

## **Kálium ion-csatornák szerepének vizsgálata szívizomsejtekben a génkifejeződés RNS interferencia révén történő blokkolásával**

Kutatási témánk a szívizom kálium ioncsatornáinak vizsgálata RNS interferencia technikával. Az RNS interferenciát kiváltó expressziós kazettát Aujeszky-féle vírus (AyV) vektorral terveztük a szívizomsejtekbe juttatni. A konkrét feladat megoldásához több olyan általános problémát is meg kellett oldanunk, amelyhez modellként egy másik posztmitotikus sejtípust, az idegsejteket is felhasználtuk. Ennek két fő oka az volt, hogy a génbeviteli rendszerünk használhatóságát ki akartuk terjeszteni más sejtípusokra is, ill. a vírus idegrendszerben való alkalmazásában nagyobb tapasztalatunk volt, s így több kontroll- és előkísérletet célszerűbb volt idegsejteken elvégezni. Az elért eredményeket nem időrendben, hanem témakörök szerint csoportosítva mutatom be.

### **(1) Mutáns vírusok előállítás**

*(1a) Mutációk kialakításának technikája* Az Aujeszky-féle vírus (AyV) DNS-e valamivel több, mint 142 kilobázis pár (kbp) hosszúságú. Egy ilyen nagyméretű genomot nem lehet a hagyományos restrikciós endonukleáz/ligáz enzimeken alapuló metodikával genetikailag módosítani. A herpeszvírusok genetikai manipulációját (mutációk-, ill. idegen gének bevitele) rendszerint homológ rekombinációval végezzük. E technika lépései a következők: elsőként a módosítani kívánt virális DNS szakaszt izoláljuk (restrikciós enzimek, vagy PCR segítségével), majd beépítjük egy plazmidba, ahol elvégezzük a genetikai módosítást, majd megváltoztatott DNS-t visszajuttatjuk a vírus genomba (az előzőleg klónozott DNS szakaszok homológ szekvenciaként működnek a rekombinációnál). A rekombináns vírusokat rendszerint a bevitt marker gének kifejeződése (általában szín reakció) alapján izoláljuk. Tehát, sok esetben a marker gének bevitele és a mutáció kialakítása ugyanazon folyamatban történik. Ha a marker génre nincs szükségünk, akkor a marker gént tartalmazó vírusból azt úgy távolítjuk el, hogy a homológ rekombinációhoz, a marker gént nem, de a mutációt tartalmazó transzfer plazmidot használunk, s a szín eltűnésére szelektálunk. A következő géneket és DNS szekvenciákat inaktiváltuk az AyV genomban.

*(1b) Génbeviteli vektorok* esetében a cél az, hogy a vírus vektor nagy hatékonysággal vigyen be idegen géneket a célsejtekbe, de maga a vektor ne legyen hatással a sejt normális életműködésére. Követelmény még, hogy ezek a vírusok *in vitro*, sejttenyészetben (AyV esetében halhatatlan PK-15 epitél sejt vonal) szaporíthatóak legyenek. A génbeviteli vektornak szánt vírus ribonukleotid redukáz (RR) génjét inaktiváltuk elsőként a fent említett technikával. Az RR gén a vírus DNS építőköveinek szintézisében (NDP-ből dNDP-ket készít) játszik alapvető szerepet. Mivel osztódó sejtekben jelen vannak ezek a molekulák, a mutáns vírus könnyen szaporítható a saját sejt vonalán. Poszt-mitotikus sejtekben azonban, mivel nincs DNS szintézis, az várható, hogy a vírus képtelen lesz sokszorozni magát. Azt tapasztaltuk azonban, hogy az RR negatív vírus citotoxikus hatást okoz az idegsejtekben, sőt, bizonyos fokú replikációs képességgel is rendelkezik. Ezért, egy másik AyV gént, a korai fehérje 0 (EP0) gént is kiüttünk. Az EP0 gén fontos szerepet játszik abban, hogy a vírus a produktív fertőzés útjára lépjen. Az RR és EP0 kettős mutánsok idegsejtekben és pankréász sejtekben (Hegyí és mtsai, 2005) megfelelően avirulensnek bizonyultak. Az izomsejtekbe történő génbevitelhez, még egy mutációt alkalmaztunk; nevezetesen, az AyV antiszensz promóterét (ASP) inaktiváltuk. Korábbi vizsgálatok alapján (Boldogkői és mtsai, 2002) ugyanis azt tapasztaltuk, hogy ez a mutáció jelentős virulencia csökkentést okoz. A

szívizomba történő génbevitelre ez a hármas mutációt (RR, EP0, ASP) tartalmazó vírus kiválóan alkalmasnak bizonyult (Prorok és mtsai; 2009).

(1c) *Szinapszisokon történő génbevitel* esetén a cél az volt, hogy az idegrendszer egy távoli pontjára a perifériáról, vagy más, könnyen hozzáférhető helyről idegen géneket (pl. RNS interferenciát kiváltó expressziós kazettákat) tudjunk bevinni. Egy ilyen vírus vektor kialakításához más típusú gének eliminációjára van szükség. Az AyV az idegsejtekben mindkét irányban terjedni képes. Ez nem kedvező sajátság, mert így a vírus nem alkalmas az ideghálózatok térképezésére. A vírus vektor „egyenirányúsítása” érdekében az anterográd terjedési irányt meghatározó glükoprotein E és I géneket elimináltuk, ami kizárólagos retrográd terjedést eredményezett (Boldogkői és mtsai, 2009). Továbbá, amennyiben idegen gének bevitele a cél, a vírus vektornak egy viszonylag hosszú ideig nem szabad, hogy hatással legyen a cél sejtek működésére, ezért a vírus vektor virulenciáját csökkenteni kell. A már említett EP0 és ASP mutációk is alkalmasak erre a feladatra. Az AyV egyik legfontosabb citotoxicitást okozó faktora a „virion host shut-off” (VHS) gén, melynek terméke egy ribonukleáz. A VHS gén kiiktatásával nem csupán a virulencia csökkenését idézzük elő, hanem a vírusba épített transzgén jóval erősebb kifejeződését. Ennek oka az, hogy a VHS-negatív vírussal fertőzött sejtekben a mRNS-ek nem degradálódnak. A VHS/ASP kettős mutáns vírusok bizonyultak legjobb génbeviteli vektornak (Boldogkői és mtsai, 2009).

### **Fluoreszcens marker géneket kifejező vírusok**

Fluoreszcens markerként a zöld fluoreszcens protein (GFP) és a piros színű DsRed különféle szín-és egyéb (érés idő, monomer forma) variánsait használtuk. A riporter gének kifejeződését több tényező határozza meg. A már említett VHS mutáció mellett, a marker gének kifejeződését növelhetjük a promóter kiválasztásával, ill. a marker gént kifejező expressziós kazetta megfelelő genomiális lokalizációjával. A génexpresszió szabályozására rendszerint a humán citomegalovírus IE1 promóter/enhanszerét használtuk. *In vitro* szívizomsejtes modellt alkalmazva, azt tapasztaltuk, hogy a vírus által bevitt  $P_{hcmv}$ -GFP expressziós kazetta alacsony szinten fejeződik ki, ha azt az EP0 génnek megfelelő DNS szakaszba integráljuk. Több genomiális integrációs helyet teszteltünk, s ezek közül a legmagasabb expressziót biztosító helynek az ASP régió bizonyult. Ennek egyik oka az, hogy ez a régió két kópiában található a genomban, a másik ok pedig az, hogy a környező virális szabályozó elemek optimális környezetet biztosítanak a magas szintű génkifejeződéshez. A különböző színvariánsokat kifejező vírusok együttes használata különösen az idegpályák térképezésénél, új kutatási lehetőségeket biztosít. Többek között, ilyen vírusok alkalmazásával, különböző idegi központok finomszerkezetét tudjuk térképezni (Boldogkői és mtsai, 2009).

### **Aktivitás markereket kifejező rekombináns vírusok**

A sejtek aktivitásának vizsgálatát a sejtműködésre jellemző folyamatok detektálásával végezhetjük el. A szinaptikus hólyagokban a pH közel 2 értékkel alacsonyabb, mint a szinaptikus részben. Ezt a különbséget mutatják ki az ún. synaptopHluorin konstrukciók. A  $Ca^{2+}$  intracelluláris változásai mutathatók ki valós időben a Cameleon és troponin konstrukciókkal, a FRET (fluorescence resonance energy transfer) detektálásával. A két kalcium szenzor felépítése hasonló. Egy kék (CFP; cyan fluorescence protein) és egy sárga (citrin) fluoreszcens proteint egy kalcium-kötő peptid szakasz választ el egymástól. Ha nincs  $Ca^{2+}$  a sejtben, akkor a kék fluoreszcens fehérjét gerjesztve kék emissziót kapunk. A  $Ca^{2+}$  szint növekedésével a két fluoreszcens gén komponens közelebb kerül egymáshoz, s a kék komponens gerjesztésével, a kibocsátott kék szín energiájának egy része átadódik a térbelileg

közeli sárga fluoreszcens proteinnek, s sárga emissziót is kapunk. A kék/sárga emissziós szín aránya a citoplazmában lévő kalcium szinttől függ, a kalcium szint pedig a sejt aktivitásának jellemzője. Neuronokban hasonlítottuk össze a különböző fluoreszcens aktivitás markereket, s azt tapasztaltuk, hogy ezek közül a troponon a legmegfelelőbb (Boldogkői és mtsai, 2009), s a továbbiakban ezt a markert alkalmaztuk a szívizomba való génbevitelre is (Prorok és mtsai, 2009). A synaptopHluorin konstrukcióval az volt a probléma, hogy virális génbevitel esetén nem csak a szinaptikus vezikulumokban lokalizálódott, hanem a sejtmembránban is, a Cameleon pedig túl alacsony szinten fejeződött ki.

### **RNS interferencia vírusok**

A génbeviteli körülmények és a génkifejeződés optimalizálását követően kutya Kv4.3 gént szabályozó RNS interferenciát okozó hajtű (hn)RNS-t kifejező expressziós kazettákat építettünk be az AyV vektorba. A gén három különböző pontjára tervezett hnRNS-eket kódoló DNS szakaszokat alakítottunk át expressziós rendszerekké a Promega „U1 hairpin cloning system”-ének segítségével. A vírus sejtbe való bejutását egy beépített GFP gén expressziós kazettával tudjuk nyomon követni. Jelenleg ezzel a három vírus törzssel-, ill., Kv4.3 gént kifejező CHO sejteken plazmid vektorok által bevitt és kifejezett RNS interferenciát kiváltó „ágensekkel” folytatunk kísérleteket a Kv4.3 gén kifejeződésének gátlására.

### **Szívizomsejtekbe és neuronokba való marker gének bevitele AyV vektorokkal**

Szívizomsejtekben teszteltük a GFP kifejeződés mértékét a genomiális lokalizáció függvényében. Az eredetileg tervezett EP0 gén helyére beültetett GFP expressziós kazetta nem fejeződött ki megfelelő mértékben, a későbbiekben elkészített LAP helyre beépített marker gén viszont igen. Ezért a továbbiakban a LAP helyet használtuk az idegen gének vírus genomba történő integrációjára. A LAP-integráció sejt kultúrában és idegsejtekben is optimálisabb volt, mint egyéb genom szakaszok használata.

### **Genetikailag kódolt fluoreszcens aktivitás markerek poszt-mitotikus sejtekbe való bevitele vírus vektorokkal**

Troponon (Tn-L15) gén funkcionalitását teszteltük szívizomban és neuronokban is. Frissen izolált miocitákat fertőzve 16 óra elteltével tudunk fluoreszcencia jeleket detektálni (485 nm emisszió) 535 nm-es fényrel való gerjesztést követően. A citrin és CFP arányának változása a várakozásoknak megfelelően korrelált a kalcium szint változásával (Prorok és mtsai, 2009). A retina ganglion sejtjeiben is vizsgáltuk a troponon működését. Egér elsődleges látóközpontjába oltva a troponont kifejező vírust, több szinapszissal később a retina ganglion sejtjeiben vizsgáltuk, ahová retrográd transzport útján került. Méréseink szerint a vírus által bevitt troponon alkalmasnak bizonyult a kalcium szint mérésére: mind farmakológiai (glutamát), elektromos és élettani (fény) ingerlés hatására erőteljes FRET reakciót mértünk retina szelet sejteken (Boldogkői és mtsai, 2009). A troponon az idegi működés optikai vizsgálatát teszi lehetővé egyidejűleg nagyszámú sejten, ami egy új, hatékony eszközt biztosít az agykutatás számára.

### **A vírusfertőzés hatása a sejtekre**

A génbeviteli rendszerek fontos kritériuma, hogy maga a rendszer ne legyen hatással a célsejtekre, ellenkező esetben nem tudjuk, hogy milyen hatás származik a bevitt gén, és mi a

rendszer által. A mi esetünkben a vírus sejtekre való hatását kell eliminálni véglegesen vagy egy hosszabb időintervallumban. RR/EP0 mutáns vírusok hatását vizsgáltuk pankréasz sejteken *in vivo* (tengeri malac) kísérletes rendszerben. A kontrollként használt vad alapú törzs esetében immun-hisztokémiával (anti-AyV antitestet alkalmazva) kimutattuk a vírus antigének megjelenését a fertőzött sejtekben, míg az RR/EP0 kettős mutánsok esetében a vírus fehérjék nem jelentek meg, jelezvén, hogy a vírus nem indította be a produktív infekcióval járó szaporodási ciklusát (Hegyi és mtsai, 2005). Az RR/EP0/ASP hármás mutáns vírus szívizomsejtekre való hatását több aspektusból is megvizsgáltuk, melyek a következők voltak: a sejtek túlélése; a tranziens outward  $I_{to}$  áram patch clamp analízissel, ill. a sejtrövidülés vizsgálatával 1, 2 és 3 nappal a fertőzés után, nem-fertőzött sejteket használva kontrollként. Eredményként azt kaptuk, hogy a vírus nem változtatja meg a fenti paramétereket a vizsgált időpontokban (Prorok és mtsai, 2009). Idegsejtek esetében egy másféle módszert alkalmaztunk a vírus sejtre való hatásának vizsgálatára. Ennek oka az, hogy transz-szinaptikus génbevétel esetében olyan vírusokkal dolgozunk, amelyek neuronokban való replikációra képesek, hiszen csak így tudnak terjedni az idegrendszerben a szinapszisokon keresztül. Magyarul, a vírusvektor által okozott citotoxikus hatás elkerülhetetlen, de ezt egyrészt lehet késleltetni, a már említett virulencia csökkentő mutációkkal, másrészt, a vírus fertőzés idejét lehet detektálni, az általunk kidolgozott „timer” vírus technikával. A „timer” vírus technika lényege, hogy a vírus vektorba két olyan eltérő színű fluoreszcens gént ültetünk be, amelyek detektálhatósági ideje eltérő. Rendszerünkben a zöld fluoreszcens protein több órával a piros fluoreszcens protein előtt detektálható. A kimutathatóságban való időbeli eltérés okai a következők: a piros fluoreszcens protein (DsRed2) érési ideje hosszabb, mint a GFP-é, a GFP-t két kópiában építettük be a vírus genomba, ill. a GFP-t a magas expressziót biztosító ASP régióba integráltuk, míg a DsRed-et a gE gén helyére. Mindkét gén legmagasabb szintű aktivitását VHS negatív genetikai háttérben fejtette ki. Továbbá, az aktivitás és timer funkciót egyetlen vírusban integráltuk, s így egy olyan eszközt kaptunk, amellyel a neuronok aktivitása és a sejt fiziológiai állapota egyidejűleg vizsgálható.

### **Az AyV fertőzés sejt típus függése**

Az AyV-alapú vektorokkal egy univerzális (több sejt típusba való) génbeviteli rendszert szándékozunk létrehozni, ezért megvizsgáltuk, hogy valóban minden sejt típusban alkalmazható-e. Az egyetlen kivétel, amit találtunk, az a hippocampus CA3 régiójában elhelyezkedő piramissejtek, amelyeket a vírus nem képes a CA1 piramissejtekből megfertőzni. Ezek a sejtek azonban közvetlenül, a sejttest membránján keresztül fertőzhetők AyV-al.

### **Humán kálium ioncsatornák kifejeződésének vizsgálata**

Az ioncsatornák kifejeződésének szabályozásához hasznos információt szolgáltat a természetes kifejeződésük vizsgálata. Kezdetben emberi szívizom kálium ioncsatornáinak kifejeződését terveztük blokkolni RNS interferenciával, ezért humán ioncsatornák kifejeződését tanulmányoztuk kvantitatív real-time PCR segítségével. A kísérletek részletes eredményeit egy közleményben publikáltuk (Ördög és mtsai, 2006) (Később, több ok miatt is áttértünk a kutya modellre) Többek között, kimutattuk, hogy a Kv1.7, a Kv3.3 és a Kv3.4 ioncsatorna alegységek hasonló szinten fejeződnek ki, mint a jól ismert ioncsatornák, ezért jó okkal feltételezhető, hogy ezek az alegységek fontos szerepet töltenek be a natív áramok kialakításában. Ezen eredmények ismeretében döntöttünk úgy, hogy a Kv4.3 ioncsatorna alegység lesz az első, melynek RNS interferenciával való szabályozását kísérreljük meg.

## Összefoglalás

A munkánk során olyan Aujeszky-féle vírus alapú vektor rendszert állítottunk elő, amely nagy hatékonysággal képes idegen géneket bevinni posztmitotikus sejtekbe *in vivo* és *in vitro* körülmények között. A vírusnak, a vizsgálati időszakban nincs kimutatható hatása a sejtműködésre. Transz-szinaptikus génbevétel esetén pedig kidolgoztunk egy olyan szisztémát (timer funkció), melynek segítségével detektálható a sejtek fertőzöttségi állapota. Transzgén modellként a troponont (Tn-L15), egy genetikailag kódolt fluoreszcens aktivitás markert, alkalmaztunk szívizom és idegsejtekben.

Az OTKA pályázatban elnyert támogatásból finanszírozott közlemények listája:

### Publikációk:

Prorok J, Jost N, Kovács PP, Kristóf A, Virág L, Tóth A, Tóth JS, Ördög B, Szabad J, Tombác D, Varró A & Boldogkői Z. 2008. Herpesvirus-mediated delivery of a genetically encoded fluorescent Ca<sup>2+</sup> sensor to primary adult canine cardiomyocytes. *közlésre beküldve*.

Boldogkői Z, Bálint K, Awatramani GB, Balya D, Busskamp V, Viney TJ, Lagali PS, Duebel J, Pásti E, Tombác D, Tóth JS, Takács IF, Scherf BG & Roska B. 2009. Genetically timed, Activity sensor and Rainbow transsynaptic tools for the analysis of neural circuits. *Nature Methods*, 6 (2): 127-130.

Ördög B, Brutyó E, Puskás LG, Papp JG, Varró A, Szabad J & Boldogkői Z. 2006. Gene expression profiling of human cardiac potassium and sodium channels. *Int J Cardiol*, 111(3): 386-393.

Sík A, Cote A & Boldogkői Z. 2006. Selective spread of neurotropic herpesviruses in the rat hippocampus. *J Comp Neurol*, 496(2): 229-243.

Hegy P, Ördög B, Rakonczay Z Jr., Takács T, Lonovics J, Szabolcs A, Sári R, Tóth A, Papp JG, Varró A, Kovács M, Gray MA, Argent BE, & Boldogkői Z. 2005. The effect of herpesvirus infection on pancreatic duct cell secretion. *World J Gastroenterol*, 11(38): 5997-6002.

### Absztraktok:

Prorok J, Jost N, Kovács PP, Kristóf A, Tóth A, Ördög B & Boldogkői Z. 2007. Gene transfer into cardiac muscle cells with herpes virus. *Cardiologica Hungarica*, 37: Suppl A, A24.

Boldogkői Z. 2007. Herpesvirus-mediated delivery of fluorescent activity marker genes to neurons. *Acta Microbiol Immunol Hung*. 54, Suppl, 17.

Pásti E, Bálint K, Ördög B, Roska B & Boldogkői Z. 2007. Transsynaptic gene delivery by pseudorabies virus vectors *Clinical Neuroscience*, 60, (suppl1): 52.

Kovács M, Rakonczay Z, Ördög B, Takács T, Lonovics J & Varró A, Tóth A, Papp G, Gray M, Argent B, Boldogkői Z, Hegyi P. 2006. A novel possibility for gene transfer into the duct cells using non-replicating pseudorabies virus variants. *Gastroenterol*, 130, Suppl 2 A-259.

Kovács PP, Kovács M, Jost N, Virág L, Kristóf A, Ördög B, Szabad J, Papp G, Boldogkői Z, Varró A. 2006. A befelé egyenirányító káliumáramnak a repolarizációban játszott szerepének az összehasonlító vizsgálata humán, kutya és nyúl szívekben. Magyar Kardiológusok Társaság Tudományos Kongresszusa. *Cardiol Hung* 36 Suppl. A. A22

Ignath I, Venglovecz V, Ozsvári B, Rakonczay Z, Ördög B, Takács T, Lonovics J, Boldogkői Z, Tóth A, Varró A, Hegyi P. 2006. The effect of virus infection on pancreatic duct cell secretion. *Pancreas*, 33 (4): 470-470.

Ördög B, Brutyó E, Szűts V, Seprényi G, Puskás L, Boldogkői Z, Szabad J, Papp JG, Varró A. 2005. A Mirp2 protein lenne az elsődleges  $\beta$ -alegység a szív Ikr ionáram kialakításában humán szívben? *Cardiologia Hungarica*; 35 .

Venglovecz V, Rakonczay Z, Ördög B, Takács T, Lonovics J, Szabolcs A, Varró A, Tóth A, Papp G, Gray M, Argent B, Boldogkői Z & Hegyi P. 2005 Pseudorabies virus infection stimulates pancreatic ductal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion. *Z Gastroenterol*, 43(05).

#### **Előadások és poszterek:**

Petrovszki P, Tombác D, Tóth JS, Sík A, Bálint K, Roska B, Boldogkői Z. 2009. Fluorescent calcium sensor expressing pseudorabies viruses for the study of neural circuits. HFSP Meeting, Tokyo, Japan.

Boldogkői Z. 2008. Az Aujeszky-féle vírus, mint eszköz a biológiai tudományokban - előadás. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése, Keszthely.

Prorok J, Tóth A, Jost N, Kovács PP, Kristóf AA, Tombác D, Tóth J, Ördög B, Virág L, Papp JG, Varró A, Boldogkői Z. 2008. Herpesvirus-mediated delivery of genetically encoded fluorescent Ca<sup>2+</sup> sensor to adult canine cardiomyocytes. 32nd Meeting of the European Working Group on Cardiac and Cellular Electrophysiology, Madrid, Spain.

Tombác D, Tóth JS, Bálint K, Roska B, Boldogkői Z. 2008. Activity sensor expressing pseudorabies viruses for the study of neural circuits. International Herpesvirus Meeting, Estoril, Portugal.

Boldogkői Z. 2007. Herpesvirus-mediated delivery of fluorescent activity marker genes to neurons. 15th International Congress of Hungarian Society for Microbiology, Budapest.

Tombác D, Pásti E, Takács I, Bálint K, Roska B, Tóth J, Boldogkői Z. 2007. Development of pseudorabies virus-based transsynaptic gene delivery vectors. 15th International Congress of Hungarian Society for Microbiology, Budapest.

Kovács M, Rakonczay Z, Ördög B, Takács T, Lonovics J & Varró A, Tóth A, Papp G, Gray M, Argent B, Boldogkői Z, Hegyi P. 2006. A novel possibility for gene transfer into the

duct cells using non-replicating pseudorabies virus variants. Digestive Disease Week and the 107<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association Institute. Los Angeles.

Venglovecz V, Rakonczay Z, Ördög B, Takács T, Lonovics J, Szabolcs A, Varró A, Tóth A, Papp G, Gray M, Argent B, Boldogkői Z & Hegyi P. 2006 Pseudorabies virus infection stimulates pancreatic ductal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion. Digestive Disease Week and the 107<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Association Institute. Los Angeles, 2006.

Ignath I, Venglovecz V, Ozsvári B, Rakonczay Z, Ördög B, Takács T, Lonovics J, Boldogkői Z, Tóth A, Varró A, Hegyi P. 2006. The effect of virus infection on pancreatic duct cell secretion. 37<sup>th</sup> Annual Meeting of the American Pancreatic Association and 13<sup>th</sup> Meeting of the International Association of Pancreatology. Chicago, 2006.

Kovacs M, Rakonczay Z, Ordog B, Takacs T, Lonovics J, Varro A, Toth A, Papp JG, Gray MA, Argent BE, Boldogkői Z, Hegyi P. A Novel Method for Gene Transfer to Isolated Pancreatic Ducts. 37th European Pancreatic Club (EPC) Meeting July 6–8, 2005, Graz, Austria

Venglovecz V, Rakonczay Z, Ordog B, Takacs T, Lonovics J, Szabolcs A, VarroA, Toth A, Papp JG, Gray MA, Argent BE, Boldogkői Z, Hegyi P. The Effect of Pseudorabies Virus Infection on Pancreatic Duct Cell Secretion. 37th European Pancreatic Club (EPC) Meeting July 6–8, 2005, Graz, Austria

Tombác D, Tóth JS, Petrovszki P, Boldogkői Z. Az Aujeszky-féle vírus genom transzkripciósi analízise real-time RT-PCR technikával - előadás. 2008. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése, Keszthely.

Petrovszki P, Tombác D, Tóth JS, Boldogkői Z. 2008. Aktivitás szenzort kifejező Aujeszky-féle vírusok ideghálózatok térképezésére. A Magyar Mikrobiológiai Társaság 2008. évi Nagygyűlése, Keszthely.

Prorok J, Jost N, Kovács PP, Kristóf A, Tóth A, Ördög B & Boldogkői Z. 2007. Gene transfer into cardiac muscle cells with herpes virus. Magyar Kardiológus Társaság 2007. évi Kongresszusa. Balatonfüred. 1049/2007.