



SZENT ISTVÁN EGYETEM

**VIGS vektorok használata során bekövetkező gén
expressziós változások és egy virális géncsendesítést gátló
fehérje RNS kötésének vizsgálata**

Doktori értekezés tézisei

Oláh Enikő Etelka

Gödöllő

2017

A doktori iskola

megnevezése:

Növénytudományi Doktori Iskola

tudományága:

Növénytermesztési és Kertészeti tudományok

vezetője:

Dr. Helyes Lajos

egyetemi tanár, az MTA doktora

SZIE, Mezőgazdaság -és Környezettudományi Kar

Kertészeti Technológiai Intézet

Témavezető:

Dr. Várallyay Éva

Csoportvezető, tudományos főmunkatárs

Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ

Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet

Diagnosztikai Csoport

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

.....

A témavezető jóváhagyása

Bevezetés

Az RNS interferencia fontos védekező mechanizmus vírusok, transz gének és más molekuláris paraziták ellen. Az RNS interferencia folyamatát a vírus replikációja során keletkező, duplaszálú RNS-ek (double stranded RNA, dsRNA) indukálják. A növény Dicer enzime a vírus eredetű dsRNS-eket feldarabolja, 21–25 nukleotid hosszúságú kis RNS-ekre (small interfering RNA, siRNA). A siRNS egyik szála beépül az RNS indukálta géncsendesítési komplexbe (RNA-induced silencing complex, RISC), melynek központi molekulája az ARGONAUTA (AGO) fehérje. Az így kialakult komplex a beépült siRNS-el komplementer vírus RNS-eket felismeri, ezt követően elhasítja vagy transzlációsán gátolja azok aktivitását. Az RNS interferenciának nem csak a vírusok elleni védekezésben van fontos szerepe, hanem endogén gének szabályozásában is, például a mikro RNS-ek (micro RNA, miRNA) által, a miRNS-ek az endogén gének mRNS-eit hasítással vagy transzlációs gátlással szabályozzák. A miRNS-eknek nem csak az endogén gének regulációjában van fontos szerepe, hanem vírusfertőzés során is.

A növény vírus fegyverkezési verseny során a vírusok a sikeres fennmaradás érdekében több stratégiát dolgoztak ki, például kifejlesztettek RNS csendesítést gátló (szupresszor) fehérjéket. A vírusok szupresszor fehérjéi, mint például a tombusvírusok p19 szupresszor fehérjeje több ponton képes gátolni az RNS csendesítés folyamatát, például képesek siRNS-t kötni vagy indukálni a miR168-at, melynek fontos szerepe van a RISC komplex központi molekulájának, az AGO fehérjének a szabályozásában.

Az RNS interferencián alapuló molekuláris módszerek alkalmasak arra, hogy egyes gének működését specifikusan gátolják. Az elmúlt évtizedben a növény alapú vektorokat gyakran alkalmazzák gének funkciójának vizsgálatára. A vírus indukálta géncsendesítés (VIGS) igen vonzó alternatív eszköz a reverse genetikában, a növényi transzformáció elkerülése, a módszer egyszerűsége, alacsony költsége és a gyors eredmény miatt.

A VIGS-en alapuló módszer alkalmazása során egy növényi gén egy szakaszát beépítik a vírus genomjába, ezt követően megfertőzik a rekombináns vírussal a növényt. A vírus elterjedését követően, a vírus replikációja során dsRNS-ek keletkeznek. A növény Dicer enzime felismeri a virális dsRNS-eket és feldarabolja, 21–25 nukleotid hosszúságú siRNS-ekre. A siRNS egyik szála beépül a RISC komplexbe, mely felismeri és elhasítja a beépült siRNS-el komplementer vírus RNS-eket. A beépített szakasszal homológ endogén génről képződő mRNS-ek lebomlanak. A folyamat következtében lecsökken a vizsgálni kívánt gén expressziós szintje a növényben, és kialakul az endogén gén hiányára jellemző fenotípus.

A vírus vektorok alkalmazása azonban korlátokba ütközik, amennyiben a vírus a fertőzés során nagymértékben megváltoztatja a gazdanövény gén expressziós rendszerét (shut-off jelenség alakul ki). Ilyen esetben nem különíthető el egymástól a vírusfertőzés eredményeképpen kialakuló tünet és a vizsgált gén hiányát jellemző fenotípus. A shut-off sokszor olyan háztartási géneket is érint, melyeket kvantitatív PCR-nél referencia értéként használnak VIGS vektor alkalmazásakor. A vírus vektor növényi gén expresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata tehát alapvető fontosságú a VIGS vektorként való használat elkezdése előtt.

CÉLKITŰZÉS

Munkánk elsődleges célja korábban kifejlesztett vírusvektorok tesztelése abból a szempontból, hogy egy adott gazdanövényenél használt VIGS vektor vírusa mennyire változtatja meg a gazda génexpressziós rendszerét, továbbá tisztázni szeretnénk volna, hogy a p19 virális szupresszor fehérje kis RNS kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója között van-e összefüggés.

Célul tűztük ki:

1/ a shut-off jelenség meglétének vizsgálatát TMV, PVX, TRV vírus vektorokkal fertőzött dohány, paradicsom, illetve BSMV vírus vektorral fertőzött búza növényen, a vírusfertőzött növények glicerin-aldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (Gapdh), ribulóz-1,5-bifoszfát-karboxiláz-oxigenáz (Rubisco), aktin, elongációs faktor (Ef), ciklofillin (Cph) és tubulin gén expressziós szintjének meghatározásával.

2/ a p19 virális szupresszor fehérje kis RNS kötőképessége és a miR168 szintjének indukciója közötti összefüggés vizsgálatát.

ANYAG ÉS MÓDSZER

NÖVÉNYI ANYAGOK

Kísérleteinkhez üvegházi körülmények között nevelt dohány (*Nicotiana benthamiana*), paradicsom (*Solanum lycopersicum*, Kecskeméti jubileum fajta), és búza (*Triticum aestivum*, Bezostája fajta) növényeket használtunk. A fertőzött növényeket fényszobában, 21 - 22°C hőmérsékleten, 16 órás megvilágítással neveltük a tünet kialakulásáig.

Kísérleteinket két biológiai ismétlésben végeztük el, 3-4 növény 2 csúcsi levél poolozott mintáiból készült a Northern blot.

TESZTNÖVÉNYEK FERTŐZÉSE

VIGS kísérleteink során dohány és paradicsom növényeket fertőztünk meg TMV (Dohány mozaik vírus)-, PVX (Paradicsom X vírusa), TRV (Dohány zörgőlevelűség vírus) - VIGS vektorral és búzát BSMV (Árpa csíkos mozaik vírus)-VIGS vektorral. Az üres és a PDS egy darabját tartalmazó VIGS vektorokat (TMV-VIGS konstrukciót KpnI enzimmel, PVX-VIGS konstrukciót SpeI enzimmel, α , γ BSMV-VIGS konstrukciót MluI enzimmel, míg a β BSMV-VIGS konstrukciót BcuI enzimmel) linearizáltuk. Ezt követően *in vitro* transzkripciót készítettünk a linearizált plazmidokról, az elkészített *in vitro* RNS transzkriptumokat használtuk fel a növények fertőzéséhez. A búza BSMV-VIGS vektorral való fertőzéséhez a 3 RNS-nek megfelelő (α β γ) transzkriptumának 1:1:1 arányban kevert elegyét használtuk. A TRV1 és a TRV2- VIGS konstrukciót tartalmazó *Agrobacterium tumefaciens* (C58C1) törzset használtunk agroinfiltráláshoz. Infiltrálás előtt a szuszpenziókat TRV1 : TRV2 = 1 : 1 arányban kevertük össze. A kontroll növények leveleit TRV1-et tartalmazó acetosziringonos oldattal infiltráltuk.

Dohány növényeket fertőztünk meg vad típusú CIRV-el és a mutáns változatainak (CIRV+DI, CIRV19Stop és CIRV-3M) *in vitro* transzkriptumaival.

A kísérleteink során a vírus fertőzéssel párhuzamosan, egészséges növényeket mechanikai sértésnek tettük ki, azonban a vírus jelenlétének hiányában. Ezeket a növényeket nevezzük mock növényeknek, melyeket negatív kontrollként használtunk.

A P19-3M REKOMBINÁNS FEHÉRJE TÚLTERMELTETÉSE

A CIRV p19 és p19-3M géncsendesítést gátló fehérjéket kódoló géndarabjait, kis RNS kötő aktivitásuk tesztelése érdekében, pGEX-2T vektorba (glutation-S-transferáz (GST) rendszerben) ligáltuk. A klónokat *Escherichia coli* BL21 (DE3) törzsben expresszáltattuk, majd tisztítottuk, követve a gyártó utasításait (GE Healthcare Life Sciences). Óvatosan felszuszpendáltuk a sejteket, majd ultrahang segítségével széttroncsoltuk. A felülúszót a rekombináns fehérje tisztítása miatt, Glutation Sepharose gyantával inkubáltuk 21°C-on 30

percen keresztül. Ezt megelőzően a Sepharose gyantát négyszer mostuk RISC pufferrel. Ezt követően a gyantát szobahőmérsékleten 3 órán keresztül thrombinnal inkubáltuk. A hasítást követően a felülúszó tartalmazta a p19-es fehérjét. Későbbiekben a tisztított szupresszorok kis RNS kötő képességét vizsgáltuk electrophoretic mobility shift assay-el.

ELECTROPHORETIC MOBILITY SHIFT ASSAY (BAND SHIFT)

A tisztított szupresszorokhoz radioaktívan jelölt szintetikus siRNS-t adtunk. Az általunk használt siRNS szekvenciája a következő volt: 5' UGAUUAUUGGCACGGCUCAAUC 3' és 3' UUGAGCCGUGCCAAUAUCAUC 5'. A p19 és p19-3M tisztított szupresszor fehérjékhez (3 nM) hozzáadtunk 1 pM radioaktívan jelölt siRNS-t a kötési pufferben. A reakció elegyet 25°C-on 30 percen keresztül inkubáltuk annak érdekében, hogy a kötési reakció végbemenjen. A reakció elegyhez 3 µl loading dye festéket adtunk hozzá és 6%-os natív poliakrilamid gélen 0,5x TBE pufferben 50 V-on 1,5 órán keresztül választottuk el. A géleket vákuum szárítottuk. A radioaktív jelet röntgenfilm segítségével tettük láthatóvá.

EREDMÉNYEK

VIGS VEKTOROK FERTŐZÉSÉNEK HATÁSA AZ ENDOGÉN GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA

Kísérleteink során a *shut-off* jelenség meglétét vizsgáltuk olyan növény vírus kapcsolatokban, melyeknél az endogén gének funkcióit VIGS vektor segítségével állapították meg.

Nicotiana benthamiana, *Solanum lycopersicum* és *Triticum aestivum* növényeket fertőztünk meg az adott növényeknél leggyakrabban alkalmazott VIGS vektorokkal: TMV, PVX, TRV, BSMV alapú vírus vektorokkal. A gazdanövényeket párhuzamosan fertőztük olyan VIGS vektorral, amely nem tartalmazott semmit a klónozó helyén (VIGS-Üres), illetve amely az adott növény endogén PDS génjének egy darabját tartalmazta (VIGS-PDS). Olyan endogén gének expressziós szintjét vizsgáltuk Northern blot analízissel (Rubisco, Gapdh, tubulin, az elongációs faktor, Cph és az aktin), amely gének expressziós változása jól jelzi a *shut-off* jelenlétét és a VIGS kísérletek során gyakran alkalmazzák őket referencia értéként.

PVX és TMV-VIGS (Üres, PDS) vektorral fertőzött dohány növények esetében azt tapasztaltuk, hogy számos gén expressziós szintje lecsökkent pl. Rubisco, Gapdh és tubulin a mock növényekhez képest, tehát jelen van a *shut off* jelenség. PVX, TMV, TRV-VIGS vektorral való fertőzés során a Cph gén expressziós szintje megemelkedett a mock növényekhez képest.

TRV-Üres VIGS vektorral fertőzött dohány növények esetében az általunk vizsgált mRNS szintekben nem tapasztaltunk drasztikus változást a mock növényekhez képest. Ezzel ellentétben, TRV-PDS VIGS vektorral fertőzött dohány növényeknél azt tapasztaltuk, hogy a Rubisco, Gapdh és az aktin mRNS szintje is nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. A VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenléte befolyásolhatja azt, hogy az adott vektor mennyire változtatja meg a gazdanövény génexpresszióját.

PVX-Üres VIGS vektorral fertőzött paradicsom növényeknél Rubisco, Gapdh és a tubulin enyhe gén expressziós szint csökkenést tapasztaltunk, míg a PDS gén egy darabját tartalmazó VIGS vektorral való fertőzéskor a Rubisco, Gapdh és a tubulin gének mRNS szintje nagymértékben lecsökkent a mock növényekhez képest. TMV-Üres VIGS és TRV-üres vektorral fertőzött növényeknél nem tapasztaltunk drasztikus változást az általunk vizsgált endogén gének expressziós szintjét tekintve. Ezzel szemben PVX-PDS, TRV-PDS vektorral fertőzött növényeknél a Cph kivételével drasztikusan lecsökkent az általunk vizsgált gének expressziós szintje.

A dohánynál tapasztaltakhoz hasonlóan, a paradicsomnál is megfigyeltük, hogy a VIGS vektorba beépített idegen szekvencia jelenléte befolyásolhatja a *shut-off* kialakulását.

Ezen gének gén expressziós változása összefüggésben állhat azzal a ténnyel, hogy a PDS-t csendesíteni képes vektor használatakor a gazdanövény endogén klorofill szintje lecsökken. A TRV-VIGS vektorba a GFP génnek különböző méretű (100 bp és 300 bp) darabját klónoztuk. GFP-t expresszáló transzgenikus dohány növényeket fertőztünk meg TRV-GFP100 és TRV-GFP300 VIGS vektorokkal. Azt tapasztaltuk, hogy mind a TRV-GFP100 mind, a TRV-GFP300 VIGS vektorral való fertőzéskor a Rubisco és a Gapdh mRNS szintje lecsökkent, hasonlóan a TRV-PDS fertőzésekhez, tehát a Rubisco és a Gapdh gének expressziós változása mögött nem a klorofill szintnek a csökkenése áll. Megvizsgáltuk, hogy a VIGS vektorba épített DNS szekvenciának a mérete és ezen gének expressziós változása között van-e összefüggés. TRV-Upf1 (582 bp) VIGS vektorral fertőztünk dohány növényeket, és megvizsgáltuk a Rubisco és Gapdh gén expressziós szintjét. Hasonlóan a TRV-GFP (100 bp, 300bp) és TRV-PDS fertőzésekhez, ebben az esetben is nagymértékű génextpressziós csökkenést mutattak, tehát ezen gének expressziós változása független a VIGS vektorba épített fragment méretétől és a betöltött funkciójától.

BSMV-VIGS (Üres, PDS) vektorral fertőzött búzánál azt tapasztaltuk, hogy az általunk vizsgált gének Gapdh, Rubisco és aktin expressziós szintje drasztikus mértékben lecsökkent a mock növényekhez képest.

A P19 VIRÁLIS SZUPRESSZOR FEHÉRJE KIS RNS KÖTŐKÉPESSÉGE ÉS A MIR168 SZINTJÉNEK INDUKCIÓJA KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉS VIZSGÁLATA

Megvizsgáltuk, hogy a p19 kis RNS kötő, illetve a miR168 indukció képessége egymástól független funkció-e. Első lépésként a csoportunk által előállított kis RNS kötő képességét elvesztett mutáns p19-3M-et pGEX-2T vektorba klónoztuk és *Escherichia coli* BL21 (DE3) törzsben expresszáltuk ezt követően Band-shift kísérlettel igazoltuk, hogy a rekombináns fehérje elvesztette kis RNS kötő képességét. Azt találtuk, hogy a vad típusú p19 fehérje nagy affinitással köti a kis RNS-eket, ezzel szemben a p19-3M teljesen elvesztette kis RNS kötő képességét, nem mutat részleges kötési aktivitást sem.

Nicotiana benthamiana növényeket fertőztünk CIRV, CIRV és DI RNS-el, CIRV19Stop-al és CIRV-3M-el (mutáns vírus, mely hordozza a p19-3M-et) és vizsgáltuk, a miR168 szintjét. A CIRV és DI RNS-el együttes fertőzésnél, hasonlóan a CIRV-3M fertőzéshez miR168 indukciót tapasztaltunk. A p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő képessége és a miR168 indukciója egymástól függetlenek.

A miR168 INDUKCIÓ VIZSGÁLATA VÍRUSFERTŐZÖTT SZŐLŐBEN

Lágyszárú növényekben vírusfertőzés hatására megemelkedik a miR168 szintje, megvizsgáltuk, hogy fás szárú növényben is fenn áll ez a jelenség vírusfertőzés hatására.

Szőlő Syrah vírussal 1 (GSyV1) és a Szőlő Pinot gris (GPGV) vírussal fertőzött szőlőben, vizsgáltuk a miR168 szintjét. GSyV1-el és a GPGV-el fertőzött mintákban, nem tapasztaltunk miR168 expressziós szint emelkedést a vírusmentes szőlő mintákhoz képest.

Új tudományos eredmények

1. Üres és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokat használva megállapítottam, hogy *Nicotiana benthamiana* gazdanövényen a TRV-VIGS vektor alkalmazása a legoptimálisabb, PVX, TMV-VIGS vektorok esetében a vizsgált gazdagének expressziós szintje megváltozik.
2. Üres és PDS-t tartalmazó VIGS vektorokat használva megállapítottam, hogy *Solanum lycopersicum* gazdanövényen a TMV alapú VIGS vektor a legalkalmasabb VIGS vektor endogén gén vizsgálatára, mivel ezzel fertőzve a gazdanövényt nem tapasztaltunk nagymértékű gén expressziós változást.
3. Üres és PDS-t tartalmazó BSMV-VIGS vektort használva megállapítottam, hogy e VIGS vektor használata a búzán nagymértékű gén expressziós változásokat okoz.
4. Különböző célgén darabokat építve a TRV vektorba bebizonyítottam, hogy e VIGS vektor használatakor a *Nicotiana benthamiana*-n kialakuló génexpressziós változások mértéke függ a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenlététől, de független annak hosszától és funkciójától.
5. A CIRV p19 géncsendesítést gátló fehérjéjét rekombináns, mutáns formában, előállítottam és használatával bebizonyítottam, hogy az általunk előállított CIRV p19-3M elvesztette kis RNS kötő képességét.
6. Megállapítottuk, hogy DI RNS jelenléte nem befolyásolja a p19 szupresszor fehérje közvetítette miR168 indukcióját, tehát a p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő képessége és a miR168 indukciója egymástól függetlenek.
7. GSYV1 és GPGV fertőzött szőlőben megállapítottam, hogy nem indukálódik a miR168 génexpressziós szintje.

Következtetések és javaslatok

VIGS VEKTOROK FERTŐZÉSÉNEK HATÁSA AZ ENDOGÉN GÉNEK EXPRESSZIÓJÁRA

Kísérleteink során olyan endogén gének (Rubisco, Gapdh, Ef, aktin, tubulin) expressziós szintjét vizsgáltuk Northern blottal, amiket gyakran alkalmaznak belső kontrollként VIGS kísérletek során qPCR-nél. Gének funkcióvesztésének vizsgálatakor fontos, hogy a VIGS vektor ne okozzon más génekben expressziós változást. VIGS vektor alkalmazáskor körültekintőnek kell lenni a kvantitatív RT-PCR-nél referencia értéként használt háztartási gének megválasztásakor. qRT-PCR-rel végzett gén expressziós vizsgálatok eredményeinek hitelességéhez elengedhetetlen olyan referencia gén megválasztása, amelynek expressziós szintje nem változik.

Eredményeink azt mutatják, hogy, TMV-VIGS, PVX-VIGS és TRV-VIGS (Üres, PDS) vektorokkal fertőzött dohányban és paradicsomban és BSMV-vel fertőzött búzában, számos esetben drasztikus mértékben lecsökken VIGS vektor alkalmazásakor referencia értéként használt háztartási gének expressziós szintje: Gapdh, Rubisco, Ef, aktin, tubulin, tehát kialakul a shut-off jelenség. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a qRT-PCR során használt referencia génexpressziós szintje növény vírus kapcsolatától függően is változhat, így az adott növény gén funkciójának vizsgálatához olyan vírus vektort célszerű kiválasztani, mely fertőzése során nem alakít ki shut-off-ot a növényben. Vizsgálataink alapján a dohány esetében az általunk vizsgált VIGS vektorok közül, a TRV-VIGS vektor alkalmazása a legoptimálisabb. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a paradicsom esetében a TMV-VIGS vektor nem okoz nagymértékű gén expressziós változást ezért a TMV-VIGS vektor optimális gének funkciójának megállapítására.

Továbbá azt tapasztaltuk, hogy a VIGS vektorba épített idegen szekvencia jelenléte (PDS, GFP 100vbp, GFP 300 bp, UPF 538 bp) expressziós változást idéz elő, amely befolyásolja a shut-off jelenség kialakulását. E jelenség molekuláris háttere nem ismert.

BSMV-VIGS vektorral fertőzött búzánál azt tapasztaltuk, hogy a leggyakrabban alkalmazott referencia gének: aktin, Gapdh és a Rubisco expressziós szintje nagymértékben lecsökkent a mock növényhez képest. BSMV-VIGS vektor alkalmazásakor körültekintőnek kell lenni az eredmények kiértékelésekor, mivel maga a VIGS vektor is nagymértékben képes befolyásolni a gazdanövény génexpressziós rendszerét. Elgondolkodtató, hogy a búzánál BSMV-VIGS esetén, mely referencia gén legalkalmasabb az eredmények kiértékelésére. Egyes kutatások vizsgálata alapján BYDV vírussal fertőzött búzában 4 (Gapdh, 18SRNA, TUBB és EIF4A) referencia gén kombinációja ajánlott a qRT-PCR adatok kiértékelésekor.

Az általunk vizsgált VIGS vektorok, számos esetben nagymértékű génexpressziós változást idéznek elő a gazdanövényben. Kísérleteink rávilágítanak arra, hogy egy idegen

szekvencia jelenléte a VIGS vektorban képes befolyásolni a gazdanövény génexpressziós mintázatát, ezért VIGS vektor alkalmazásakor az eredmények kiértékelésekor fokozottan körültekintőnek kell lenni. Eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy a VIGS csak megfelelő kontroll kísérletek mellett és csak bizonyos gének esetében alkalmazható endogén gének funkciójának megállapítására. A vírus vektor növényi génexpresszióra gyakorolt hatásának vizsgálata tehát alapvető fontosságú a vektorként való használata előtt.

A P19 VIRÁLIS SZUPRESSZOR FEHÉRJE KIS RNS KÖTŐKÉPESSÉGE ÉS A miR168 SZINTJÉNEK INDUKCIÓJA KÖZÖTTI ÖSSZEFÜGGÉS VIZSGÁLATA

Megvizsgáltuk, hogy a p19 kis RNS kötő, illetve a miR168 indukció képessége egymástól független funkció. Eredményeink megmutatták, hogy a p19 szupresszor fehérje kis RNS kötő tulajdonsága nem szükséges a miR168 indukcióhoz. E két tulajdonság egymástól független evolválódott, tehát a vírusok az RNS csendesítés útvonalának különböző pontjain képesek beavatkozni. Összességében elmondható, hogy a növény vírus fegyverkezési versenyben a vírusnak mind a kis RNS kötő mind a miR168 indukció képességére szüksége van, hogy hatékonyan tudja gátolni a növény védekező mechanizmusát.

Továbbá megvizsgáltuk azt, hogy a szőlő esetében GSyV1 és GPGV vírusfertőzések hatására megemelkedik-e a miR168 szintje. Kísérleteink azt mutatták, hogy, e vírusok jelenléte nem növeli meg a miR168 szintjét, ami azzal magyarázható, hogy a fás szárú növényekben nincs szüksége gyors reverzibilis szabályozásra, mint a lágyszárúakban mivel sokkal hosszabb maga a fertőzési folyamat és alacsonyabb a vírus szint.

Nemzetközi tudományos lapokban megjelent publikációk

1. **Enikő Oláh, Réka Pesti, Dénes Taller, Zoltán Havelda and Éva Várallyay. (2016)** Non-targeted effects of VIGS vectors on host endogenous gene expression. Archives of Virology 161, 2387-2393. IF:2,2
2. **Varallyay Eva, Olah Eniko, Havelda Zoltan. (2014)** Independent parallel functions of p19 plant viral suppressor of RNA silencing required for effective suppressor activity NUCLEIC ACIDS RESEARCH 42: pp. 599-608. IF:8,4

Hazai tudományos lapokban megjelent publikációk

1. **Czotter Nikoletta, Szabó Emese, Molnár János, Pesti Réka, Oláh Enikő, Deák Tamás, Bisztray György, Tusnády Gábor, Kocsis László, Burgyán József, Várallyay Éva (2015)** Szőlőültetvényeink metagenomikai diagnosztikája új, hazánkban eddig nem leírt vírusok jelenlétét mutatta ki, NÖVÉNYVÉDELEM 51:(12) pp. 550-558.

Egyéb tudományos művek

Konferencia részvétel

1. **Várallyay Éva, Oláh Enikő, Havelda Zoltan (2015)** Independent parallel functions of p19 plant viral supressor of RNA silencing required for effective supressor activity, Hungarian Molecular Life Sciences, Eger, 27-29 March 2015 ISBN: 978-6155270-15-4
2. **Várallyay Éva, Dalmadi Ágnes, Kis András, Oláh Enikő, Tholt Gergely, Jenes Barnabás, Havelda Zoltán (2015)** Az RNS interferencia szerepe és szabályozása növény-vírus kapcsolatokban és lehetséges alkalmazása, 61. Növényvédelmi Tudományos Napok 2015 február 17-.19. ISSN:0231-2956
3. **Oláh Enikő, Pesti Réka, Taller Dénes, Havelda Zoltán, Várallyay Éva (2014)** Endogén referenciagének megbízhatósága VIGS vektorral fertőzött növényekben, FIBOK, Szeged, 2014. március 7. ISBN:978-963-315-167-9

4. **Éva Várallyay, Enikő Oláh, Zoltán Havelda (2013)** Molecular mechanisms behind symptom development in virus infected plants, 9th International Symposium on Biocatalysis and Agricultural Biotechnology Workshop of PPBA. Piestany, Szlovákia, 2013 October 13-16. ISBN:978-80-970896-6-5
5. **Enikő Oláh, Zoltán Havelda, Éva Várallyay (2013)** Limitation in usage of VIGS vectors in determination of function of endogenous genes in plants, Hungarian Molecular Life Sciences, Siófok, 05-07 May 2013 ISBN: 978-615-5270-02-4
6. **Éva Várallyay, Enikő Oláh, Zoltán Havelda (2012)** Virus specific effects on the host mRNA transcriptoms - limitation of VIGS technique, 7th Cold Spring Harbor Symposium " The Biology of Plants") New York, May 30-June 04. MCI 9-1-800-674-7000
7. **Oláh Enikő, Havelda Zoltán, Várallyay Éva (2012)** VIGS vektorok alkalmazásának korlátai az endogén gének funkciójának megállapításakor, 58. Növényvédelmi Tudományos Napok, Budapest, 2012. Február 21-.22. ISBN:963-8131-071
8. **Oláh Enikő, Havelda Zoltán, Várallyay Éva (2014)** Vannak-e a VIGS-nek nem kívánt mellékhatásai? MBK napok 2014, Gödöllő november 21-22
9. **Várallyay Éva, Oláh Enikő, Havelda Zoltán (2013)** A miR168 indukció szabályozása vírusfertőzött növényekben MBK napok 2013, Gödöllő november 21-22

Ismeretterjesztő

10. **Oláh Enikő, Taller Dénes László, Várallyay Éva (2014)** A növényi biotechnológia eszköztárából: vírusok a biológia szolgálatában, TERMÉSZETBÚVÁR 69:(5) pp. 12-14.