЕЧНЫХ ФРАГМЕНТОВ АНТИТЕЛ В *NICOTIANA TABACUM*



Экспрессия антител и иммуномодуляция — современные молекулярные технологии для производства фармацевтических препаратов, влияющие на клеточный метаболизм или патогенную инфекцию в растениях. Тем не менее общепринятая стратегия для экспрессии правильно сложенных рекомбинантных антител в различных клеточных компартментах до настоящего времени не разработана. Для того чтобы способствовать экспрессии иммуноглобулинов в табаке, нами использовались одноцепочечные фрагменты (ОЦФВ) моноклональных антител J2 и P6 мыши, которые связываются с двухцепочечной РНК. Помимо цитоплазматической экспрессии, мы закрепляли ОЦФВ в плазматической мембране; направляли их в апопласт для секреции или делали их резидентными в эндоплазматическом ретикулуме. Были проанализированы уровни экспрессии и устойчивость трансгенных растений к вирусу картофеля Y, а также разработаны стратегии экспрессии активных рекомбинантных антител в различных компартментах.

© Б.В. МОРГУН, С. ДЕШМУК, В. СТЕПАНЮК,
Т. ПАСТЕРНАК, Н. ЛУКАЧ, 2005

ISSN 0564–3783. Цитология и генетика, 2005, № 3

Введение. Антитела — это сложные гликозилированные белки, производимые клетками иммунной системы позвоночных. Они распознают намеченный антиген и прочно связываются с ним с большой специфичностью, играя важную роль в специфическом иммунном ответе. Антитела специально производятся и широко используются для исследовательских и диагностических целей. К настоящему времени получен целый ряд рекомбинантных антител, которые были успешно экспрессированы в трансгенных растениях или культурах клеток растений [1]. Такие белки могут быть очищены и применены также вне растения, т.е. *ex planta*, для диагностики и терапии человека. Они также используются в растениях, т.е. *in planta*, для иммуномодуляции ферментов [2] и сигнальных молекул [3] для того, чтобы получить устойчивость к гербицидам [4] и влиять на клеточный метаболизм или инфекционность патогенов [5]. Однако недостаточно разработанной является экспрессия фрагментов антител в различных компартментах клетки, особенно в цитоплазме [6]. Анализ публикаций указывает, что попытки иммуномодуляции и иммунозащиты осуществить сложнее и, соответственно, встречаются они реже, чем экспрессия антител в растениях исключительно ради наработки.

На сегодняшний день целый ряд рекомбинантных антител и фрагментов антител был экспрессирован в высших растениях [7]. Белковая молекула антитела сыворотки крови, иммуноглобулина класса G (IgG) состоит из двух идентичных тяжелых и двух идентичных легких цепей, в целом из 12 доменов. Лишь 4 домена необходимы для связывания с антигеном. Это варибельные домены, расположенные по одному в каждой цепи. Они формируют два антигенсвязывающих сайта. Наиболее распространенный фрагмент антитела — это одноцепочечный фрагмент варибельный (ОЦФВ, или scFv по-английски), производное моноклонального антитела, который состоит из одного полипептида, т.е. двух варибельных доменов. В нем гибкий гидрофильный линкер соединяет варибельные домены тяжелой и легкой цепей иммуноглобулина воедино, чтобы образовать антигенсвязывающий сайт. ОЦФВ гораздо меньше IgG и легче приобретает правильную третичную конформацию.

В нашей лаборатории ранее была получена коллекция моноклональных антител мыши,

которые распознают двухцепочечную РНК (дцРНК, или dsRNA). Иммуноглобулины K1, J2 и P6 имеют подобные антигены, но различаются точной антигенной специфичностью. IgG J2 и K1 связываются с дцРНК, в то время как IgG P6 взаимодействует с одноцепочечной и дцРНК. Тяжелые цепи всех трех антител (IgG J2, K1 и P6) гомологичны и принадлежат к одному семейству, V23(J558), тогда как их легкие цепи совершенно различны [8, 9].

Целью проводимого исследования было разработать стратегии для экспрессии правильно собранных антител или фрагментов антител в различных компартаментах клетки растений и использовать дцРНК-специфические моноклональные антитела, чтобы повлиять на биологическую активность дцРНК в растениях, в особенности воздействовать на репликацию вирусов путем стабилизации двухцепочечных продуктов репликации.

Материалы и методы. Для трансформации нами был использован коинтегративный вектор pGEJAE1, содержащий T-ДНК, маркерные гены антибиотиков для поддержания в *Escherichia coli*, *Agrobacterium tumefaciens* и высших растениях. Реплицированная в *E. coli* плазида переходила в *A. tumefaciens* во время трехродительского скрещивания и сливалась с Ti-плазмидой посредством сайт-специфической рекомбинации [10]. Вектор pGEJAE1 был использован для трансформации двудольных растений ОЦФВ последовательностями, переносимыми из pCANTAB 5E фагмиды и библиотеки фагового дисплея. Он имел редко встречаемые в генах антител сайты рестрикции SfiI и NotI между CaMV P35S промотором и 3'-терминатором октопин синтетазы. Вектор, штамм-помощник *E. coli* pRK2013/HB101 для трансформации агробактерий, и штамм *A. tumefaciens* C58C1Rif^R (pGV2260) для трансформации табака были любезно предоставлены д-ром Geert De Jaeger (Университет Гента, Бельгия). Конструкции на основе указанной плазмиды были перенесены в *A. tumefaciens* (C58C1Rif^R) и использованы для трансформации листовых дисков *N. tabacum* L. сорта Xanthi. Положительно-цепочечный РНК вирус, вирус картофеля Y (Венгерский изолят NTN штамма) был получен от д-ров Ervin Balázs и László Palkovics.

Стандартные молекулярно-биологические методы, такие как ПЦР, Western и Northern-блоты, в основном использовали, как описано ранее [11] или в соответствии с [12]. AN-ELISA выполняли в соответствии Schönborn [9] с небольшими модификациями. Наносили в ячейку 100 нг биотин-меченной дрожжевой киллер дцРНК. Параллельно с антигеном использовали STE-буфер в качестве отрицательного контроля. После промывки плашки было добавлено в каждую ячейку 100 нг стрептавидина, меченого щелочной фосфатазой. Интенсивность колориметрической реакции измеряли поглощением проходящего света при 405 нм через 30 мин.

Трансформация табака проводилась по стандартной методике [11].

Для вирусологических тестов были использованы молодые, 25 см высотой, растения различных трансгенных линий, выращиваемые в теплице в одинаковых условиях. Вирусный сток разводили 20 mM калий фосфатным буфером pH 7,0 в пределах 200–6000 раз. Третий, считая сверху, развитый лист был слегка опудрен абразивным материалом — целитом. На дорзальную сторону листа выливали 0,2 мл свежеразведенной вирусной суспензии и равномерно растирали. Через несколько дней, когда пораненный лист восстанавливался, он оставался живым и зеленым. Как правило, в одном эксперименте были инфицированы 5–10 растений каждой линии. Сразу после обработки растения переносили в теплицу в стандартные условия возделывания, где и проводили наблюдения за развитием симптомов.

Результаты исследований и их обсуждение. Экспериментальные исследования были выполнены под научным руководством д-ра Ноеми Лукач (Noémi Lukács) в Биологическом Исследовательском Центре Венгерской Академии Наук (г. Сегед) и в Университете Будапешта им. Корвинуса, Венгрия.

В настоящей работе мы попытались модулировать биологическую активность двухцепочечной РНК в растениях и, в частности, повлиять на репликацию вирусов путем стабилизации промежуточных РНК продуктов. Для трансформации нами были использованы два различных гена фрагментов антител-ОЦФВ J2 и P6, так как стабильность конечно-

го продукта зависит от первичной последовательности и внутренних характеристик белка, которые не могут быть предсказаны наперед. Генетические конструкции (рис. 1) были такими, чтобы можно было направить белки в различные субклеточные компартменты.

Цитоплазматическая экспрессия ожидалась для ОЦФВ молекул без каких-либо регуляторных сигналов (J2, P6) и для ОЦФВ с присоединенным тетрапептидом KDEL (последовательность остатков аминокислот Lys-Asp-Glu-Leu) к С-терминальному концу (KJ2, KP6). Конструкции ОЦФВ J2 и KJ2 успешно транскрибировались в регенерированных линиях табака, что было продемонстрировано Northern-блоттингом. Однако ОЦФВ белка не было обнаружено в цитоплазме техникой Western-блоттинга. В отличие от J2 конструкций, в случае P6 нами показано успешное транслирование молекул мРНК. ОЦФВ P6 так же, как и KP6 белки, стабильно накапливались в цитозоле независимо от KDEL сигнала. Таким образом, нами показано, что внутренние характеристики и первичная последовательность гетерологично экспрессированного ОЦФВ важны для его стабильности в цитоплазме.

В этом контексте наличие стабильного каркаса в ОЦФВ P6 позволяет успешно использовать его для перенесения CDR регионов (таблица).

Полипептиды J2 и KJ2, вероятно, быстро деградировали, так как окислительно-восстановительный потенциал цитоплазмы не поз-

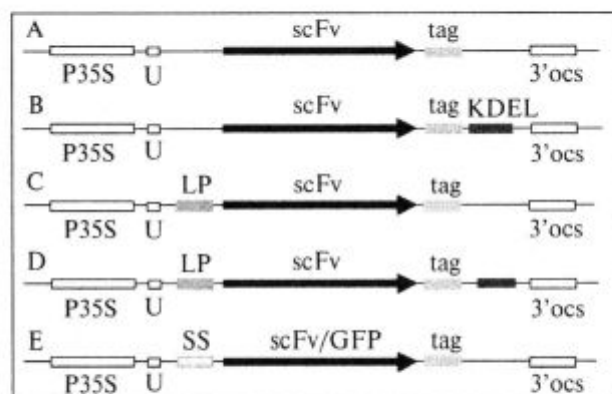


Рис. 1. Схематически представлены конструкции генов фрагментов антител, экспрессированных в табаке. Самая простая, базовая (А) и защищенная тетрапептидом KDEL (В) предназначены для экспрессии в цитоплазме. Тип С был сконструирован для секреции одноцепочечных фрагментов антител (ОЦФВ) в апопласт, тип D — для удержания в эндоплазматическом ретикулуме, в то время как тип E — для подвешивания к плазматической мембране. P35S — 35S-промотор вируса мозаики цветной капусты; U — 5'-нетранслируемый омега-лидер вируса мозаики табака; LP — лидирующий пептид тяжелой цепи иммуноглобулина J2 мыши; SS — сигнальная последовательность; scFv — кодирующая последовательность одноцепочечных фрагментов антител (ОЦФВ); tag — иммунологическая с-тус метка; 3'ocs — 3'-конец гена октопин синтетазы; KDEL — карбокси-терминальный сигнал для удержания в эндоплазматическом ретикулуме

волял формироваться дисульфидным связям. Следовательно, цепи не сворачивались правильно и удалялись клеточными протеазами.

Сборные результаты по экспрессии одноцепочечных фрагментов антител в трансгенных растениях *Nicotiana tabacum*

Локализация	Сигнал	мРНК	ОЦФВ белок
Цитоплазма	Отсутствует	+	+P6
		+	-J2
Цитоплазма	KDEL	н.о.	+KP6
		+	-KJ2
Апопласт	Лидирующий пептид мыши	н.о.	-LP6
		++	-LJ2
Эндоплазматический ретикулум	Лидирующий пептид + KDEL	н.о.	+LKP6
		н.о.	+LKJ2
Плазматическая мембрана	Жирный ацилирующий сигнал Fyn	+	±Fyn-J2

Примечание. «н.о.» — не определялось; + — умеренный уровень транскрипции; ++ — высокий уровень транскрипции.

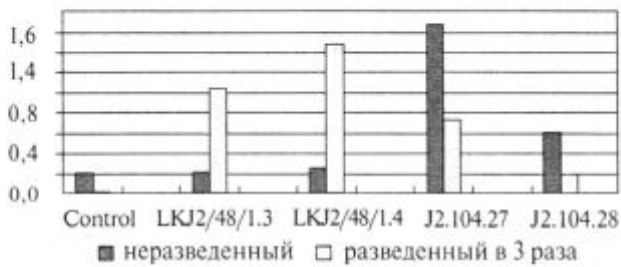


Рис. 2. Плантитело ОЦФВ LKJ2, направленное в эндоплазматический ретикулум, связывается с дцРНК в AN-ELISA. Контроль — нетрансгенный табак; LKJ2/48/1.3 и .4 — два трансгенных табака, экспрессирующих ОЦФВ LKJ2; J2.104.27 и .28, два *E. coli* периплазматических экстракта. Тестируемые экстракты были неразбавлены или разбавлены три раза 1 % BSA в PBS. По вертикали — поглощение света при 405 нм

На сегодняшний день пока нет общепризнанной стратегии, решающей эту проблему. В одной из предыдущих работ было показано, что иногда С-терминальная последовательность KDEL увеличивает стабильность гетерологичных белков в цитоплазме или удерживает их в эндоплазматическом ретикулуме [13]. Однако, как видно из наших результатов, в случае дцРНК-специфических ОЦФВ KDEL-защита не увеличивает стабильности белков.

Для того чтобы прикрепить фрагменты антител к плазматической мембране со стороны цитоплазмы, мы использовали естественный механизм посттрансляционной модификации белков липидами, а именно миристоилирование и пальмитоилирование [14]. При этом ожидаемая нами локализация гетерологичных белков была на плазматической и внутриклеточных мембранах. Для этого к аминоконцу ОЦФВ J2 была добавлена последовательность жирного ацилирующего сигнала из Fyn киназы, ответственная за миристоилирование и пальмитоилирование. В результате транскрибированная конструкция ОЦФВ Fyn-J2 была детектирована в регенерированных BY-2 клетках табака Northern-блоттингом. При этом ОЦФВ Fyn-J2 полипептид найден в незначительных количествах и был ассоциирован с клеточными мембранами. Несмотря на близость к липидному бислою, стабильность ОЦФВ не возросла, и низкий уровень экспрессии белка указывал на важность цитоплазматически стабильного каркаса.

Нами была предпринята попытка экспрессировать фрагменты антител J2 (LKJ2) и P6 (LKP6) в эндоплазматическом ретикулуме. Для этого был добавлен лидерный пептид моноклонального антитела мыши J2 к N-терминальному концу. Аккумулирование в ЭР планировалось путем добавления KDEL сигнала к С-терминальному концу. В данном случае оба ОЦФВ белка были легко обнаружены в экстрактах растворимых белков. Конструкции ОЦФВ LKJ2 и LKP6 обеспечили самые высокие уровни экспрессии белка, что было показано Western-блотом. Интересно отметить, что когда экстракты, содержащие редуцированные и не редуцированные меркаптоэтанолом растворимые белки трансгенной линии LKJ2, анализировали рядом на одном иммуноблоте, наблюдалась разница в электрофоретической подвижности. Этот феномен может быть объяснен различными третичными структурами белков. Это означает, что дисульфидные мосты формируются в переменных доменах ОЦФВ внутри

клеточными мембранами. Несмотря на близость к липидному бислою, стабильность ОЦФВ не возросла, и низкий уровень экспрессии белка указывал на важность цитоплазматически стабильного каркаса.

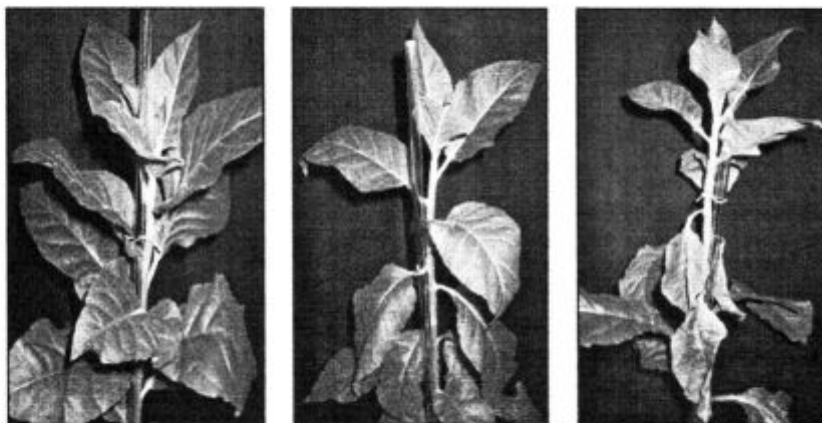


Рис. 3. Интенсивность симптомов у растений табака, инфицированных вирусом картофеля Y, на 22-й день после инокуляции. Слева направо показаны типичные растения: нетрансгенный неинфицированный контроль; трансгенная линия LKP6; трансгенная линия LKJ2

окислительной полости ЭР, указывая на то, что там имеет место правильное сворачивание.

С целью изучения функциональности антител экспрессированных в ЭР листьев табака белок LKJ2 был тестирован AN-ELISA на способность связывать двухцепочечную РНК. В качестве положительного контроля был использован ОЦФВ J2, произведенный в периплазме *Escherichia coli* (рис. 2). Для этого препаративное количество (обычно по 50 мл) бактериального периплазматического экстракта нарабатывали из двух одиночных колоний и диализировали в PBS буфере. Для того чтобы измерить активность ОЦФВ, все экстракты были разведены 1%-ным раствором бычьего альбумина плазмы (BSA) в PBS-буфере и осветлены центрифугированием. Одноцепочечные фрагменты захватывались за иммунологическую метку (E-tag или c-myc) специфичным моноклональным антителом и привязывались к микротитровой плашке, оставляя антиген-связывающий сайт свободным для взаимодействий. Результаты четко демонстрируют антиген-связывающую активность растительного ОЦФВ LKJ2 в серии разведений (рис. 2). Неразведенные экстракты табака, возможно, имели какие-то посторонние соединения, ингибирующие дцРНК связывание.

К сожалению, нам не удалось получить дцРНК-специфические ОЦФВ в апопласте трансгенного табака (LJ2), в противоположность экспрессии полноразмерного иммуноглобулина J2 в более ранних экспериментах нашей группы [16]. На наличие экспрессии белка иммуноблотингом были проверены 11 трансгенных растений транскрибирующих мРНК ОЦФВ LJ2. Не были обнаружены ОЦФВ белки в экстрактах растворимых белков. Таким образом, можно сделать вывод, что для секреции в апопласте преимущество может быть отдано полноразмерным антителам, а не одноцепочечным фрагментам антител. Секретируемый IgG J2 был стабилен в межклеточном пространстве и легко визуализировался [15].

Таблица суммирует результаты различных стратегий экспрессии в трансгенном табаке. Всякий раз, когда ОЦФВ белок не был отчетливо определяем, мы искали последователь-

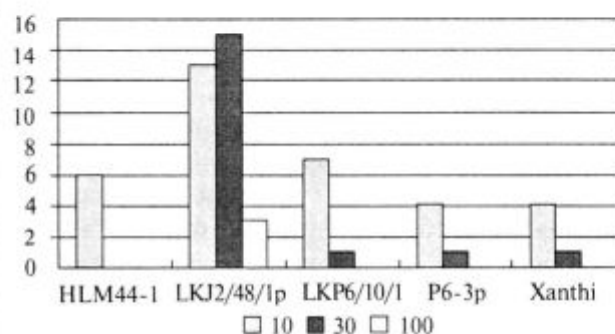


Рис. 4. Общее число сухих свисающих инфицированных листьев (по вертикали) при различных разведениях вируса картофеля Y на 21-й день после инокуляции. По горизонтали указаны генотипы растений

ности соответствующих ДНК и мРНК для того, чтобы подтвердить состоявшуюся трансформацию и/или прошедшую трансляцию мРНК.

Описанные подходы позволили нам оценить различные стратегии экспрессии для двух одноцепочечных фрагментов антител в нескольких клеточных компартаментах модельного растения *N. tabacum*.

Для того чтобы изучить, как смогли бы рекомбинантные антитела влиять на метаболизм двухцепочечной РНК *in vivo*, растения заражали вирусом картофеля Y (PVY). Пять независимых опытов были поставлены с тем, чтобы оценить разницу в скорости развития симптомов на трансгенных и нетрансгенных контрольных растениях. Интенсивность симптомов на зараженных растениях показаны на рис. 3.

Было удивительным обнаружить, что растения, аккумулирующие ЭР-направленный ОЦФВ LKJ2, более восприимчивы к развитию симптомов, чем контрольные или другие трансгенные линии. Листья с симптомами по направлению к верхушке растения высыхали и повисали намного быстрее, чем листья других генотипов (рис. 3). Они отмирали, как будто бы старение было ускорено ОЦФВ LKJ2. Обычно таковыми были листья, где симптомы проявлялись раньше и сильнее всего: нулевой (место инокулирования), третий и пятый. Статистика пораженных листьев представлена на рис. 4.

Было очевидно, что трансгенные растения, экспрессирующие дцРНК-специфические ОЦФВ, не были устойчивы к вирусному

вторженню. И все же достоверно показано ускоренное старение листьев трансгенной линии, продуцирующей активный ОЦФВ J2 в ЭР. Мы предполагаем, что фрагмент антитела влияет на метаболические пути дцРНК сайленсинга [16]. Получение подобной линии может послужить удобным инструментом для изучения феномена сайленсинга, опосредованного дцРНК.

Данный проект был поддержан ОТКА грантом T032861 и János Volya стипендией Венгерской академии наук. Мы очень обязаны д-ру Geert De Jaeger за растительный экспрессирующий вектор pGEJAE1 и агробактериальную систему трансформации растений; Ervin Balázs, Zoltán Divéky, László Palkovics за помощь при вирусологических опытах; Péter Kós, István Likó за помощь при конструировании ОЦФВ; Gábor Rigó, László Vako за понимание и поддержку на протяжении всей работы. Специальную благодарность выражаем всему техническому персоналу за отличное ассистирование.

SUMMARY. Antibody expression and immunomodulation are modern molecular techniques to produce pharmaceuticals and to interfere with cellular metabolism or pathogen infectivity in plants. Nonetheless, there is still no generally applicable strategy to express correctly folded active antibodies or antibody fragments in different cell compartments. To facilitate expression, single-chain antibody fragments (scFvs) were made of mouse monoclonal antibodies, J2 and P6 that specifically recognize double-stranded RNA (dsRNA). Stabilizing double-stranded replication intermediates could modulate the biological activity of dsRNAs in plants, especially to influence virus replication. Along with cytoplasmic expression, scFvs were anchored to the plasma membrane; targeted to the apoplast for secretion and made ER-resident. Expression levels were analysed and transgenic plants were evaluated for resistance or tolerance to potato virus Y infection. We have established strategies for expression of correctly assembled antibodies or antibody fragments in different plant cell compartments.

РЕЗЮМЕ. Експресія антитіл та імуномодуляція — сучасні молекулярні технології для виробництва фармацевтичних препаратів, впливу на клітинний метаболізм або патогенну інфекцію в рослинах. Разом з тим загально застосовувана стратегія для експресії вірно зібраних рекомбінантних антитіл в різних клітинних компартментах поки що не розроблена. Для того щоб сприяти експресії імуноглобулінів в тютюні, були використані одностанцюгові фрагменти (ОЛФВ) моноклональних антитіл J2 та P6 миші, які зв'язуються з двохланцюговою РНК. Була здійснена спроба модулювати біологічну активність двох-

ланцюгової РНК в рослинах, зокрема впливати на реплікацію вірусів, стабілізуючи проміжні продукти. Окрім цитоплазматичної експресії, ми закріплювали ОЛФВ в плазматичній мембрані; направляли їх в апопласт для секреції або робили їх резидентними в ендоплазматичному ретикулумі. Були проаналізовані рівні експресії та стійкість трансгенних рослин до вірусу картоплі Y. Розроблено стратегії експресії активних рекомбінантних антитіл в декількох компартментах.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morgun B.V., Deshmukh S., Stepanyuk V., Richter A., Kalai K., Nagy G., Lukacs N. Molecular farming and antibody expression in different cell compartments in higher plants // *Acta Hort.* — 2005 (in press).
2. Jobling S.A., Jarman C., Teh M.M., Holmberg N., Blake C., Verhoeven M.E. Immunomodulation of enzyme function in plants by single-domain antibody fragments // *Nat. Biotechnol.* — 2003. — **21**, № 1. — P. 77–80.
3. Strauss M., Kauder F., Peisker M., Sonnewald U., Conrad U., Heineke D. Expression of an abscisic acid-binding single-chain antibody influences the subcellular distribution of abscisic acid and leads to developmental changes in transgenic potato plants // *Planta.* — 2001. — **213**, № 3. — P. 361–369.
4. Eto J., Suzuki Y., Ohkawa H., Yamaguchi I. Anti-herbicide single-chain antibody expression confers herbicide tolerance in transgenic plants // *FEBS Lett.* — 2003. — **550**. — P. 179–184.
5. Zimmermann S., Schillberg S., Liao Y.C., Fischer R. Intracellular expression of TMV-specific single-chain Fv fragments leads to improved virus resistance in *Nicotiana tabacum* // *Mol. Breed.* — 1998. — **4**, № 4. — P. 369–379.
6. De Jaeger G., De Wilde C., Eeckhout D., Fiers E., Depicker A. The 10 plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance // *Plant Mol. Biol.* — 2000. — **43**, № 4. — P. 419–428.
7. Ma J.K.C., Drake P.M.W., Christou P. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants // *Nat. Rev. Genet.* — 2003. — **4**, № 10. — P. 794–805.
8. Kós P.B., Oberstrass J., Richter A., Liko I., Morgun B.V., Lukács N. Analysis of binding sites of dsRNA-specific monoclonal antibodies // *Peptides.* — Budapest, 1998. — P. 600–601.
9. Schönborn J., Oberstrass J., Breyel E., Tittgen J., Schumacher J., Lukács N. Monoclonal antibodies to double-stranded RNA as probes of RNA structure in crude nucleic acid extracts // *Nucl. Acids Res.* — 1991. — **19**, № 11. — P. 2993–3000.
10. Deblaere R., Bytebier B., De Greve H., Deboeck F., Schell J., Van Montagu M., Leemans J. Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants // *Nucl. Acids Res.* — 1985. — **13**, № 13. — P. 4777–4788.
11. Morgun B.V. Expression of dsRNA-specific monoclonal antibodies in transgenic plants: PhD University of Szeged, Hungary, 2005.

12. Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. — New York : Cold Spring Harbor Press, 1989.
13. Schouten A., Roosien J., van Engelen F.A., de Jong G.A., Borst-Vremsen A.W., Zilverentant J.F., Bosch D., Stiekema W.J., Gommers F.J., Schots A., Bakker J. The C-terminal KDEL sequence increases the expression level of a single-chain antibody designed to be targeted to both the cytosol and the secretory pathway in transgenic tobacco // *Plant Mol. Biol.* — 1996. — **30**, № 4. — P. 781—793.
14. McCabe J.B., Berthiaume L.G. Functional roles for fatty acylated amino-terminal domains in subcellular localization // *Mol. Biol. Cell.* — 1999. — **10**, № 11. — P. 3771—3786.
15. Lukács N., Richter A. Antikorpersynthese in transgenen Pflanzen // *Bioscope.* — 1994. — **4**, — P. 29—35.
16. Morgun B.V., Deshmukh S., Stepanyuk V., Richter A., Kalai K., Nagy G., Lukacs N. Expression of dsRNA-specific scFvs in *Nicotiana tabacum*: virus protection or immunomodulation // *Acta Biol. Hung.* — 2005 (in press).

Поступила 29.03.05