

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS

ECKER ANDRÁS

GÖDÖLLŐ

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

HÍM (ZZ) ÉS NŐIVARÚ (ZW) ŐSIVARSEJT-VONALAK FEJLŐDÉSI POTENCIÁLJÁNAK  
ÖSSZEHASONLÍTÓ VIZSGÁLATA

Ecker András

Gödöllő

2024

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Állatbiotechnológia

**vezetője:** Dr. Mézes Miklós (D.Sc.)  
az MTA rendes tagja, egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi  
Egyetem, Élettani és Takarmányozástani Intézet, Takarmánybiztonsági  
Tanszék

**Témavezető:** Dr. Gócza Elen (D.Sc.)  
az MTA levelező tagja, tudományos tanácsadó, kutatásért felelős  
intézetigazgató-helyettes, tanszékvezető, csoportvezető  
MATE, GBI, Állatbiotechnológiai Tanszék  
Alkalmazott Embriológia és Össejtbiológia Csoport

**Társ-témavezető:** Dr. Várkonyi Eszter (C.Sc.)  
tudományos főmunkatárs  
Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ  
Haszonállat-génmegőrzési Intézet

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása  
Mézes Miklós, MTA doktora

.....  
A témavezető jóváhagyása  
Gócza Elen, MTA doktora

.....  
A társtémavezető jóváhagyása  
Várkonyi Eszter C. Sc.

## I. TARTALOMJEGYZÉK

I.	TARTALOMJEGYZÉK.....	3
II.	JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE.....	7
III.	BEVEZETÉS .....	9
IV.	CÉLKITŰZÉSEK .....	11
V.	IRODALMI ÁTTEKINTÉS .....	13
1.	Szaporodásbiológiai sajátosságok madárfajokban .....	13
1.1.	Nőiivar .....	13
1.2.	Hímivar .....	14
1.3.	Megtermékenyülés .....	15
2.	Az embrionális fejlődés menete madárfajokban .....	16
2.1.	Embrionális fejlődés kezdeti szakaszai.....	16
2.2.	Az embrionális őssejtek szerepe .....	19
3.	A madár ősvarsejtek (PGC) kialakulása és feladata.....	21
3.1.	Eredet és determináció .....	21
3.2.	Azonosítás.....	22
3.3.	Vándorlás .....	24
3.4.	Fejlődés .....	25
4.	A madár ősvarsejtek felhasználási potenciáljai.....	27
4.1.	In vitro tenyésztetőség .....	28
4.2.	Beépülési potenciál .....	29
4.3.	Transzgenézis.....	29
4.4.	Mélyhűtés.....	31
4.5.	Mikotoxinhatások vizsgálata.....	32
5.	A FUCCI transzgén szerepe a sejtenyésztésben.....	34
5.1.	A sejtciklus menete .....	34
5.2.	A FUCCI transzgén felépítése, működési elve .....	35
5.3.	A FUCCI modell felhasználása különböző fajokban.....	37
VI.	ANYAG ÉS MÓDSZER .....	41
1.	A kísérletben résztvevő állományok jellemzése.....	41
1.1.	A fehér magyar tyúkfajta bemutatása.....	41
1.2.	Állatkísérleti engedélyek.....	42
1.3.	Az állományok tartástechnológiája.....	42

2.	Az ősvarsejtek izolálása .....	42
3.	Az ősvarsejt-vonalak alapítása és fenntartása .....	43
4.	Az ősvarsejt-vonalak jellemzése .....	44
4.1.	Ivarmeghatározás .....	44
4.2.	RNS expressziós vizsgálatok .....	44
4.3.	Immunhisztokémiai vizsgálatok .....	45
5.	A sejtvonalak mélyhűtése és felolvasztása.....	45
6.	FUCCI transzgenezis házityúk ősvarsejtekben .....	46
6.1.	Plazmid izolálás .....	46
6.2.	Elektroporálás .....	47
6.3.	Transzgénikus sejtvonalak alapítása és fenntartása .....	48
6.4.	Egysejt alapú klóntenyészetek alapítása .....	48
7.	A FUCCI transzgénikus sejtvonalak stabilitásának igazolása.....	49
7.1.	A beépülési potenciál vizsgálata: FUCCI sejtek injektálása recipiens embriókba .....	49
7.2.	Kromoszóma vizsgálatok.....	50
7.3.	DNS szekvenálás a transzgen beépülésének igazolására.....	50
7.4.	Mikotoxinkezelés alkalmazása a sejtciklus befolyásolására.....	51
7.5.	Timelapse videók készítése a transzgen működésének igazolására.....	52
8.	Statisztikai analízis .....	52
VII.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK.....	53
1.	Az alapított ősvarsejt-vonalak jellemzése .....	53
1.1.	Alapítási statisztika .....	53
1.2.	Ivarmeghatározás .....	53
1.3.	RNS expressziós vizsgálat .....	54
1.4.	Immunhisztokémiai vizsgálat .....	54
2.	A FUCCI sejtvonalak vizsgálatai .....	56
2.1.	Transzgenexpressziós eredmények az elektroporálást követően .....	56
2.2.	Transzgenexpressziós eredmények a klónozást követően .....	56
2.3.	A klón sejtvonalak karakterizálási eredményei.....	58
2.4.	Sejtintegráció hatékonysága recipiens embriókba .....	59
2.5.	Szekvenálási eredmények .....	60
2.6.	A sejtek reakciója mikotoxin hatására és a médiumcsere hiányára .....	61
2.7.	Sejtek transzgenexpressziós változásainak bizonyítása.....	66
VIII.	KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK .....	67
1.	Javaslatok .....	68
IX.	ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK.....	71

X.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	73
XI.	SUMMARY .....	75
XII.	IRODALOMJEGYZÉK.....	77
XIII.	TOVÁBBI MELLÉKLETEK.....	95
1.	M1 – Házityúk ősvarsejtek tenyésztőmédiumának pontos összetétele.....	95
2.	M2 – PCR és qPCR paraméterek .....	95
3.	M3 - Immunhisztokémiai festés pontos protokollja és reagensei .....	97
4.	M4 – Szekvenálási kiegészítő adatok.....	98
5.	M5 – Linkek a sejtvonalakról készült timelapse videókhoz .....	99
XIV.	FONTOSABB PUBLIKÁCIÓK .....	101
XV.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	103



## II. JELÖLÉSEK, RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- ASC:** felnőtt eredetű őssejt (adult stem cell)
- bFGF:** béta fibroblaszt növekedési faktor (beta fibroblast growth factor)
- BSA:** szarvasmarha albumin szérum (bovine serum albumin)
- CDK:** ciklin függő kináz (cyclin dependent kinase)
- Cdt1:** kromatin szabályozó és DNS replikációs faktor 1 (Chromatin Licensing and DNA Replication Factor 1)
- CHD1:** kromodomén helikáz DNS-kötő fehérje 1 (chromodomain helicase DNA binding protein 1)
- cPGC:** keringő ősvarsejt (circulating primordial germ cell)
- CVH:** házityúk *Vasa* homológ (chicken *Vasa* homolog)
- CYP26B1:** citokróm P450 26-os család, B alcsalád, 1. tag (cytochrome P450 family 26, subfamily B member 1)
- DAZL:** törölt azoospermia-szerű gén (deleted azoospermia-like gene)
- DMSO:** dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
- DND1:** házityúk dead end homológ (chicken dead end homolog)
- EGK:** Eyal-Giladi-Kochav-féle embriófejlődési stádium
- EMA-1:** embrionális egér antigén 1 (embryonic mouse antigen 1)
- EpiSC:** epiblaszt őssejt (epiblast stem cell)
- ESC:** embrionális őssejt (embryonic stem cell)
- FAO:** Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (Food and Agriculture Organization)
- FBS:** magzati szarvasmarha szérum (fetal bovine serum)
- FUCCI:** fluoreszcens ubikvitináció alapú sejtciklus indikátor (fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator)
- GAPDH:** gliceraldehid-3-foszfát dehidrogenáz (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)
- GGC:** gonád eredetű ősvarsejt (gonadal germ cell)
- gPGC:** gonád eredetű ősvarsejt (gonadal primordial germ cell)
- HeLa:** immortalizált cervikális karcinóma sejt (a név Henrietta Lacks, a donor személy nevéből származik)
- HH:** Hamburger és Hamilton-féle embriófejlődési stádium
- IGV:** integratív genom képalkotó szoftver (Integrative Genomics Viewer)
- mAG:** monomerikus Azami zöld riportergén (monomeric Azami green)
- MATE GBI:** Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet



**MDM2:** rágcsáló/egér dupla perc 2 (murine/mouse double minute 2)

**MEM:** módosított Eagle médium (modified Eagle medium)

**mKO2:** monomerikus Kusabira narancs 2 riportergén (monomeric Kusabira orange)

**MTOC:** mikrotubulus organizációs center (microtubule organizing center)

**NBGK HGI:** Nemzeti Biodiverzitás és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézet

**PAS:** perjódsav és Schiff-reagens festés (periodic acid – Schiff)

**PCR:** polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction)

**PFA:** paraformaldehid (paraphormaldehyde)

**PGC:** ősvarsejt (primordial germ cell)

**RAR:** retinolsav receptor (retinoic acid receptor)

**RB:** retinoblasztóma fehérje (retinoblastoma protein)

**RLDH:** retinaldehid-dehidrogenáz enzim (retinaldehyde dehydrogenase)

**rt-PCR/qPCR:** kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (quantitative real-time polymerase chain reaction)

**RXR:** retinoid X receptor

**SSEA:** fázis-specifikus embrionális antitest marker család (stage-specific embryonic antigen)

**SST:** spermium tároló tubulusok (sperm storage tubules)

**TO-PRO-3:** tiazol piros magfesték (Thiazole Red)

### III. BEVEZETÉS

Napjainkban a mezőgazdaság termelési tendenciái a modern állományok uniformizálására törekszenek a nagyobb mennyiségű termék előállítására céljából. A termelők sokkal inkább a nagy termelési értékkel rendelkező fajtákat és hibrideket preferálják, míg a klasszikus tájfajták a háztáji tartás körülményei közé szorulnak vissza, extrém esetekben pedig akár el is tűnhetnek. A FAO adatai szerint a baromfihús termelés jelentős részét a brojler hibridek teszik ki. A tojáshasznú fajták esetében szintén leginkább kereskedelmi fajtákat használnak, ezek ugyanis ötször annyi tojást tudnak termelni évente, mint a hagyományos fajták. Ennek tudható be, hogy a Földön megtalálható több mint 1600 házityúk (*Gallus gallus domesticus*) fajtából csupán keveset tenyésztnek nagy populációkban (FAO, 2023).

A termelésből kiszoruló fajták védelmét génmegőrzéssel próbálják megoldani különböző állami és civil szervezetek. Többféle génmegőrzési módszer létezik, amelyeken belül megkülönböztetünk *in vivo* és *in vitro* lehetőségeket. Az *in vivo* génmegőrzés alatt azt értjük, hogy az állatokat természetes tartási körülmények között, élő állományokban tartják. Ez az eljárás nem optimális, ugyanis komoly fenntartási költségekkel (takarmányozási, gondozási, állategészségügyi költségek) jár, valamint az állatok a járványoknak és egyéb természeti fenyegetéseknek vannak kitéve. Ezzel szemben az *in vitro* módszerek során az állatok sejtjeit vagy szöveteit labor körülmények között, mélyhűtve őrizzük meg, amiből később visszanyerhetjük a faj egyedeit. Ennek hátránya a sejtek felvételének és az állatok visszanyerésének magas infrastrukturális költsége, előnye viszont, hogy a genetikai állomány hosszú távon, jól konzerválva megőrizhető.

A génmegőrzéshez használt sejt- vagy szövettípus a megőrzendő faj függvényében változik. Emlősök esetén a spermamélyhűtés technológiája a legszéleskörűbben bevett módszer (Ugur et al., 2019; Yánez-Ortiz et al., 2022). Madárfajok esetén azonban, köszönhetően a madarak speciális szaporodásbiológiai sajátosságainak, ez a technológia csak rész megoldást jelent. Ígéretes eredményeket mutat ezen a téren az ősvarsejtek (primordial germ cells, PGCs) (Petitte, 2006) vagy a gonádszövetek mélyhűtése (Hu et al., 2022; Liptoi et al., 2013; Liptoi et al., 2020; Tiambo et al., 2021), azonban ezek a módszerek a legtöbb fajban még fejlesztésre szorulnak.

Az ősvarsejtek unipotens sejtek, melyek az ivarsejtek elősejtjei (Kimura and Nakano, 2011). Felhasználásuk a kutatásban rendkívül széleskörű, ugyanis a génmegőrzés (Lázár et al., 2021) mellett szaporodásbiológiát érintő állategészségügyi kísérletekben (Trefil et al., 2017), ivarszervi kiméra egyedek előállításában (Tajima et al., 1998) valamint a madarak transzgenézisében (Divya et al., 2021) is jelentős szerepet játszanak. Házityúk fajban a PG-sejtek izolálása és

tenyésztése jól megoldható, köszönhetően a megfelelően működő módszerek és tenyésztőmédiumok leírásának. Ezen *in vitro* tenyészetek kiváló alapot biztosítanak a fent említett kutatások elvégzéséhez, amennyiben a sejt kultúrák kielégítő számú és egészségi állapotú sejtből állnak. Ennek ellenőrzésére többféle módszer áll rendelkezésünkre, azonban ezek jó része káros lehet a sejtekre nézve, így csak kisszámú sejten végzett mérések alapján következtethetünk a teljes tenyészet állapotára.

Egy teljes tenyészet monitorozásához szolgáltat lehetőséget a FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) transzgén komplex. Ez az eszköz a sejt ciklus során periodikusan expresszálni fehérjék jelenségére alapoz (Blow and Dutta, 2005). Mivel a sejt ciklus bizonyos szakaszain az arra a szakaszra specifikus fehérjék termelődnek a sejtben, ezekhez a fehérjékhez különböző színű fluoreszcenciával jelölt riportergént kapcsolva a sejt ciklikus színváltozáson mehet keresztül a sejtosztódás lépcsői során. Ezzel olyan sejttenyészeteket hozhatunk létre, amelyeken megfelelő gerjesztéssel a teljes tenyészetet figyelembe véve vizsgálhatjuk a sejtek aktuális egészségi állapotát és alkalmazhatóságát kísérleti felhasználásra.

Bár eddig több fajon és több sejt típuson sikerült alkalmazni a FUCCI transzgént, még nincs precedens házityúk fajtából FUCCI pozitív sejtek létrehozására. A jelen dolgozat alapjául szolgáló kísérlet ezt a célt tűzte ki maga elé.

## IV. CÉLKITŰZÉSEK

A kísérlet során kitűzött célok a következők voltak:

- ~ házityúk PG sejtvonalak alapítása, fenntartása és jellemzése,
- ~ FUCCI plazmid előállítás kompetens sejtek segítségével,
- ~ FUCCI komplex transzfektálása házityúk ősvarsejtekbe,
- ~ stabil transzgénikus sejt kultúrák létrehozása és jellemzése,
- ~ stabil egysejt eredetű klóntenyészetek létrehozása és jellemzése,
- ~ a FUCCI transzgén jelenlétének bizonyítása,
- ~ mikotoxinhatás vizsgálata FUCCI pozitív sejteken.



## V. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 1. Szaporodásbiológiai sajátosságok madárfajokban

A madárfajok szaporodásbiológiai jellegzetességei több szempontból is jelentős eltérést mutatnak az emlősökétől. Ezeket a speciális tulajdonságokat hasonlítottam össze a további alfejezetekben.

#### 1.1. Nőivar

Madárfajok esetén az ivarspecifikus kromoszómák elnevezése különbözik az emlősöknél megszokottaktól. A kiindulási ivari kromoszómát itt Z-vel jelölik, míg ennek módosult változatát W-vel, ellentétben az emlősöknél megszokott X és Y elnevezéssel. Ennek a nevezéktanban tapasztalt különbségnek az az oka, hogy a madaraknál a nőivar a heterogamétás (ZW), míg a hím a homogamétás (ZZ) ivar, ami ellentétes az emlősfajoknál tapasztaltakkal (Boutette et al., 2000).

A gonádok szexuális differenciálódása házityúk esetén az embrionális fejlődés ötödik napján indul meg (Witschi, 1961). Nőivarban ez a fejlődés aszimmetrikus, a legtöbb esetben (kivéve a kiwit (*Apteryx australis*) és néhány ragadozó fajt) a baloldali gonád fejlődik tovább, míg a jobboldali fokozatosan visszafejlődik, ennek köszönhetően az ivarérettség elérésekor már csak egy működő petefészkek található az állatokban (King and McLelland, 1984a).

A spermiumok hosszútávú tárolásának képessége is jellemző a madarakra, mégha nem is specifikusan csak rájuk jellemző. Eddigi ismereteink szerint több rovar, hal, kétélű, hüllő és emlős faj is rendelkezik ezzel a taktikával, annak érdekében, hogy a fogamzás ne legyen szigorúan a hímmel való párosodás időpontjához kötve (Birkhead and Moller, 1993; Holt, 2011; Holt and Lloyd, 2010). Emellett a spermiumtárolás segít a genetikai szelekcióban is, hiszen a nőivarú állatok így egyszerre több hím örökítőanyagát is képesek eltárolni, amiből a legrátermettebb sejtek lesznek csak képesek végül megtermékenyíteni a petesejtet (Sasanami et al., 2013).

Madarak esetén ezeket a rezervoárokat spermium tároló tubulusoknak (SST, sperm storage tubules) nevezik, és az utero-vaginális szűkületben, valamint az infundibulumban helyezkednek el (Bobr et al., 1963; Brillard, 1993; Frieß et al., 1978; Schindler et al., 1967). Míg más állatfajokban (rovarok, hüllők) akár évekig is sikeres lehet az örökítőanyag eltárolása, addig madarak esetén ez 2-15 hétre tehető (Bakst, 2011; Bakst et al., 1994). Magát a spermium eltárolását fajonként eltérő mélységű, 10-20 µm szájátmérőjű tubulusok végzik, melyek például a házityúk esetén 4-5000 darabszámmal vannak jelen (Bakst et al., 2010). Kapacitásuk a pázás

során bejutó spermiumok 1-2%-át teszi ki, ami már önmagában komoly szelekció elé állítja a hímivarsejteket. Ürülésük periodikus, házityúk esetén naponta kb. 30% körüli mennyiséggel. Tanulmányok bizonyították, hogy korreláció van a tubulusok száma és a fertilis időszak hossza között, de ezt az állat életkora is jelentősen befolyásolja. Minél idősebb egy egyed, annál rövidebb lesz a termékeny periódus (Brillard, 1993).

## 1.2. Hímivar

A nőivarhoz hasonlóan madarak esetén a hímivar is rendelkezik sajátosságokkal a szaporodásbiológia terén. Ezek közül a legszembetűnőbb a reproduktív szervrendszer bizonyos tagjainak elhelyezkedése lehet. A herék például a hasüreg háti oldalán, a vesék ventrális oldalán helyezkednek el, így az emlősökhöz képest jóval magasabb hőmérsékleten (madarak esetén a testhőmérséklet 38-40 °C) is tökéletesen működnek. Felépítésükben is találunk érdekességeket. Alapvetően kanyarulatós csatornácskákból és az ezek struktúráját rögzítő intersticiális kötőszövetből állnak, azonban míg az emlősök esetén a herék lebenyes felépítésűek, madaraknál ilyen rendeződést nem találunk (King and McLelland, 1984b). Fontos eltérés még, hogy a kanyarulatós csatornácskák nem végződnek vakon, hanem egymásba fonódva rendszert alkotnak (Péczeley, 2013).

Hosszú évekre visszanyúló vitákra ad okot a mellékhere szerepe a spermiumok érésében és a maximális termékenyítőképességük elérésében. Bár az elfogadott álláspont szerint a spermiumok érési idejük nagy részét (90% körül) az ondóvezetőben töltik, valamint itt is tárolódnak (Asano and Tajima, 2017; Péczeley, 2013), több tanulmány hipotézise szerint a mellékhere közege szintén felkészítheti őket a termékenyítésre. Az előbbi felvetést alátámasztja a tény, hogy madarak heréjéből direkt izolált spermamintákkal már végeztek sikeres mesterséges termékenyítést (Howarth, 1971), azaz itt nincs szükség az emlősöknél jellemző hosszabb poszttesztikuláris érési periódusra (Olsen & Neher, 1948). Ezzel szemben Esponda és munkatársai, valamint Morris és munkatársai bizonyították, hogy a mellékherében töltött időszak alatt a spermiumokra különböző fehérjék kötődnek, melyek aktívak maradnak a női nemi traktusokban is, ennek célja pedig feltehetően a termékenyítés elősegítése lehet (Esponda and Bedford, 1985; Morris et al., 1987).

Érdekes lokációja van madarakban a párzószervecnek, vagyis a *phallusnak* is. Maga a *phallus* és az ondóvezeték (*ductus deferens*) a kloákában helyezkedik el, azonban különböző helyen. A kloáka három részre osztható: a *coprodaeumra*, az *urodaeumra* és a *proctodaeumra*. A *coprodaeum* az ürülék tárolására szolgál, ezzel szemben az *urodaeumban* a vizelet gyűlik fel, valamint ide köt be a *ductus deferens* is. A *phallus* a *proctodaeumban* található (Pollock and Orosz, 2002). Működése hasonló az emlősökéhez annyiból, hogy szexuális stimulus hatására hormonális (Nishiyama, 1954) vezérlésű izom- és vérrendszeri reakció lép életbe, amitől a

*phallus* megdagad (Nishiyama, 1950). A *phallus* felépítése fajonként jelentősen eltérő lehet, így például víziszárnyasok esetén kiölthető *phallusról* (*phallus protrudens*), míg többek között házityúknál nem kiölthető *phallusról* (*phallus nonprotrudens*) beszélhetünk (King and McLelland, 1984b).

A spermiumokról elmondható, hogy alapvető felépítésük hasonló az emlősökéhez: struktúrájuk az akroszómára, a nukleuszra és a flagellumra tagolható. Ezen kívül azonban jelentősen diverz a spermium morfológiája, nemcsak az emlősökhöz viszonyítva, hanem az egyes madárfajok között is. Ez leginkább a fej formájában figyelhető meg (Aire, 2014). Az emlősökkel összehasonlítva kijelenthető, hogy madaraknál a spermium nyaki része kevésbé keskenyedik el, és összeköttetése a fej és a középrész között egyszerűbb. Ennek köszönhetően egyes szemléletek szerint nem is különíthető el a nyaki rész a madarak hímivarsejtjei esetén (Asano and Tajima, 2017), hacsak nincs citoplazma maradvány a nukleusz tövénél, ahogy azt az emunál (*Dromaius novaehollandiae*) láthatjuk (Du Plessis and Soley, 2014).

### 1.3. Megtermékenyülés

Madarak esetén a megtermékenyülés folyamatának egyik legjellegzetesebb aspektusa a polispermia jelensége. Ez azt jelenti, hogy egy időben több spermium hatol át a petesejt burkán. Míg ez a legtöbb állatfaj esetén azonnali vetélést vagy fejlődési rendellenességeket okoz (Uchida and Freeman, 1985), addig madaraknál ez egy természetes folyamat. Fontos azonban megjegyezni, hogy a petesejtet csak egy, a petesejthez legközelebb érkező spermium termékenyíti meg, így a diploiditás megmarad az utódnál is.

Kutatások bizonyították, hogy a túl sok (Bohr et al., 1963) és a túl kevés (Christensen et al., 2005) behatoló spermasejt is negatív hatással lehet az embriófejlődésre. Az óvatosabb becslések szerint átlagosan 20 penetrációs nyílás figyelhető meg madaraknál (Mizushima, 2017), amit több fajon folytatott vizsgálatok alapján kalkuláltak ki (Fofanova, 1965; Harper, 1904; Nakanishi et al., 1990; Patterson, 1910; Waddington et al., 1998). Házityúk esetén az eddig megfigyelt legmagasabb penetrációs nyílásszám a szikmembránon 62 volt (Nakanishi et al., 1990).

A polispermia feltehetően részben a meghosszabbodott petesejt-spermium interakció oka is, hiszen ennek köszönhetően hosszabb idő áll rendelkezésre a petesejt membránján való áthaladásra. Több publikáció is alátámasztotta (Hrabia et al., 2003; Mizushima et al., 2009; Mizushima et al., 2014; Takagi et al., 2007) azt a hipotézist, hogy a polispermia elsődleges célja, hogy a hatalmas madár petesejten több pontból is elinduljon a  $Ca^{2+}$  aktivációs hullám, így jobb hatásokra emelve a termékenyülést, amire egy spermium nem lenne képes (Mizushima, 2017).



## 2. Az embrionális fejlődés menete madárfajokban

Miután bemutattam a madarak szaporodásbiológiájára jellemző alapvető sajátosságokat, ebben a fejezetben az embrionális fejlődés fontosabb mozzanatait elemzem. Mivel munkám a házityúk fajra fókuszált, valamint irodalmilag is ez a legjobban dokumentált madárfaj, így ezen a fajon keresztül prezentálom a madarakra jellemző embriológiai fejlődést.

### 2.1. Embrionális fejlődés kezdeti szakaszai

Az embrionális fejlődés minden gerinces életforma esetén hasonló. Alapvetően három nagyobb szakaszra osztható. A kezdeti szakasz a barázdálódás, melynek során az egysejtes embrió gyors osztódásokon megy keresztül. Ezt követi a gasztruláció, amely során kialakul a három elkülönülő sejtréteg: az embrionális ektoderma, mezoderma és endoderma. A gasztruláció végére az ektoderma beborítja a másik két réteget. Az ektodermából fejlődik majd ki a bőr és az idegrendszer, míg a mezoderma többek között a csontok, izmok, kötőszövetek, vesék, a szív és a vér kialakításáért lesz felelős, az endoderma pedig a bélrendszer, a máj és a tüdő felépítésére hivatott. A harmadik nagyobb fejlődési szakaszt organogenezisnek hívjuk, ekkor fejlődnek ki az egyes szervek (Wolpert et al., 2010).

Madarak esetén fontos jellemző, hogy csak a barázdálódás és a korai gasztruláció zajlik az anya szervezetén belül, míg a kései gasztruláció és az organogenezis már a megtojt tojásban történik meg (Péczely, 2013). Ennek is köszönhető, hogy két nevezéktant különítünk el. Az első az Eyal-Giladi és Kochav kutatásaihoz fűződő nevezék (Kochav et al., 1980), mely a fejlődést a megtermékenyüléstől a primitív csík kialakulásáig osztályozza római számokkal (EGK I-XIV.). Ez összesen tizennégy stádiumot különböztet meg. Ezzel szemben a Hamburger és Hamilton által felállított metódus alapján (Hamburger and Hamilton, 1951) a teljes EGK skála az 1. stádiumba sorolandó, míg a 2-46. stádiumba a primitív csík megjelenésétől a kikelésig tartó fejlődési szakasz oszlik szét.

Az embrionális fejlődés a megtermékenyítéssel kezdődik, mely madárfajok esetén a petevezető (*infundibulum*) első szakaszában történik. Összesen 18 perc szükséges a petevezetőn való áthaladáshoz, ahonnan a szik felszínén elhelyezkedő zigóta a magnumba kerül. Itt nagyjából 174 percet tölt el a megtermékenyült petesejt, ami alatt egyenletes forgást végezve a fehérjerétegek rárakódnak. Továbbhaladva az istmusba, 74 percre van szükség a héjhártyák és a sárgája pozícióját biztosító jégzsinór kifejlődéséhez. Végül a meszes héj szekréciója igényli a leghosszabb időt, ehhez 20 órára van szükség. A vaginán való áthaladás még 40 percbe kerül, így összesen kicsivel több, mint 25 órát igényel egy tojás megtojása (Warren and Scott, 1935).

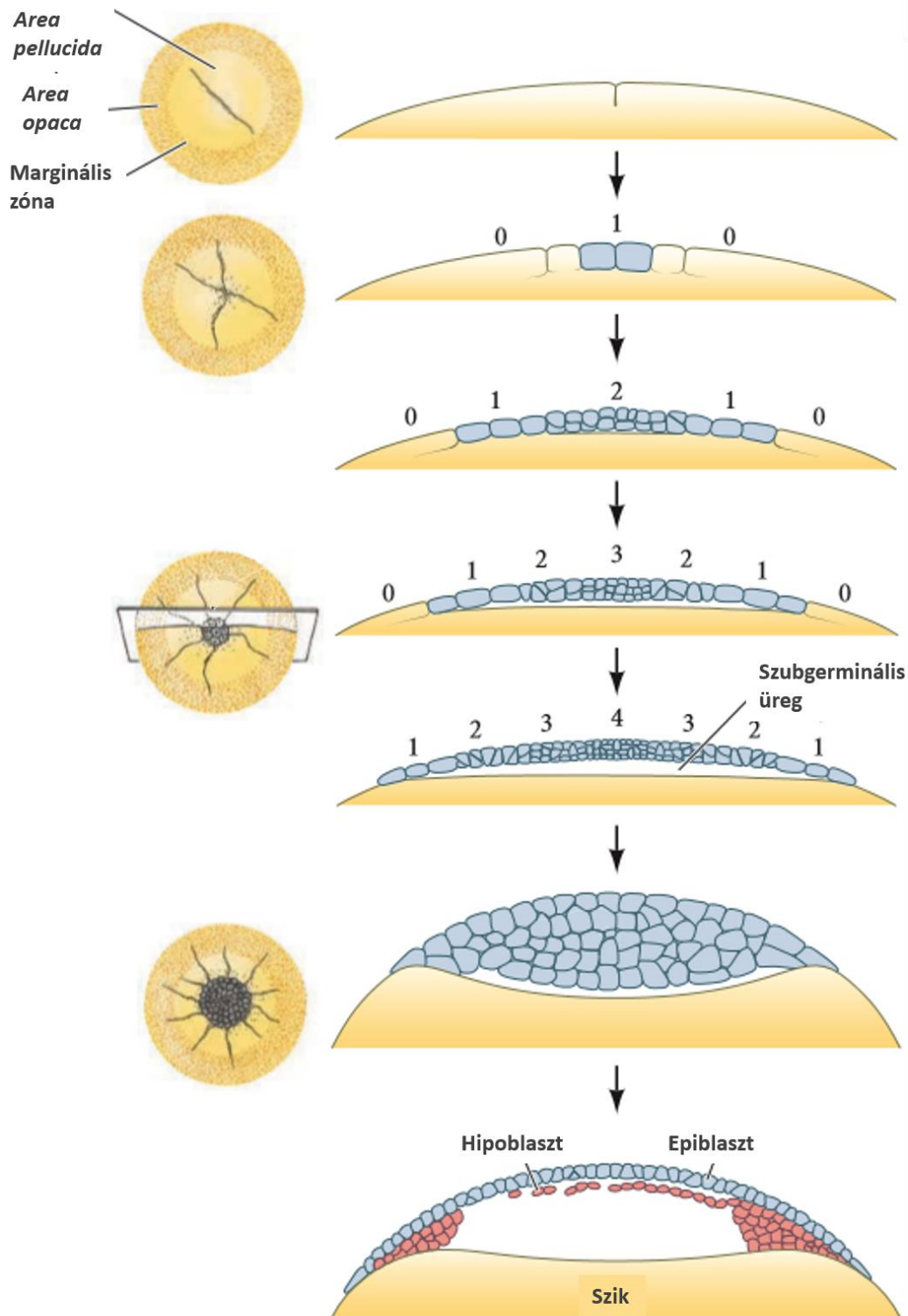
A megtermékenyülés és a barázdálódás kezdete is úgy zajlik le, hogy a petesejtet még nem borítja sem a tojásfehérje, sem a héj. A barázdálódás az embrionális fejlődés első napján megy végbe, a zigóta egy része (meroblasztikus barázdálódás) mitotikus osztódások sorozatával egyre kisebb sejteket, blasztomérákat hoz létre. A hatalmas szik tetején (telolecitálisan) elhelyezkedő csírákorong (blasztodiszk) közepén megy végbe az első barázdálódás, ami még 1 sejtrétegű és a szikanyaggal bazálisan kapcsolt sejtekből áll. Ezt újabb osztódások követik, kialakítva a csírahártyát (blasztoderma) (Gilbert and Barresi, 2016). Ezután középvonali és ventrális osztódásokkal kialakul a szoros kapcsolódásokkal összekötött 4 sejtrétegű szövetkezdemény (Bellairs et al., 1978). A génexpresszió a 7. és 8. osztódás között, kb. 128 sejtés stádiumban vált át anyai eredetről a zigóta által szabályozottra (Nagai et al., 2015).

A blasztoderma alatt a fehérjéből történő víz abszorpciónak és a folyadék szikoldali kiválasztásának köszönhetően kialakul a szubgerminális üreg (New, 1956). A csírákorong központi sejtjeinek mélyebb rétegei elhalnak és leválnak, így létrehozva az 1 sejtréteg vastag *area pellucidát*, amit gyűrűként a vastagabb *area opaca* vesz körül. Az *area pellucidából* formálódik majd ki az embrió nagy része. A szubgerminális üreg, az *area pellucida* és az *area opaca* kifejlődésével létrejön a blasztula állapot, ezzel véget ér a barázdálódás teljes szakasza (1. ábra) és kezdetét veszi a gasztruláció (Gilbert and Barresi, 2016).

A tojás megtojásakor a blasztoderma már kb. 50.000 sejtéből áll. Az *area pellucida* sejtjeinek nagy része a felszínen marad, kialakítva az epiblasztot. A megtojás után az *area pellucida posterior* oldalán az epiblaszt megvastagszik, létrehozva a Koller-sarlót, valamint a Koller-sarló és az *area opaca* közötti *posterior* marginális zónát (PMZ). Ezután a PMZ és az *area pellucida* közti sejtréteg a felszín alá migrál, valamint az epiblaszt *anterior* részén 5-20 sejtéből álló klaszterek, 'hipoblaszt-szigetek' alakulnak ki, melyek egymásba olvadva kialakítják az elsődleges hipoblasztot. Ez után egyesül a Koller-sarló sejtrétegével, így megszületik a másodlagos hipoblaszt (kész hipoblaszt vagy endoblaszt) is (Eyal-Giladi et al., 1992; Stern, 2004).

A kialakult epiblaszt és hipoblaszt az *area opaca* marginális zónájánál kapcsolódik össze, a két réteg között létrejövő üreggel pedig megformálódik a blasztocöl. A fejlődés további szakaszaiban az epiblasztból alakul ki az embrió három fő rétege, valamint az extraembrionális membránok nagy része, míg a hipoblaszt a membránok egyes részeit építi fel, valamint szerepe van az epiblaszt sejtek migrációjának irányításában (Rosenquist, 1966; Rosenquist, 1972; Schoenwolf, 1991).

A primitív csík formálódása a Koller-sarlóból és a felette levő epiblaszt rétegből indul (Bachvarova et al., 1998). A primitív csík *anterior* végén jelenik meg a Hansen-csomó, amin



**1. Ábra: A barázdálódás folyamata madár embriókban.** A folyamat első osztódása a blasztodiszka centrális területén történik, amit további osztódások követnek, egy egysoros sejtréteget kialakítva. Ez eleinte szorosan egymás mellett levő, a szikhez bazálisan kötődő sejtekből áll, majd később horizontális és vertikális osztódásoknak köszönhetően 5-6 sejt vastagságú réteget hoz létre. Ekkor alakul ki az area pellucida, mely a blasztodiszka központi részén elhelyezkedő vékonyabb, áttetsző régió. Később ebből fejlődnek ki az embrionális szövetek. Ezt a külső szikre illeszkedő, vastagabb gyűrű, az area opaca veszi körbe. Az area pellucida sejtszöveti víz fel a fehérjétegből, majd ezt a szik felőli oldalon szekretálják, ezzel egy üreget képezve a blasztodiszka ventrális oldalán, amit szubgerminális üregnek neveznek. Az ábra számai az adott terület sejtrétegeinek számát jelölik. (Módosítva Bellairs et al., 1978; Gilbert & Barresi, 2016; Nagai et al., 2015 nyomán.)

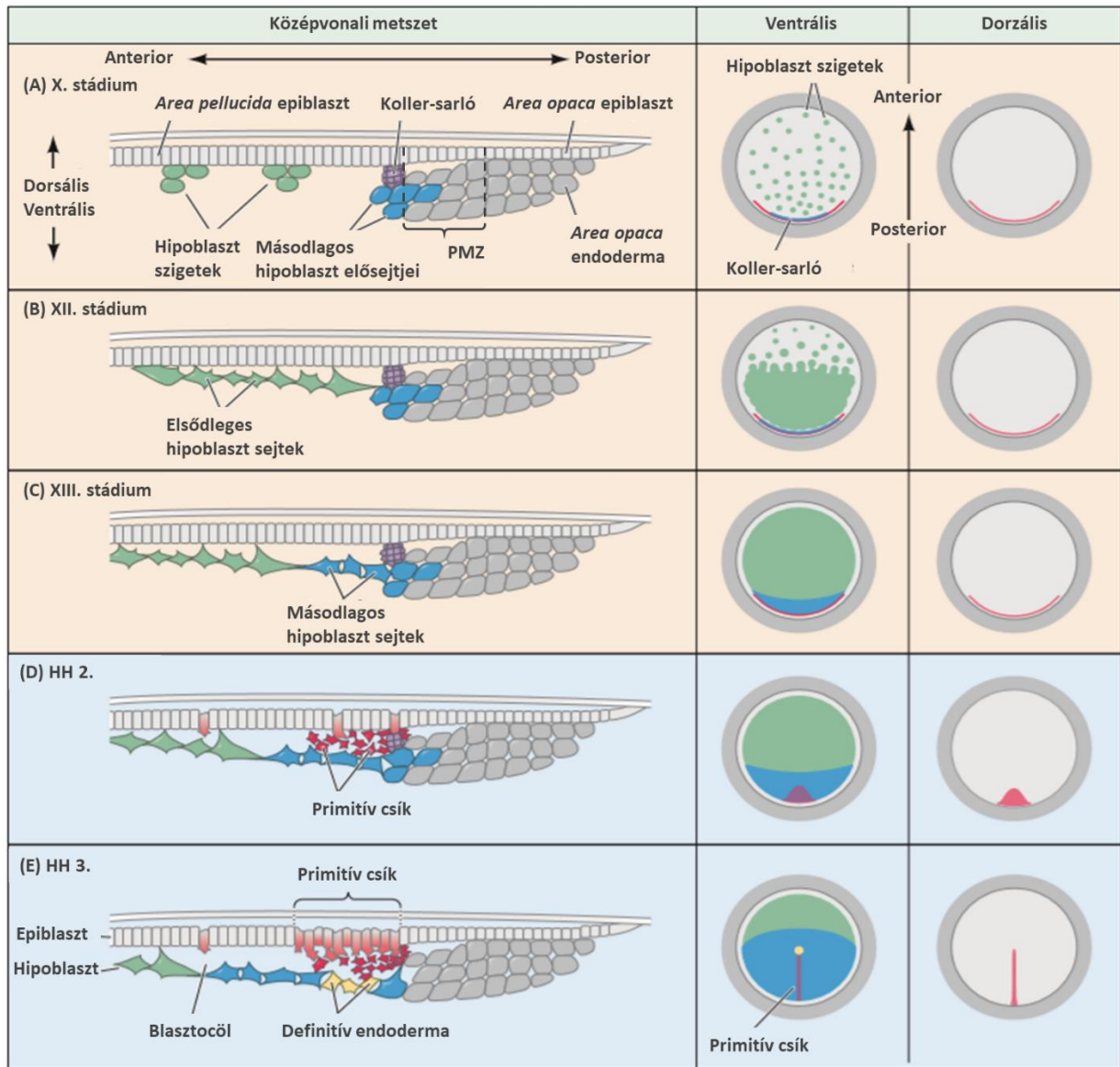
keresztül sejtek migrálhatnak az embrió mélyebb rétegeibe. Az első sejtek, melyek áthaladnak a Hansen-csomón, fogják kialakítani az endodermát. Ezek a sejtek a hipoblaszt sejtek helyére épülnek be, a kiszorított hipoblaszt sejtek pedig visszahúzódnak az *area pellucida anterior* régióiba, ahol létrehozzák a germinális félholdat, ami bár nem lesz része magának az embriónak, a továbbiakban nagyon fontos szerepe lesz a kutatásom szempontjából, ugyanis itt termelődnek majd az ősvarsejtek (Gilbert and Barresi, 2016).

Ezt követően további sejtek migrálnak a Hansen-csomón keresztül az embrióba, amik az *anterior* részekén a mezoderma feji részét és a gerinchúrt (notochord), a *posterior* részekén pedig a mezoderma maradék részét hozzák létre. Ezek a sejtek már a gasztruláció megindulása előtt specifikáltak az egyes rétegek kialakítására, azonban aktivációjukhoz szükség van a primitív csík képződésére (Chapman et al., 2007). Ezek után a primitív csík visszafejlődik, az epiblasztban pedig már csak az ektoderma kialakításához szükséges sejtek maradnak. Mire az ektoderma körbeöleli az embriót, az endoderma átveszi a hipoblaszt helyét, a mezoderma pedig a két réteg közé helyeződik, a gasztruláció folyamata lezártnak tekinthető (2. *Ábra*) (Gilbert and Barresi, 2016).

A következő stádium az organogenezis, mely az embrió kraniális végénél indul meg, és feladata, hogy az állat kikeléséig kifejlődjön minden szerv és szervrendszer. Ez a szakasz azonban már nem kapcsolódik szorosan az általam bemutatni kívánt kísérlethez, így a prezentálását mellőzöm.

### *1.1. Az embrionális őssejtek szerepe*

Az őssejtek asszimétrikus osztódás esetében egy önmagukhoz hasonló, és egy olyan progenitor sejtet hoznak létre, amely rendelkezik a differenciálódás képességével, így kialakulhatnak abból specializálódott utódsejtek. Totipotens sejteknek nevezzük azokat a sejteket, melyek képesek bármilyen szövetté vagy szervvé differenciálódni, így embrionális és extraembrionális sejtek is kialakulhatnak azokból. Totipotensnek tekinthető a megtermékenyített petesejt, valamint emlősök esetén a 4-8 sejtés embrió sejtjei. Ezzel szemben a hólyagcsíra állapotú embrió (blasztociszta) esetében az embriócsomót alkotó sejtek pluripotensek, vagyis csak a fejlődő magzat embrionális részeit képesek létrehozni, extraembrionális részek kialakítására nem képesek. A későbbi fejlődés során multipotens sejtek képződnek, melyek egy adott szövettípusra jellemző sejtek létrehozására képesek. A felnőtt egyedekben pedig unipotens sejtekkel találkozhatunk, melyek már csupán egy sejtípus létrehozására képesek (pl. spermatozóniák) (Gilbert and Barresi, 2016).



**2. Ábra: Gasztruláció bemutatása madár embriókban.** A kezdeti lépés az area pellucida bizonyos sejtjeinek ventrális irányú vándorlása (A). Ezek a sejtek a hipoblaszt szigetek, melyek összeolvadva kialakítják a szubgerminális üregben az elsődleges hipoblasztot (B). Az embriódiszk posterior végén található Koller-sarló mellől, a posterior marginális zónából (PMZ, az area opaca része) ezután sejtek indulnak anterior irányba, kialakítva a másodlagos hipoblasztot (C). Ezzel a hipoblaszt kialakulása véget ér; innentől az area pellucida sejtjeit, tehát az embriódiszk dorzális sejtrétegét epiblaszt rétegnek nevezzük, míg az epiblaszt és hipoblaszt között húzódo üreget blasztocölnek hívjuk. A következő szakaszban újabb sejt-vándorlás indul meg, ezúttal a három csíralemez kialakítása érdekében (D). A PMZ-ből az epiblaszt sejtek ventrális irányban a blasztocölbe migrálnak, mindezt az embriódiszk közepén anterior irányba haladva, jellegzetes csík alakzatot létrehozva. Ezt a képletet nevezzük primitív csíknak, aminek anterior végén helyezkedik el a Hansen-csomó (E). Az ezen vándorlás során a blasztocölbe gyűlő sejtek hozzák létre a mezodermát, míg az epiblasztban maradó sejtek az ektoderma kialakításáért felelnek. Bizonyos sejtek azonban a blasztocölön keresztül egészen a hipoblaszt rétegig jutnak, így létrehozva egy vegyes eredetű ventrális réteget, melynek az endoderma kialakításában lesz szerepe. (Módosítva Gilbert & Barresi, 2016; Stern, 2004 nyomán.)

Embrionális őssejtek (ESC) mellett felnőtt őssejtekről (ASC) is beszélhetünk. Utóbbiak a test több szervében, köztük a bélben (Potten and Morris, 1988), a csontvelőben (Graham and Wright, 1997) és a bőr alsó rétegében találhatóak (Watt, 1998). Dolgozatomban az embrionális őssejteket mutatom be részletesebben. Emlősök esetében az ESC vonalakat a blasztociszta embriócsomójából, madarak esetében pedig az *area pellucidá*ból lehet létrehozni. Az elsőként

létrehozott madár ESC vonalából nem alakultak ki ivarsejtek, csak a szomatikus sejtek jöttek létre (Laval and Pain, 2010). Azonban, ha madár ESC-eket a szubgerminális üregbe juttatták, már csírasejtek is létrejöhetnek azokból (Carsience et al., 1993; Kino et al., 1997; Petite et al., 1990).

A blasztociszta embriócsomójában található sejtekből alakulnak ki az epiblaszt, illetve a hipoblaszt sejtek. Az epiblaszt sejtekből a fejlődő embrió összes szövete, szerve és ősvarsejtek is kialakulhatnak (Eyal-Giladi et al., 1981; Gilbert and Barresi, 2016). Magukról az ősvarsejtekről (PGC), melyek az embrionális fejlődés még későbbi szakaszán jelennek meg, a következő fejezetekben térek ki részletesebben. Fontos azonban megjegyezni, hogy mind a blasztocisztákból, mind a késői epiblasztból, mind a PGC-kból létrehozott őssejt-vonalak jól fenntarthatóak *in vitro* körülmények között, így fontos eszközei a sejtbiológiai folyamatok vizsgálatának (Alev et al., 2013; Kong et al., 2018; Petite et al., 1990).

Az indukált pluripotens őssejt tenyészeteket (iPSC) testi sejtek átprogramozásával lehet létrehozni. Az iPS sejtek lehetőséget nyújtanak rengeteg olyan technológia esetén, ahol a klasszikus őssejtek használata gyakorlati vagy etikai aggályokba ütközik. Madarakban iPS sejteket fürj (*Coturnix coturnix*) szomatikus sejtek és humán faktorok felhasználásával sikerült először létrehozni, ami bizonyította azt is, hogy ezek a fejlődési irányok evolúcionálisan konzerváltak (Lu et al., 2012).

## **2. A madár ősvarsejtek (PGC) kialakulása és feladata**

Az ősvarsejtek fejlődése madaraknál jelentős eltéréseket mutat az emlősökhöz viszonyítva, így szükségesnek tartom ennek részletes elemzését. Emellett minden sejtvonaltól alapú kísérlet alapja a sejtek jellemzése, aminek fontos lépése a sejtek azonosítása, amihez segítséget nyújthat a determinációjuk ismerete. Ez a fejezet ennek alapjait rakja le.

### **2.1. Eredet és determináció**

Az ivarsejtek az egyetlen olyan sejtípus a szervezetben, ami képes a genetikai információt átörökíteni a következő generációra. Meglepő módon azonban az ivarsejtek eredete nem a gonádokra vezethető vissza. Az ivarsejtek vonala már a korai embrionális fejlődés során különvlik a szomatikus sejtek csoportjától és külön fejlődési utat követ (Tagami et al., 2017). Az ivarsejtek prekursor sejtjei az őscsírasejtek (PGC), melyeket már 1870-ben azonosítottak (Waldeyer, 1870).

Ezeket a sejteket eleinte hipoblaszt eredetűnek gondolták (Swift, 1914), azonban 1981-ben Eyal-Giladi és munkatársai bizonyították, hogy valójában az epiblasztból származnak (Eyal-

Giladi et al., 1981). A vizsgálatok szerint csak a blasztoderma centrális része vesz részt a PG sejtek kezdeti termelésében (Ginsburg and Eyal-Giladi, 1987; Ginsburg et al., 1989). Abban azonban a kezdetektől mindenki egyetértett, hogy az ősvarsejtek nagyméretű (10-20  $\mu\text{m}$ ), gömbölyű sejtek, szintén méretes sejtmaggal, valamint jól látható centriólumokkal és citoplazmatikus zsírcseppekkel (Swift, 1914; Waldeyer, 1870).

Általánosságban elmondható, hogy két teória van jelenleg az ősvarsejtek determinációjáról: a preformációs és az epigenezis modell. Előbbi szerint a megtermékenyülés előtti vagy utáni rövid időtartamban anyai eredetű faktorok aktiválódnak a petesejt sejtplazmájának germinális plazmának nevezett részében, és ezek segítenek az őscsírarsejtek funkcionális specifikációjában. Ezt a modellt alátámasztják az ecetmuslica (*Drosophila melanogaster*), a fonálféreg (*Caenorhabditis elegans*), a zebra-dánió (*Danio rerio*) és a karmosbéka (*Xenopus laevis*) fajokon végzett fejlődésbiológiai kísérletek (Eddy, 1976; Illmensee & Mahiwald, 1976; Olsen et al., 1997; Venkatarama et al., 2010).

Emlősökben egérmodellen (*Mus musculus*) bizonyították az epigenezis modell működését, mely szerint az ősvarsejtek kialakulásának aktivációját a környező sejtekből érkező hatások indukálják (Tam and Zhou, 1996). Bár madarak esetén a kezdeti kutatások az utóbbi modellt valószínűsítették (Karagenc et al., 1996), az ecetmuslicában is megtalálható *VASA* géntermék jelenléte a mitokondriális egységek környékén, valamint a barázdálódás során a barázdálódási árok alapi területén bizonyították (Tsunekawa et al., 2000), hogy a preformációs modell is helytálló lehet. Ez további alátámasztást nyert, amikor fény derült a *VASA* gén szerepére az ivarsejt-fejlődésben és a differenciálódásban (Lavial et al., 2009). Összességében kijelenthető, hogy a pontos folyamatok megismeréséhez még további fejlődésbiológiai kutatásokra van szükség.

## 2.2. Azonosítás

Mivel a madár ősvarsejtek vándorlását már a felfedezésük után nem sokkal megfigyelték a kutatók (Swift, 1914), régóta foglalkoztatta őket az a probléma is, hogy miként lehetne megbízhatóan figyelmekkel kísérni ezeket a sejteket a teljes fejlődésük során. Erre nyújtott jó megoldást a sejt-specifikus festés módszere. Az első próbálkozások a perjód-Schiff (PAS) reakció segítségével történtek (Meyer, 1960; Meyer, 1964), azonban ezzel csak a HH4 stádium előtti embriók ősvarsejtjeit lehetett vizsgálni (Nakamura et al., 2013b).

Erre egy újabb jelölési eljárás, az EMA-1 (embrionális egér antigén) monoklonális antitest használata jelentett megoldást madár PGC-k esetén. Ez az ellenanyag az egér embrionális karcinómasejtek ellen termelődik és a sejtmembránban található meg. Segítségével a PGC-k a

germinális félholdban való megjelenésüktől kezdve egészen a szexuális differenciáción átesett gonádokban való integrációjukig megjelölhetők (Urven et al., 1988).

Később más monoklonális antitest alapú markert is kifejlesztettek, mint pl. a fázis-specifikus embrionális antitest marker család (SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4), amelyeket ma is széles körben alkalmaznak az embrionális őscsírasejtekkel kapcsolatos vizsgálatokban (Jung et al., 2005; Karagenc et al., 1996). Ezek az antitest markerek mind a sejtek membránjából származó antigénekhez kapcsolódnak, így jelölve meg őket. Az SSEA-1 ellenanyag azért is fontos a kutatásban, ugyanis ennek a segítségével sikerült hatásosan őscsírasejteket izolálni fűrj és házityúk embriókból mágneses (MACS – magnetic-activated cell sorting) és fluoreszcens (FACS – fluorescence-activated cell sorting) sejtleválasztási módszerekkel (Mozdziak et al., 2006; Ono and Machida, 1999).

Természetesen ezeknek az antitest alapú módszereknek is megvannak a gyengeségei. Mind az EMA-1, mind az SSEA család esetében megfigyelték, hogy hajlamosak az ősvarsejteken kívül más embrionális őssejteket is jelölni (Pain et al., 1996). Más kutatások azt bizonyították, hogy ezek az antitestek nem minden esetben ismerik fel a *VASA*-t expresszáló őscsírasejteket, így a hatásfokuk messze elmarad a 100%-tól, főként a korai fejlődési stádiumokban (De Melo Bernardo et al., 2012; Hen et al., 2014).

Jelentős áttörést hozott a házityúk *VASA* homológ (CVH) marker bevezetése (Tsunekawa et al., 2000). A *VASA* fehérje egy ATP-függő RNS helikáz a DEAD-boxban (innen származik másik neve, a DDX-4, DEAD-box helikáz-4), amit *Drosophilában* azonosítottak (Lasko and Ashburner, 1988). Rendkívül fixált az állatvilágban, szerepét az ivarsejtek fejlődésében bizonyították a házityúk mellett az ecetmuslica, a fonálféreg, a zebradánió, a karmosbéka és az egér esetén is. Segítségével az ivarsejtek és elősejtjeik az embrió első barázdálódásától kezdve egészen a funkcionális petesejt kifejlődéséig nyomon követhetők (Kim & Han, 2018). Bár sokan a *VASA* fehérjét tartják a legmegbízhatóbb ivarsejtmarkernek, több tanulmány is bizonyította, hogy ez a protein esetenként szomatikus sejtekben is expresszálhat (Lejong et al., 2020; Poon et al., 2016).

Egy másik jól használható markertípus az RNS-kötő fehérjék csoportja, ahonnan a DND1 (dead end) (Aramaki et al., 2007) és a DAZL (Deleted in Azoospermia-Like) (Kito et al., 2010) érdemel leginkább említést. Míg a DND1 a sejtek nukleuszában található, mindkét nem esetében működik, és több fajban is az ivarsejtek fejlődéséért felel (Weidinger et al., 2003; Youngren et al., 2005), addig a DAZL a nukleuszban és a citoplazmában is expresszál, nem detektálható érés előtti petefészkekben, valamint különböző állatfajok esetén eltérő szereppel bír (Eberhart et al., 1996; Ruggiu et al., 1997). Házityúk esetén a helytelen DAZL expresszió befolyásolja a PGC-k osztódását, génexpresszióját, valamint a sejtek *in vitro* apoptózisát (Lee et al., 2016).



Összességében kijelenthető, hogy jelenleg egyik ivarsejtmarker sem nyújt 100%-os specificitást. A hibák kiküszöbölése érdekében érdemes lehet egyszerre többféle markerrel jelölni az ősvarsejteket, ezzel maximalizálva az eredmények megbízhatóságát.

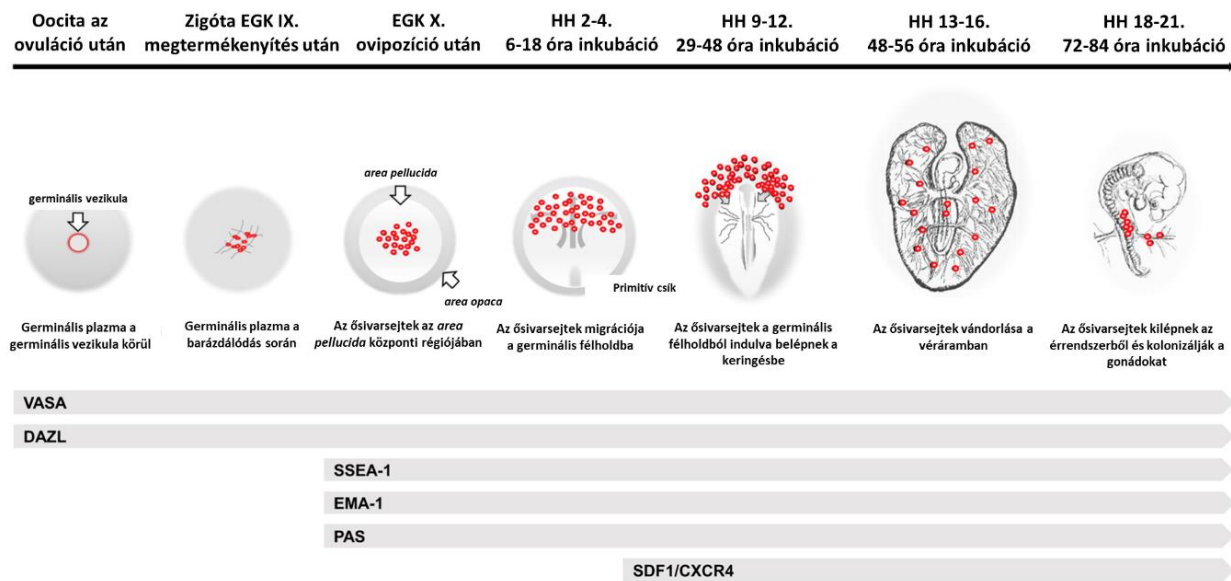
### 2.3. Vándorlás

Beszéltünk már az ősvarsejtek epiblaszt eredetéről, azonban fontos tárgyalni a sejtek ezt követő jellegzetes vándorlását, ugyanis több, a későbbiekben bemutatásra kerülő technológia alapoz erre. Az Eyal-Giladi-Kochav-féle skála szerinti X. stádiumban nagyjából 30-130 őscsírsejt található meg az *area pellucida* központi részén (Nakamura et al., 2007; Tsunekawa et al., 2000). A primitív csík megjelenésekor ezek a sejtek az embrió *anterior* részére, az extraembrionális régió szélére csoportosulnak passzív mozgással, az úgynevezett germinális félholdba. Ez egy patkó alakú képződmény, mely a primitív csík feji részén található. A HH 3-as stádiumban a sejtek az epiblasztból a hipoblasztba mozognak át, majd HH 4-ben (inkubáció 18-19. órája) felgyűlnek a félhold amniokardiális vezikulájában. A felsorolt stádiumok alatt (EGK X - HH 9.) jelentősen megnő az ősvarsejtek száma a fokozott proliferációnak köszönhetően (Tagami et al., 2017).

A Hamburger-Hamilton 10-11. stádiumban az ősvarsejtek az extraembrionális régióból belépnek az intraembrionális érrendszerbe, és megkezdik tényleges vándorlásukat. Azt, hogy a madár PGC-k az embrió érrendszerét használják a migráció során, már a korai vizsgálatok során megállapították (Swift, 1914). Ez a technika viszonylag egyedi; a madarak és néhány hüllőfaj (bizonyos kígyók és gyíkok) esetében írták le eddig (Kohno et al., 2014). A sejtek eleinte a vitellin vénák *anterior* részén csoportosulnak, majd tovább haladnak a szinuszoid erekbe. A sejtek nagyszámú belépése a keringési rendszerbe a HH 12-14. stádiumok között következik be (De Melo Bernardo et al., 2012). Az őscsírsejteket ebben az állapotban keringő ősvarsejteknek (cPGC) nevezzük.

A maximális ősvarsejt-koncentráció a HH 14. stádium (50-53 óra inkubáció) alatt figyelhető meg a vérben (Tajima et al., 1999). Régebbi kutatások alapján a migrációt olyan extracelluláris mátrix molekulák segítik, mint a laminin, a fibronectin, a kondroitin-szulfát és a kollagén IV (Urven et al., 1989). A HH 15. stádiumtól kezdődően az ősvarsejtek a mezoderma oldallemezeiben futó vitellin artériákban koncentrálnak, majd a keringésből kilépve a mezodermből kialakuló coelomahámba vándorolnak. Ehhez az egérhez hasonlóan a SDF-1/CXCR4 kemokin jelátviteli rendszert használják (Stebler et al., 2004). A coelomahám megvastagodva létrehozza a kezdeti ivarléceket, amit az ősvarsejtek kolonizálnak (Didier et al., 1990; Fujimoto et al., 1976; Swartz, 1982). A HH 20. stádiumra az ősvarsejtek jelentős része az ivarlécben csoportosul, míg kb. 10% a szervezetben szétszórva marad, és később feltehetően

apoptózison megy keresztül (Nieuwkoop and Sutasurya, 1979). A PGC-k vándorlását a 3. ábrán szemléltetem.



**3. ábra: Madár ősvarsejtek vándorlása és marker aktivitása az embrionális fejlődés során.** Az ábrán pirossal jelölt ősvarsejtek az EGK X. stádiumban azonosíthatók először, ekkor az *area pellucida* központi régiójában. A HH 2-4. stádium alatt belépnek az ivari félhold területére, majd HH 9-12. stádium körül a vérkeringésbe, ahol megkezdik tényleges migrációjukat. Legnagyobb koncentrációban a 13-16. stádium között találhatóak meg a vérben, majd a 18-21. stádiumban kilépnek az erekből és megkezdik a gonádok kolonizációját. Itt fejlődnek később érett ivarsejtekké. Markereik különböző stádiumoktól effektívek. A VASA és DAZL már a fejlődés elején is aktív, emiatt ezek a legalkalmasabb eszközök az ősvarsejtek azonosítására. Az SSEA-család, valamint az EMA-1 és a PAS csak az EGK X. stádium után használható, míg az SDF1, mivel csak az erekből való kilépéskor és az ivarszervek megtalálásában játszik szerepet a sejtekben, így csak a vándorlás végső szakaszán alkalmazható megfelelően. (Módosítva Kim & Han, 2018 nyomán.)

## 2.4. Fejlődés

Miután az őscsírarsejtek kolonizálták az ivarléceket, a szervek méretének növekedésével párhuzamosan újabb számbeli gyarapodáson mennek keresztül. Ilyenkor már gonadális PGC-knek (gPGC, GGC) nevezik őket. Az ivarléc továbbfejlődik az ivarszerv mezenchimális részévé, majd a HH 29 stádiumban (6. nap) megkezdődik az ivarszervek nemi differenciálódása, hímekben szimmetrikusan, nőben asszimmetrikusan. Hímivarban a PGC-eket tartalmazó ivarlécből a herecsatornácskák alakulnak ki, míg nőivarban a baloldali elsődleges ivarléc visszafejlődésnek indul a HH 31-38. (7-12. nap) stádiumok alatt, helyette a germinális *epithelium* növekszik, létrehozva a másodlagos ivarléceket, majd a petefészket és a Müller-féle csövet, amiből a petevezető képződik. A jobboldali ivarszerv itt a legtöbb esetben teljesen eltűnik a kelésig (Tagami et al., 2017).

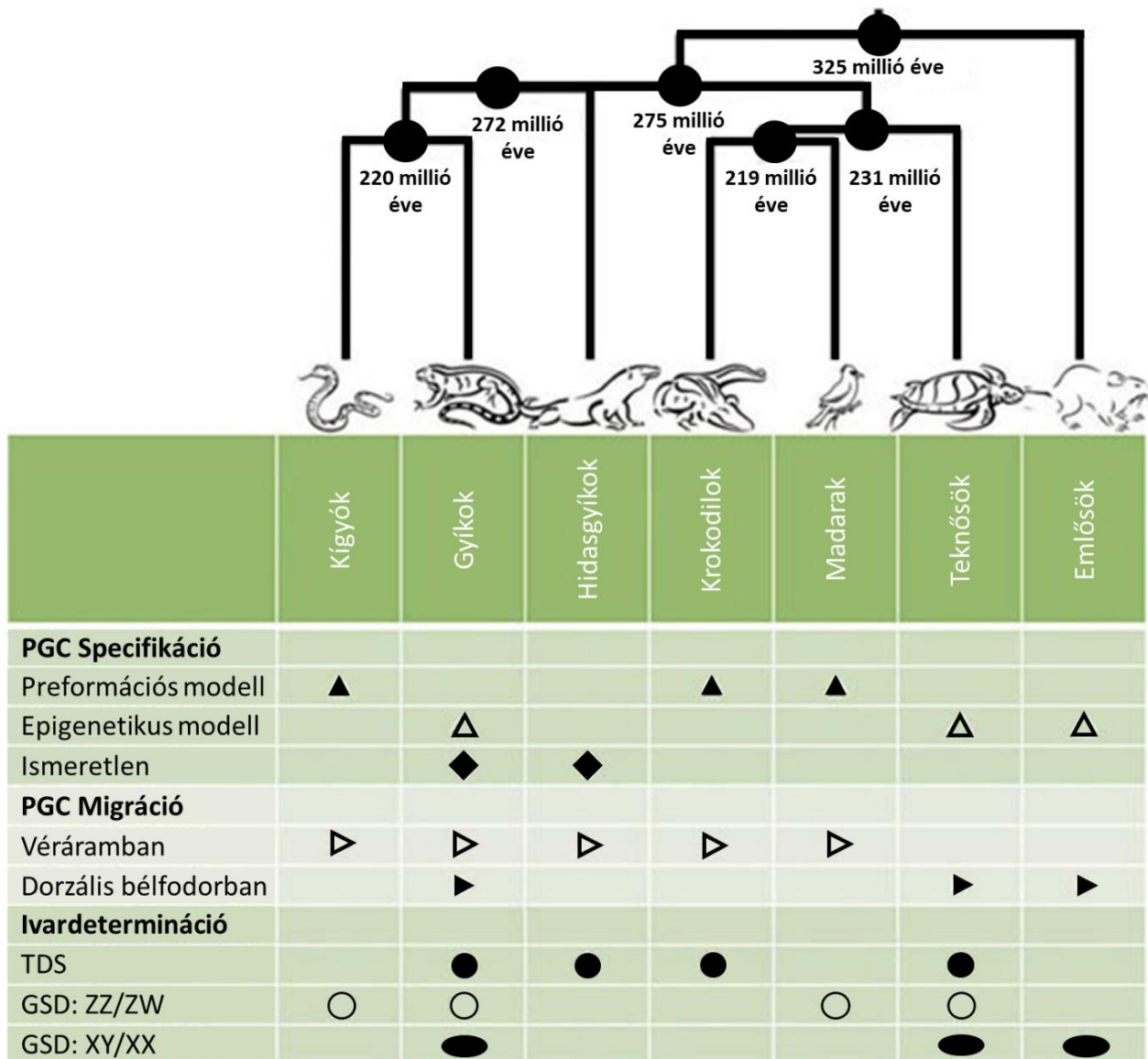
Az ivarszervek differenciálódása során a hím ősvarsejtek sejtszáma alig növekszik (Méndez et al., 2005), utána pedig mitózisgátlás lép fel, így a sejtek pre-spermatogoniális állapotban maradnak a sejtciklus G1 fázisában egészen a kikelésig (Kirby and Forman, 2000; Swift, 1916). A sejtosztódás a kelés után 10 héttel indul újra, de csak az ivaréréskor indul meg a tényleges

spermatogenezis. Nőivar esetén a HH 35-41. stádium között jelentős (akár huszonötszörös) proliferációs aktivitás figyelhető meg az elsődleges petesejtek kialakulásával párhuzamosan, majd a HH 39. stádiumban megindul a meiózis is (Hughes, 1963; Swift, 1915).

A sejtek meiózist házityúkban sok más fajhoz hasonlóan a retinolsav kontrollálja. A meiózist madár embriókban a retinaldehid-dehidrogenáz (RLDH2) enzim irányítja. Ennek génje fokozottan expresszál hímek esetében a herecsatornácskákban, tojók esetén pedig a bal ivarszerv kéregállományában, valamint a jobb ivarszerv *medullájában*. Az RLDH2 termelődése egy citokróm bontóenzimhez, a CYP26B1-hez (cytochrome P450 family 26, subfamily B member 1) kötött, melyet hímekben a herecsatornácskák termelnek a HH 30. stádiumtól kezdődően a fejlődés végéig, míg tojókban az ivarszervek *medullája* állítja elő, szintén a HH 30. stádiumtól. Ez esetben azonban HH 38-tól kezdve csökkenő intenzitás figyelhető meg, mely a termelés leállításával ér véget, ezzel szabad utat engedve a meiózishoz (Smith et al., 2008).

Magában a jelátvitelben két receptorcsalád, a RAR (retinolsav receptor) és az RXR (retinoid X receptor) vesz részt házityúk ősvarsejtjeiben. A RAR három típusát ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ) találták meg ebben a fajban, melyekből a RAR $\beta$  vesz részt a folyamatokban a HH 30. stádium után mindkét nemből. Nőivarban a retinolsavat a HH 38. stádiumtól kezdve nem bontja le a CYP26B1, így az a RAR $\beta$  receptor segítségével indukálja a *STR48* gént, aminek hatására kezdetét veszi a meiózis (Smith et al., 2008; Tagami et al., 2017).

Végül érdekességként megemlítendő az őscsírarsejtek szexuális differenciációjának kérdése. Az elmúlt évtizedekben sok kísérlet foglalkozott ezzel a témakörrel, melyekben adott nemből származó PGC-eket injektáltak ellentétes nemű egyedek gonádjába, és vizsgálták azok fejlődését (Kagami et al., 1995; Kagami et al., 1997; Naito et al., 1999; Tagami et al., 2007). Ezek alapján feltételezhető, hogy a házityúk ősvarsejtjei ivari bipotenciállal rendelkeznek a blasztodermális fejlődési szakaszban, azonban a migráció során elvesztik ezt a képességet. A fejezet összefoglalásaként a különböző fajok ősvarsejtjeinek specifikációját, migrációját és ivardeterminációját a 4. ábrában foglalom össze.



**4. Ábra: Az ősvarsejtek és az ivar jellemzői különböző állatfajok esetében.** Madarak esetén, bár kezdetben az epigenetikus modellt feltételezték a PGC-k determinációja kapcsán, a VASA gén aktivitása a sejtekben a preformációs modellt valószínűsíti, hasonlóan a kígyókhöz és krokodilokhoz. Ezzel szemben más fajok mellett a gyíkok nagy részében, a teknősökben és az emlősökben az epigenetikus modell figyelhető meg. Vándorlásukat tekintve a legtöbb hüüllőhöz hasonlóan a madár ősvarsejtek is az érrendszert használják a dorzális belfodor (teknősök, emlősök) helyett. A nemi determinációt tekintve a madarakra, hasonlóan a kígyókhöz, valamint a gyíkok és teknősök egy részéhez, a genotípusos ivari determináció (GSD) ZZ/ZW ivari kromoszómapár változata jellemző, ellentétben például a hőmérséklet dependens ivardeterminációval (TDS) rendelkező hidasgyíkokkal és krokodilokkal. (Módosítva Bachvarova et al., 2009; Ezaz et al., 2006; Kohno et al., 2014; Pokorná & Kratochvil, 2009 nyomán.)

### 3. A madár ősvarsejtek felhasználási potenciáljai

Az előzőekben felvázoltam a madár ősvarsejtek fejlődésének részleteit, kitérve a fontosabb jellemzőikre is. Ebben a fejezetben célom a felhasználásuk sokszínűségének, és az ebből fakadó fontosságuknak bemutatása.

### 3.1. *In vitro* tenyésztetőség

A madár ősvarsejtek a tudomány több területén is nagy fontossággal bírnak, számos technológia használja őket eszközként, a génmegőrzéstől a génmódosításig. Ezt a széleskörű felhasználási spektrumot összeköti egy közös problémakör: minden munkafolyamat nagy mennyiségű, egészséges sejtet igényel az optimális hatékonyság elérése érdekében. Ennek a szükségletnek a kielégítéséhez elengedhetetlen volt egy megbízható *in vitro* sejtizolálási és sejttenyésztési protokoll kidolgozása.

Az őscsírarsejtek izolálására történt első próbálkozások majdnem száz évre vezethetők vissza (Goldsmith, 1935; Willier, 1937). Ekkor még az embriók ivari félholdjából történt a PGC-k izolálása, ahogy az több szerzőnél is olvasható. Ehhez általában HH 5-10. stádium közötti embriókat használtak (Reynaud, 1969; Simon, 1957). A későbbiekben kifejlesztettek egy másik technikát is, amely során az ősvarsejteket a migrációs fázisuk közben, HH 17. stádiumú embriókból izolálták vérvétel segítségével (Fujimoto et al., 1976; Kuwana et al., 1987).

Mindkét technikának megvannak az előnyei és hátrányai. Az ivari félhold izolálása esetében, bár nagyobb koncentrációban nyerhetőek ki az ősvarsejtek, izolálásuk és tisztításuk nehezkesebb, valamint a sejtek újra aggregálódásának is nagyobb a veszélye (Wentworth et al., 1989). Ezzel szemben a vándorlás alatti vérvétellel történő PGC-izolálás könnyen kivitelezhető, az alacsonyabb kinyert sejtszám miatt azonban a technika elterjedéséhez szükség volt egy jól működő, a hosszútávú fenntartáshoz is alkalmazható tenyésztőmédium kifejlesztésére.

Az első tenyésztőmédium még rendkívül egyszerű összetétellel rendelkezett, csupán módosított Dulbecco médiumból állt, azonban ebben csak pár napig lehetett fenntartani a PG sejteket (Wentworth et al., 1989). Később megjelentek az összetettebb médiumok, mint a Kav-1, ami már FBS-t, házityúk szérumot és mLIF-et is tartalmazott (Kuwana et al., 1996). Új megközelítést jelentett a táplálósejtek (*feeder cells*) használata a tenyésztéshez. Ezek például az embrionális gonádokból származtak, a szervek emésztésével jutottak hozzájuk, és a tenyésztőlemez aljára tapadva különböző faktorok termelésével segítették a PGC-k növekedését (Chang et al., 1995; Yang & Fujihara, 1999). Ebből indult ki a különböző növekedési faktorok felhasználásának vizsgálata (Macdonald et al., 2010).

Ezek a tenyésztőmédiumok már képesek voltak hosszabb távon életben tartani a sejteket, de minőségük változó volt, emellett nem szolgáltattak megoldást arra, hogy az ősvarsejteket elválasszák a többi véralkotóelemtől. Erre kezdetben többféle módszert dolgoztak ki, melyek az ősvarsejtek tisztítását az izolálást követően, de a tenyésztést megelőzően próbálták megoldani. Ilyen volt a Ficoll sűrűségi grádiens centrifugálás (Yasuda et al., 1992), a Nycodenz sűrűségi grádiens centrifugálás (Zhao and Kuwana, 2003), valamint a mágneses (MACS) (Ono and Machida, 1999) és fluoreszcens (FACS) (Mozdziak et al., 2006) válogatás is. Ezek azonban

sokszor nem voltak megfelelő hatékonyságúak, vagy jelentős plusz energiát és költséget jelentettek.

Az igazi áttörést ezen a területen Whyte és munkatársai 2015-ben érték el, akik egy komplex tenyésztőmédiум kifejlesztésével sikeresen megoldották mind a hosszútávú tenyésztést, mind a házityúk ősvarsejtek tisztítását. A vándorló ősvarsejtek jelátviteli rendszerét vizsgálva sikerült feltérképezni természetes környezeti igényeiket. Ehhez igazodva táplálósejtek hozzáadása nélkül olyan médiумot dolgoztak ki, amely támogatta a PGC-k osztódását és megújulását, méghozzá növekedési faktorok, többek között a B fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) és a humán aktivin felhasználásával. Ezzel sikerült stabil, fenntartható házityúk ősvarsejt-tenyészeteket létrehozni *in vitro* (Whyte et al., 2015).

### 3.2. Beépülési potenciál

Az ősvarsejtek egyik jelentős előnye a kísérleti alkalmazásuk során, hogy kiemelkedő beépülési potenciállal rendelkeznek. Ez a tulajdonságuk teszi alkalmassá őket egyebek mellett a génmegőrzésben és a transzgenézisben való felhasználásukra is. Már tettem említést kísérletekről, ahol adott nemből származó őscsírarsejteket ellentétes nemű egyedek gonádjába injektáltak, és figyelték azok beépülési sikerességét, valamint továbbfejlődésüket ivarsejtekké (Kagami et al., 1995; Kagami et al., 1997).

Az ivarszervi kiméra előállításra többféle módszert is kidolgoztak, például a germinális félhold transzplantációját (Hajji et al., 1988; Tachinante, 1974), a félhold emésztett darabjának véráramba injektálását (Reynaud, 1969; Reynaud, 1976), ivari félhold eredetű sejtek injektálását (Wentworth et al., 1989), valamint magának az embrionális vérnek az átömlesztését (Hubert, 1970). A legkifinomultabb módszer mégis az *in vitro* tisztított és tenyésztett ősvarsejtek injektálása az embrionális véráramba (Yasuda et al., 1992).

Azonban az ősvarsejtek nem csupán az embrionális fejlődés során tudnak működőképesen beépülni recipiens egyedek ivarszerveibe. Trefil és munkatársai mesterségesen sterilizált felnőtt kakasokba ültettek be mCherry jelölt donor PGC-eket, amelyek 12 hónap után hét állatból hatban visszaállították a spermiumtermelést, valamint a termékenyítő-képességet is sikerült bizonyítani. Ez a kísérlet egy olyan technológiát mutatott be, melynek segítségével az ivarszervi kiméra előállítás időtartama, költsége és állatigénye egyszerre csökkenthető (Trefil et al., 2017).

### 3.3. Transzgenézis

Míg az emlősök és halak esetében jelentős áttörést jelentett a zigóta mikroinjektálásának technológiája (Gordon and Ruddle, 1981; Pei and Burgess, 2019), addig a madarak génszerkesztése komoly akadályokba ütközik. A probléma gyökerét a madarak speciális

szaporodásbiológiája és embrionális fejlődése adja. Míg emlősökben az egyceltes embrió mikroinjektálással történő szerkesztése jól kivitelezhető, addig ezt madaraknál több tényező is gátolja.

Bár a petesejt izolálása és mesterséges megtermékenyítése lehetséges ezeknél a fajoknál is, a mesterséges maturáció a szik hiánya miatt már nem megoldható (Lee et al., 2020a). Maturáció nélkül a mesterségesen termékenyített petesejt visszaültethető recipiens tojásba, azonban ez a technológia rendkívül magas laborigénnyel és alacsony hatásfokkal rendelkezik (Hrabia et al., 2003; Tanaka et al., 1994). További probléma, hogy az egyceltes zigóták felhasználása sem egyszerű. A magnumba már nagyjából 5 órával az ovuláció után megtörténik az első osztódás, a következő 20 órában pedig a további osztódások rohamos ütemben történnek, melynek végére az embrió sejtszáma eléri az 55.000-et (Lee et al., 2013; Park et al., 2006). Emiatt a gyors fejlődés miatt az egyceltes zigóták kimosása nehezen megoldható, amit a felette termelődő tojásfehérje is akadályoz. Az anyaállat elvesztése miatt az embrió műtojásban való nevelése tovább növeli az eljárás nehézségét.

Az egyik módszer többsejtes embriók génszerkesztésére az embriók direkt elektroporálása a tojáson nyitott ablakon keresztül. Ez a technológia madarak esetében előnyösebb, mint emlősöknél, mivel nincs szükség arra, hogy műtétnek vessük alá az anyaállatot (Véron et al., 2015). Cooper és munkatársai a spermiumok genetikai szerkesztését használták, majd ezeket inszeminálták a tojó szervezetébe, azonban ez a technológia meglehetősen alacsony (0-26% GE utódok) hatásfokkal rendelkezett (Cooper et al., 2017). Történtek már próbálkozások adenovírus CRISPR/Cas9 vektor fürj blasztodermába injektálására is, ami nagy hatásfokkal működött, így a jövőben fontos szerephez juthat a transzgénikus madár előállításban (Lee et al., 2019).

Természetesen a madarak ősvarsejtjei is felhasználhatóak vektorként a génszerkesztés eszközeként. Az őscsírasejt-tenyészeteket módosítva, majd ezeket recipiens állatokba juttatva transzgénikus ivarszervi kimérák állíthatók elő, amelyeket egymással keresztezve génszerkesztett utódokat kapunk (Macdonald et al., 2012). Azonban ehhez nagy mennyiségű, *in vitro* tenyésztett PGC sejtre van szükségünk, amire egyelőre csak házityúkból fejlesztettek ki megbízható sejtenyésztési technológiát. Tyack és munkatársai erre a problémára szolgáltatott megoldást, amikor az ősvarsejtet *in vitro* tenyészetek helyett már a vérben célozták Tol2 transzpozon vektorral. Az így végrehajtott génmódosítás, mivel kihagyja a tenyésztési lépést, több faj esetén is felhasználható (Tyack et al., 2013).

Napjainkig már használták a génszerkesztést madarak esetén többek között a miosztatin (*MSTN*) gén kiütésére (Kim et al., 2020; Lee et al., 2020b), ezzel szuperizmolt állatok előállítására, valamint betegségrezisztencia kialakítására a Marek-betegség (Challagulla et al., 2021) és a madárinfluenza (Idoko-Akoh et al., 2023) ellen is. Ezek mellett használhatjuk a

technológiát a kutatásban fluoreszcens riportergének beépítésére (Kwon et al., 2004), az orvostudományban terápiás fehérjék termeltetésére a tojásban (Sheridan, 2016), valamint az iparban is a kisebb állatlétszám és jobb takarmányértékesítés biztosítása céljából (Park et al., 2019).

### 3.4. Mélyhűtés

A legtöbb módszer esetén a sejtenyésztés mellett a sejtek mélyhűtésére is szükség van, ugyanis ez biztosítja azok igazán hosszútávú, akár évtizedekre nyúló tárolhatóságukat. A modern tápoldatoknak köszönhetően a tenyészeteket kultúrákban fenntartani lehetséges, akár hónapokig is, tapasztalatunk szerint azonban fél év tenyésztés után a minőségük már jelentősen romlik, genetikai állományuk pedig változásokon mehet keresztül. Emiatt elengedhetetlenül fontos a sejtek mélyhűtésének fejlesztése, hiszen madarak esetén ez a technológia használható a génmegőrzésben is.

Madaraknál a génmegőrzés több akadályba ütközik, mint emlősök esetén, ami a ZW ivari kromoszóma rendszerrel áll összefüggésben. Míg emlősök esetén a hím nem rendelkezik a heterogén kromoszómapárral (XY), addig madaraknál a nőnem a heterogamétás (ZW) ivar (Stefos and Arrighi, 1971). Ennek köszönhetően a spermiumok mélyhűtésének klasszikus génmegőrzési módszere csak a Z-kromoszómán tárolt tulajdonságok megőrzésére alkalmas, így a W kromoszómán és a mitokondriális DNS-ben tárolt információ a sperma mélyhűtésnél elvész. Emellett a tárolt spermiumok alacsonyabb termékenyítőképessége miatt a módszer fejlesztésre is szorul (Long, 2006). Az alternatív módszerek közül a petesejt- és embriómélyhűtés nem kivitelezhető, köszönhetően a tojás nagy méretének, valamint víz-, fehérje- és lipid tartalmának. Szövetmegőrzés terén jó eredményeket mutat az embrionális vagy naposkori gonádok szövetének mélyhűtése, ami azonban donor állat feláldozásával jár, így veszélyeztetett fajokon kevésbé alkalmazható. A legjobb opció tehát az embrionális sejtek, azon belül az ősvarsejtek megőrzése, amire a továbbiakban részletesebben kitérek (Barna et al., 2016).

Az első sikeres házityúk PGC-mélyhűtésre 1994-ben került sor, ekkor folyékony nitrogénben prezerválták a véráramból izolált sejteket 10% DMSO-t tartalmazó (dimetil-szulfoxid) cHank's oldatban (Naito et al., 1994). Nem sokkal később gonádból izolált sejteket is sikerült mélyhűteni. Ennél a kísérletnél a fagyasztómédium MEM tápoldatból (módosított Eagle médium), 10% FBS-ből, és 10% DMSO-ból állt (Tajima et al., 1998). Fürj gonád eredetű ősvarsejteket is sikeresen mélyhűtöttek folyékony nitrogénben 10% FBS-t és 10% DMSO-t tartalmazó M199 fagyasztómédiumban (Chang et al., 1998).

A legújabb kutatások egyik megközelítése szerint specifikusabb hűtőmédiumok előállítása szükséges, ami jobban segíti az ősvarsejtek túlélését. Ilyen a Roslin Intézet által fejlesztett KO-



DMEM alapú, 4% DMSO-t, 5% házityúk szérumot és CaCl<sub>2</sub>-ot tartalmazó fagyasztómédium (Nandi et al., 2016; Woodcock et al., 2019). A másik megközelítés egy egyszerű, a fajokra nézve univerzális változatot részesít előnyben. Erre példa a Kong és munkatársai által publikált 10% DMSO-t és FBS-t tartalmazó médium (Kong et al., 2018). Voltak próbálkozások vitrifikációs technológia kialakítására is, azonban ezek, bár ígéretesek, jelenleg még nem érik el a lassú-mélyhűtés hatékonyságát (Patakiné Várkonyi et al., 2017; Tonus et al., 2017). Emellett kereskedelmi forgalomban kapható hűtőmédiumok is léteznek, mint a CELLBANKER 1 (Nippon Zenyaku Kogyo, Japán), amelyek szintén jó hatásokkal működtek több kísérletben is (Nakamura et al., 2011; Nakamura, Tasai, et al., 2013).

A fagyasztómédiumok további fejlesztése jelenleg is aktuális feladat, hiszen minden technológiához jó minőségű, magas sejtszámú tenyészet szükséges. Ennek kivitelezéséhez elengedhetetlen a meglévő médiumok tökéletesítése, azok összehasonlítása (Setioko et al., 2007), a mélyhűtés sejtekre gyakorolt hatásainak vizsgálata (Ecker et al., 2023), valamint a technológia adaptálása új fajokra/fajtákra (Lázár et al., 2021).

### 3.5. Mikotoxinhatások vizsgálata

A mikotoxinok általánosságban a penészgombák másodlagos anyagcseretermékei, melyek leggyakrabban a takarmányon keresztül kerülnek be a szervezetbe. Megjelenhetnek már a szántóföldi növényeken is, de gyakran előfordul, hogy a nem megfelelő tárolás és a prevenció hiánya miatt a takarmány termékben is felszaporodnak. Szintén problémát jelent, hogy a takarmány feldolgozása során az említett mikotoxinok nagy része nem bomlik le. Magyarországon a legnagyobb gazdasági kárt a fusariotoxinok okozzák, melyek közé tartozik többek között az általunk vizsgált zearalenon és T-2.

A baromfitakarmányok terén több kutatás is foglalkozott már a mikotoxin szennyezettség problematikájával. Dél-Afrikában 105 különböző baromfitakarmányból vett minta alapján folyadék kromatográfiás vizsgálatokkal azt állapították meg, hogy összesen 16 különböző mikotoxin volt jelen az etetőanyagban, a legnagyobb arányban a fumonizin B1 és a zearalenon képviseltette magát. Ezt más afrikai takarmányvizsgálatok is alátámasztották (Mokubedi et al., 2019; Ochieng et al., 2021). A mikotoxinok jelenléte Európa és a világ mezőgazdaságában továbbra sem megoldott. Európában a szemestakarmányok, így a búza, az árpa és a kukorica, melyek jelentős szerepet vállalnak a baromfitakarmányozásban, erősen ki vannak téve a különböző mikotoxinok károsító hatásának.

A különböző baromfifajok különböző érzékenységet mutatnak a mikotoxinokkal szemben. Eddigi megfigyelések alapján a fűrj, lúd (*Anser anser*) és pulyka (*Meleagris gallopavo domesticus*) fajok kevésbé ellenállóak az ilyen jellegű mérgezőanyagok ellen, mint a házityúk. A

házityúk például a T-2-re, az aflatoxinra, a deoxinivalenolra és az ochratoxin A-ra a legérzékenyebb, míg a zearalenon és a fumonizin B1 kevésbé viseli meg. A faj mellett azonban egyéb befolyásoló tényezők is szerepet játszhatnak. Az alapból legyengült vagy fiatal szervezet például házityúk esetén is jobban ki van téve a mikotoxinok károsító hatásainak, mint az erős felnőtt immunrendszer. Emellett olyan tényezők is közre játszhatnak egy populáció mikotoxin-kitettségének, mint a nem megfelelő hőmérséklet és páratartalom, a rosszul kivitelezett ventilláció, a kitettség hossza, vagy más baromfibebetegségek megjelenése. Utóbbival kapcsolatban bizonyított, hogy házityúkban az aflatoxinok, ochratoxinok, trichotecének és fumonizinek képesek immunszuppresszív hatást indukálni, ezzel fokozni az állomány betegségeknek való kiszolgáltatottságát (Arafa et al., 1981; Filazi et al., 2017).

Ha egyszerre többféle mikotoxin is jelen van a takarmányban, az bizonyos esetekben additív vagy szinergista hatást is kifejthet. Több másik kombináció mellett eddig azt figyelték meg, hogy a T-2 toxin az aflatoxin B1-gyel és a DON-nal is szinergista kapcsolatban van, míg például a fumonizin B1-hez és az ochratoxin A-hoz additív viszony fűzi. A kutatók azonban máig vizsgálják az egyes mikotoxinfélék kölcsönhatásait és azok eredményeit az egyes állatfajokon (Danicke, 2002).

Az általunk felhasznált egyik mikotoxin a zearalenon, mely ösztrogén jellegű hatása miatt ivarszervműködésbeli zavarokat idézhet elő. Ennek oka, hogy a ZEA eltávolítja az ösztradiolt a kötőfehérjéről, ezzel ösztrogenikus reakciót váltva ki a szervezetből. Hormonális aktivitása miatt bizonyos országokban, mint az USA, felhasználják a húsmennyiség növelésére. Azonban több országban, például az Európai Unióban, tilos a ZEA használata (Yazar and Omurtag, 2008).

A zearalenonra a házityúk kevésbé érzékeny, mint a többi baromfifaj. Elsődleges hatása ezeknél az állatoknál a termékeny tojások számának csökkenése lehet. Emellett azonban a mikotoxin akkumulálódhat az állati szervezetben, többek közt a tojásban, a húspan, a belső szervekben, ezek közül elsősorban a májban. Ezáltal összességében mérsékelt egészségügyi károsítóként kell tekinteni erre a szennyezőanyagra (Kolozsvári, 2009).

A másik általunk vizsgált mikotoxin a T-2. Alapvetően az eukarióta sejtekben károsítja a mitokondriumot, akadályozza a DNS, RNS és fehérje szintézisét. Utóbbi kétféleképpen játszódhat le: iniciációs stoppként, vagyis a peptidkötések létrejöttének gátlásaként; vagy elongációs és terminációs stoppként, azaz a riboszóma poliszómába való belépésének gátlásaként. Jó hír viszont, hogy a mikotoxin a májban lebomlik, az izmokban instabil állapotban van, így gyorsan ürül és nem akkumulálódik.

A baromfiiparban a T-2 toxin különböző tüneteket eredményezhet. Tojóállományok esetén nem tapasztalhatunk takarmány-visszautasítást, de jelentős negatív hatással van a tojástermelésre és a tojások keltethetőségére, emellett súlyosan károsítja a májat is (disztrófia, zsírosodás).

Húshasznú brojler csirkék esetén viszont fellép a csökkent takarmányfogyasztás, ezzel párhuzamosan pedig a súlygyarapodás visszaesése is (Kolozsvári, 2009; Yazar and Omurtag, 2008).

Mivel a fent említett mikotoxinok sok esetben az állatok szaporodásbiológiájára fejtenek ki negatív hatást, így megértésükhöz szükséges a mikotoxinoknak kitett állatok embrionális fejlődésének vizsgálata. Emellett a PGC-k is jó eszközt szolgáltatnak a mikotoxinok hatásainak megértéséhez, hiszen ezek a sejtek az embrionális fejlődés során aktívan részt vesznek az ivarszervek kialakításában, viszont *in vitro* is jó hatásfokkal és hosszan tenyészthetőek, ennek köszönhetően pedig alkalmasak környezeti stresszhatások (hőhatások, toxinhatások) vizsgálataihoz.

#### **4. A Fucci transzgén szerepe a sejtenyésztésben**

Miután bemutattam az *in vitro* sejtenyésztési technikákat és az azokból eredő hasznosítási lehetőségeket, fontos kitérni a sejtek egészségi állapotának megfigyelésére is. Erre szolgáltat új módszert a transzgenikus Fucci (fluoreszcens ubikvitináció-alapú sejtciklus indikátor) modell, amit ebben a fejezetben részletesen bemutatok.

##### **4.1. A sejtciklus menete**

A sejtciklus egy olyan fokozottan szabályozott folyamat, melynek célja a genetikai információ megkettőzése és átörökítése a következő generációra. Alapvetően négy fázisra osztható: a mitózisra (M) és a DNS szintézisre (S), valamint az ezeket elválasztó szünetekre (gap; G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>). A sejtciklus a G<sub>1</sub> fázissal indul, melynek során a sejt az extracelluláris mitogénekre és növekedési faktorokra reagál, amelyek hatására beindul a DNS szintézis. Ezek nélkül a sejt differenciálódáson vagy apoptózison mehet keresztül, esetleg vegetatív (G<sub>0</sub>) állapotba kerülhet. A szintézis befejeztével egy gyors átmeneti időszak következik (G<sub>2</sub>), majd végbemegy a mitózis a mitotikus orsók kialakulásával, a kromatidák szegregációjával és a sejtosztódással. Az osztódást követően a sejtek bekerülhetnek egy úgynevezett G<sub>0</sub> fázisba, ami a sejtciklus átmeneti vagy végleges szünetelését jelenti. Ebből a szakaszból külső hatásokra képes a sejt korai G<sub>1</sub> fázisba lépni (Israels and Israels, 2000).

A sejtciklust szabályozó tényezők azt biztosítják, hogy minden lépés hiánytalanul végbemenjen, ezt pedig fázis-specifikus fehérje-expresszióval érik el (Blow and Dutta, 2005). A ciklus motorját a ciklin-függő fehérje kinázok (CDK) alkotják, ahol a ciklinek a regulátor szerepét játsszák, míg a CDK-k a katalizátorok. Minden ciklin a sejtciklus adott fázisához kötött, így a ciklus során mennyiségük emelkedést vagy csökkenést mutat. Ezek a ciklin-CDK

komplexek foszforiláció útján fázis-specifikus fehérje szubsztrátokat termelnek, ezzel lendítve tovább a sejtciklust. A G<sub>1</sub> fázis végén (restrikciós pont; R), valamint a G<sub>2</sub>/M fázishatáron ellenőrzőpontok vannak a káros mutációk kiszűrése végett. Az így érzékelt mutációk súlyossága alapján a sejt megpróbálja kijavítani a hibát, vagy megszakítja a mitózist (Israels and Israels, 2000).

A G<sub>1</sub> fázisban a D ciklincsalád (D1, D2, D3) alkot komplexet a CDK4 és CDK6 kinázokkal. A komplexek kialakulása aktiválja a CDK-kat, így a retinoblasztóma (RB) fehérje foszforilációja beindul. Ez a fehérje fontos szerepet játszik a restrikciós pont ellenőrzésében, ugyanis az E2F transzkripciós fehérje megkötésével transzkripció inhibitoraként viselkednek. Amennyiben az aktív CDK4/6 foszforilálja az RB fehérjét, az elválk a megkötött E2F-től, így beindul a transzkripció, a sejt pedig túllendül az R-ponton. A G<sub>1</sub>/S fázishatáron magas ciklin-E/CDK2 jelenlét figyelhető meg, amit az S szakasz alatt a ciklin-A vált fel. A ciklin-A/CDK2 komplex a DNS szintézis működtetéséhez szükséges. A kései S fázisban a ciklin-A a CDK1-hez kötődik, ami a mitotikus stádiumban is megmarad, kiegészülve a ciklin-B-vel (Israels and Israels, 2000).

Mutáció esetén a sejtciklus leáll, amit a p53 transzkripciós faktor idéz elő az RB foszforiláció gátlásával. A p53-at az MDM2 fehérje regulálja, azaz normál körülmények között alacsony szinten tartja a p53 transzkripciót, valamint csökkenti az aktivitását, az ubikvitinációt, és korlátozza annak transzportját a nukleuszból. DNS sérülés esetén a p53 beköt a szekvencia-specifikus DNS-szakaszra, ennek hatására fokozott p53 termelés lép fel, az ezt követő foszforiláció aktivizálja a fehérjét, így csökkentve az MDM2 kötődését. A p53 a p21-nek nevezett CDK inhibitor szabályozza, ugyanis a kináz aktivitás gátlásával nem lép fel RB foszforiláció, így a sejt G<sub>1</sub> fázisban marad a sérülés kijavításának befejezéséig (Israels and Israels, 2000).

#### 4.2. A FUCCI transzgen felépítése, működési elve

A FUCCI rendszert 2008-ban publikálták először (Sakaue-Sawano et al., 2008) és hamar forradalmasította a sejtek *in vitro* megfigyelését. A technológia alapját két, fejlett eukarióta szervezetek DNS-replikációját szabályozó faktor, a Cdt1 licensz faktor, és annak antagonistája, a Geminin adja. E két faktor jelenléte a sejtciklus során inverzen váltakozik (Arias and Walter, 2007), míg a Cdt1 a G<sub>1</sub> stádiumban, a DNS replikáció előtt tetőzik, és a S fázis elején eltűnik (Nishitani et al., 2000; 2004), addig a Geminin az S és G<sub>2</sub> szakaszokban van jelen (McGarry and Kirschner, 1998). Ezt két E3 ubikvitin ligáz okozza: az APC/C<sup>Cdh1</sup> a Geminint gátolja a mitózis és a G<sub>1</sub> fázis alatt, míg a SCF<sup>Skp2</sup> a Cdt1-et degradálja az S és G<sub>2</sub> stádiumokban. Periodikusan váltott aktivitásukat fokozza az is, hogy az SCF<sup>Skp2</sup> az APC/C<sup>Cdh1</sup> szubsztrátjaként viselkedik (Bashir et al., 2004). A FUCCI rendszer erre a váltakozásra épít két fluoreszcens markerrel,

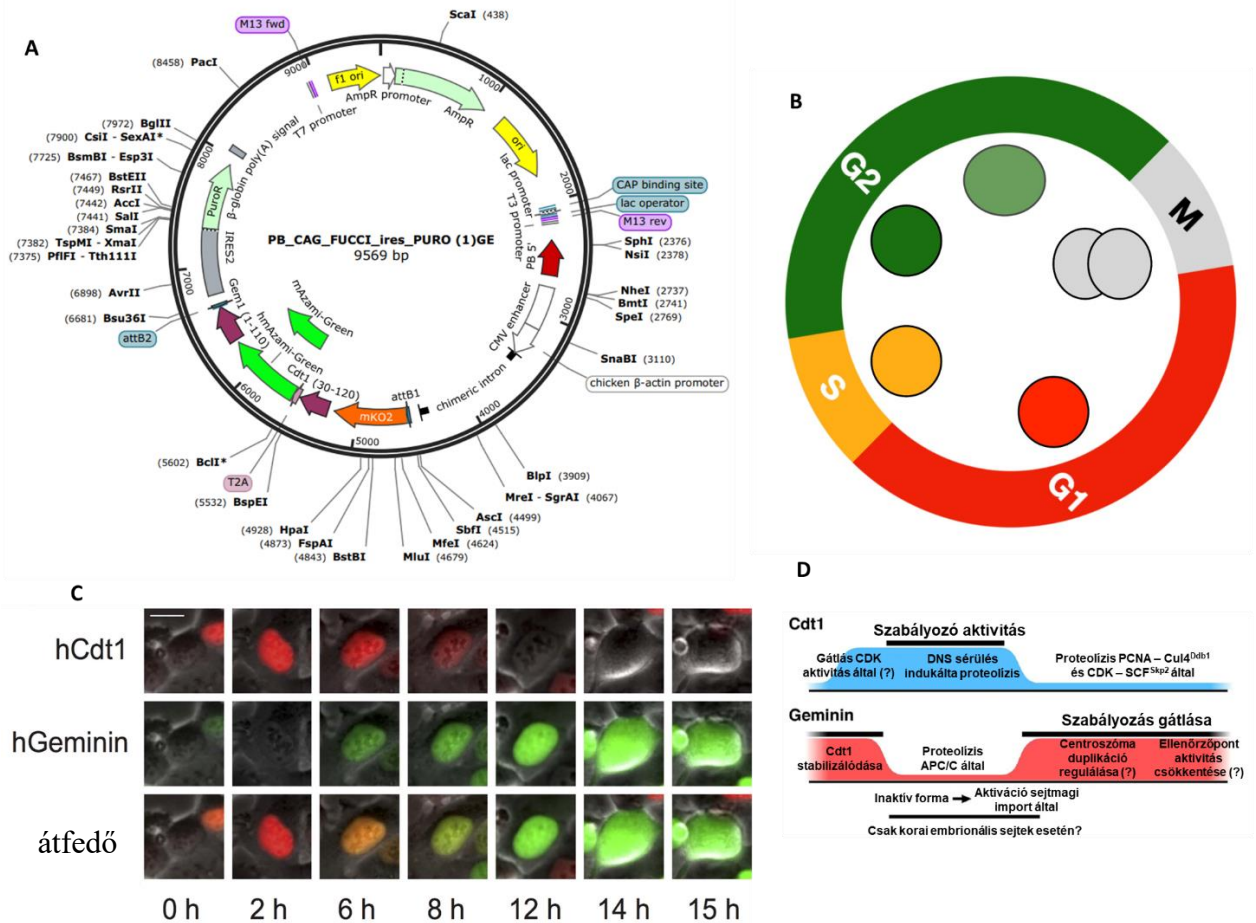
amelyeket a Cdt1ből és a Gemininből származó degronokhoz köt. Ennek köszönhetően a sejtek által expresszált két különböző színű riporter a sejtciklus fázisától függően váltja egymást. Bár lehetséges egy riportert alkalmazó FUCCI rendszer használata is, ez a struktúra kevésbé megbízható (Zielke and Edgar, 2015).

A G<sub>1</sub>-specifikus struktúra a humán Cdt1 fehérje kiméra változatából és a monomer Kusabira Orange (mKO2) riporterből (Karasawa et al., 2004) áll. A humán Cdt1 N-terminális részén található egy PIP-box, amit az S-fázis-specifikus CRL4<sup>Cdt2</sup> felismer. A PIP-boxot egy degronkapcsolt Cy szakasz követi, ami az SCF<sup>Skp2</sup> ubikvitin ligáz target helye. A Cdt1 központi része a Gemininnel történő kölcsönhatásokat szabályozza, míg a C-terminális domén az MCM (minikromoszóma fenntartó) fehérjékért felel (Cook et al., 2004). Arra is fény derült, hogy az N-terminális egy szakasza (hCdt<sub>130-120</sub>) fontos szerepet játszik az S és G<sub>2</sub> során történő gátlásért (Nishitani et al., 2006). Megfigyelték azt is, hogy ez a modell csak az mKO2 és az mCherry riporterekkel működött, monomer Azami-Greennel vagy eGFP-vel nem (Sakaue-Sawano et al., 2011).

A humán Geminin fehérje N-terminális részén egy D-box (destruction box) található, amely kulcsfontosságú az APC/C<sup>Cdh1</sup> szabályozott degradációban. A fehérje középső szakasza egy duplán csavart domén, ami itt is a Cdt1-gyel történő kölcsönhatásért, megkötésért felel (Benjamin et al., 2004; Okorokov et al., 2004). A D-box és a csavart domén között helyezkedik el egy Arg és egy Lys maradvány klaszter. Sakaue-Sawano és munkatársai ezekre terveztek egy fúziós fehérjét, ami az mAG (monomer Azami-Green) riporterből és a humán Geminin N-terminális régiójából áll. Ennél a fragmentumnál a Cdt1-gyel ellentétben nem korlátozott a használt riporterek típusa (Sakaue-Sawano et al., 2008).

A FUCCI modell eredetileg a nukleuszban expresszált, azonban ez, bár megkönnyítette a riporterek detektálását, ezzel együtt ellehetetlenítették a sejtek típusának és differenciációs állapotának megállapítását. Ennek kiküszöbölésére lerövidítették a Gemini szerkezetet azzal, hogy kivágták a KAKK struktúrát, ami a sejtmagi lokalizációért felel. A Cdt1 fragmentum esetén ezt nem sikerült megoldani, viszont ez nem okozott akkora problémát, mivel a hGem<sub>1-60</sub> régióval kombinálva a sejt körvonalai a ciklus nagy részében láthatóak maradnak (Zielke and Edgar, 2015).

2016-ban Koh és munkatársai továbbfejlesztették az alap FUCCI technológiát. Az ő kísérletükben egy lentivírus alapú rendszert dolgoztak ki, ami a két modell helyett egy egységesített expressziós kazettát használt, amit FastFUCCI-nak neveztek el. Ezzel jelentősen egyszerűsítették a transzgenézis végrehajtását és a sejtvonalak karakterizálását is. A struktúra működését sikeresen bizonyították is humán hasnyálmirigy MIA PaCa-2 ráksejteken (Koh et al., 2017). Az általam használt FUCCI konstrukciót az 5. ábrán mutatom be.



**5. Ábra: A FUCCI plazmid konstrukció felépítése és működése.** Az általunk használt FUCCI plazmid már egyben tartalmazza az mAG kapsolt hGeminin és az mKO2 kapsolt hCdt1 konstrukciókat, valamint egy puromicin rezisztenciagént és egy CAG- promótort (A). Ennek köszönhetően a transzgénikus sejtek az osztódást követő G<sub>1</sub> fázisban piros fluoreszcenciát mutatnak, majd korai S fázisban kivilágosodnak és az S, G<sub>2</sub> és M fázisokban zöld fluoreszcenciára váltanak (B,C). Ez az expresszióváltozás a Geminin és Cdt1 aktivitás specifitásának köszönhető, melyet olyan faktorok irányítanak, mint a CDK, az APC/C és az SCF változatai (D). (Módosítva Marcus et al., 2015; Tada, 2007 nyomán.)

#### 4.3. A FUCCI modell felhasználása különböző fajokban

A sejtenyészetek minőségének monitorozása fontos feladat, hogy reagálni tudjunk az esetlegesen felmerülő negatív változásokra (túlnövé, fertőzés, rossz médiumösszetétel). A sejtek apoptózis/nekrózis festése erre jó módszert szolgáltat, azonban az ehhez használt annexin, etidium-homodimer, vagy propidium-jodid alapú festékek csak a sejt kultúrából izolált mintán végezhetőek el, így pontosságukat külső körülmények (pl. mintavétel) befolyásolhatják. Más sejtciklus markerek, mint pl. a nukleotid analógok (BrdU, EdU) és replikációs fehérjék (PCNA, Ki-67) a minták fixálását igénylik, így végképp alkalmatlanok élő organizmusok vizsgálatára (Zielke and Edgar, 2015).

A modell jól felhasználható sejt kultúrák proliferációs rátájának vizsgálatára. Abdulhasan és munkatársai FUCCI egér embrionális őssejteken vizsgálták általános stresszorok (perfluorooktánsav, hiperozmotikus szorbitol) és mutagén stresszorok (benzo(a)pirén) hatását.

Míg az általános stresszorok a sejtciklust a  $G_1$  fázisban akasztják meg, addig a mutagén stresszorok által generált károsodások a  $G_2$  stádiumban kerülnek javításra. Eredményeik jól bemutatták a FUCCI modell használhatóságát a különböző sejt kultúrákat ért stresszorok hatásainak vizsgálatánál (Abdulhasan et al., 2022).

A FUCCI konstrukció felhasználható sejtek vándorlásának követésére és értékelésére is. Pfeiffer és munkatársai FUCCI transzgénikus zebraadánió PGC-kkel vizsgálták a HSP90aa1.2 hősokkfehérje hatását az ősvarsejtek migrációjára. Ez a fehérje embriókban a vándorlás alatti proliferációra és fejlődésre van hatással. Az általuk használt konstrukcióban mCherry riportter gén volt kötve a Cdt1-hez, míg a Geminint mVenus markerrel jelölték. Kutatásuk bizonyította, hogy a HSP90aa1.2 csökkent aktivitása lassítja a sejtciklust, ezzel redukálja a migráció hatékonyságát, valamint zavarja a sejtek MTOC-ra (mikrotubulus organizációs center) alapuló műveleteit (Pfeiffer et al., 2018). Az MTOC-k a nukleusz mögött elhelyezkedő konstrukció fő szerepe a mikrotubulusok irányítása, a fehérje-, és organelumtranszport, és a sejt polaritás kialakítása a mitotikus vagy meiotikus orsó formálása során (Lüders and Stearns, 2007).

A FUCCI sejtek az orvostudományban is fontos szerepet játszanak. Ideális modellt szolgáltatnak a tumor-, és rákkutatásban, hiszen ezek a folyamatok épp a sejtciklus helytelen működéséből következnek, valamint a rájuk alkalmazott terápiák is sokszor a sejtciklust célozzák. Emiatt a gyógyszereszteknél is hasznos eszközök ezek a génszerkesztett sejtenyészetek. Prasedya és munkatársai a karragén (CO) két változatának ( $k$ ,  $\lambda$ ) hatását vizsgálták FUCCI pozitív humán cervikális karcinóma sejteken (HeLa sejteken) timelapse képanalízis segítségével. A karragén egy lineáris kéntartalmú poliszacharid, mely reduktív hatással van a tumornövekedésre. Az eredmények azt mutatták, hogy a  $k$ -CO-val kezelt sejtek ciklusa gátlódott a  $G_2/M$  fázisban, valamint a ciklus hossza is majdnem megduplázódott (kb. 26 óra helyett kb. 50 óra). Ezzel szemben a  $\lambda$ -CO tenyészet, bár nem mutatott fáziseltolódást, a ciklushossz még jobban elnyúlt (kb. 59 óra). Emellett, a  $\lambda$ -CO-val kezelt sejtek, bár újramezlik a sejtciklusukat, nem osztódnak, és a későbbiekben elpusztulnak (Prasedya et al., 2016).

A tumorsejtek vizsgálata FUCCI transzgénikus sejtekkel olyan problémákra világított rá, mint a ráksejtek nyugalmi állapota a tumoron belül. Mivel a ráksejtek csak a tumor felületén osztódnak, a belső sejtek passzívak maradnak. A korai tumorok kb. 90%-a  $S/G_2/M$  fázisban van, míg a közepes méretű daganatokban már csak 30-60% a  $G_2/M$  és 35-70% a  $G_1/G_0$  sejtek aránya. A kései tumorok már 90% körül tartalmazznak  $G_1/G_0$  sejteket. A daganatok külső rétege az implantációs időtől és a tumor korától függetlenül 70-80%-ban  $S/G_2/M$  sejtekből állt, ami jól bizonyítja ezen sejtek osztódását és a növekedés kifelé történő orientációját. Ez korai tumorokban még nem korlátozódik csak a felületi sejtekre. Ennek köszönhető a tumorsejtek ellenállása a citotoxikus rákellenes reagensekkel szemben, hiszen ezek csak az aktív ciklusú

sejteket tudják támadni. Mindezt FUCCI transzgenikus HT-1080 fibroszarkóma sejtekkel bizonyították csupasz egereken (Chittajallu et al., 2015; Yano, Zhang, Miwa, et al., 2014).

Egy újabb terület a daganatok vérellátásának vizsgálata a tumorsejtek proliferációjára. Multifoton lézermikroszkóppal egerek koponyaablakán keresztül sikerült megfigyelni, hogy a tumorsejtek eleinte a vérerek ágaiban állapodnak meg, majd kilépnek az erekből és perivaszkulárisan kezdenek növekedni angiogenezissel (Kienast et al., 2010). FUCCI sejtekkel azt is sikerült bizonyítani csupasz egerekben, hogy a daganat felszíne mellett csak a tumorerekhez közel proliferálnak a sejtek (Yano et al., 2017).

A sugárterápiás kísérleteknél történt felhasználásuk mellett új onkológiai technológiák kialakítására is felhasználják a FUCCI modellt. Mivel a sejtek az S/G<sub>2</sub>/M fázisokban érzékenyebbek a DNS-károsító kezelésekre, telomeráz-specifikus onkolitikus adenovírussal (OBP-301) 'csapdázták' a nyugalmi állapotban levő ráksejteket (Yano et al., 2013). Ez a technológia jól működött rekombináns metionináz (rMETáz) és ráksejt célzó *Salmonella typhimurium* A1-R felhasználásával is (Yano et al., 2016; Yano, Zhang, Zhao, et al., 2014).

Érdemes megemlíteni a FUCCI felhasználását a szövetfejlődés és a sérülés esetén fellépő szövet-regeneráció területén. Ezt különböző egértípusokban vizsgálták, többek között májszövet (Chen et al., 2019a) és szívszövet (Choi et al., 2013) felhasználásával. Emellett pluripotens embrionális őssejteken (Chang et al., 2020) és idegi őssejteken (Chicheportiche et al., 2018) is végeztek FUCCI kísérleteket.

Összességében kijelenthető, hogy bár eddig számos fajba adaptálták a FUCCI transzgén komplexet, eddig még nem használták ezt a technológiát nagy gazdasági szereppel bíró állatfajokban. Ez az adaptálás más fajokba néha nehézségeket okozott. Sugiyama és munkatársai FUCCI pozitív zebradániót céloztak létrehozni. Azonban, bár a sejtciklus folyamatai általában jól konzerváltak evolúciósan, ebben az esetben a Cdt1 degradáció alapú markerrendszer nem működött jól, feltételezhetően azért, mert halak E3 ligáz komplexe nem végezte megfelelően az ubikvitinációt. Ezért új, Cul4<sup>Dbp1</sup> szabályozott Cdt1 degradációs jelátvitelre optimalizált FUCCI struktúrát fejlesztettek ki, mely a nem emlős rendszerek kifejlesztésének megkönnyítését célozta (Sugiyama et al., 2009).

Abe és munkatársai a FUCCI2 transzgént fejlesztették tovább egér sejtekben. A FUCCI2 módosulatban az mKO2 helyett mCherry, az mAG helyett pedig Venus riportert használnak, hogy jobban elkülöníthetővé tegyék a két markert. Abe és csoportja emellett az eredeti CAG promótert is megváltoztatta, ugyanis a CAG egy virális eredetű, és több sejttypusban is csak gyengén, vagy egyáltalán nem aktív (barázdálódó embrió, extraembrionális szövetek). Ezt a problémát a random integrálódás csak súlyosbítja. Ennek kiküszöbölésére kétféle *Rosa26* lókuszra specifikus promótert készítettek: az *R26p* egyesével irányította az mCherry-



hCdt1(30/120) és az mVenus-hGem(1/110) szekvenciákat egy transzgénbe; az *R26R* pedig magára az *R26* lókuszra építette be a kettőt, minkettő elé egy *loxP*-végű stopszignált helyezve. A *R26p* modellnek nagy előnye lett, hogy magasabb expresszióval rendelkeztek a riporterek, több sejtípust lehetett felhasználni, valamint a CAG-FUCCI-val ellentétben, melynél a két riporter struktúra akár különböző kromoszómákra is beépülhetett, itt egy génen belülre került a két inszerció (Abe et al., 2013). Ez a korábbiakban már ismertetett FastFUCCI konstrukció (Koh et al., 2017) kifejlesztése előtt hatalmas jelentőséggel bírt.

Zielke és munkatársai a gerinctelen modellállatokat vették célba, amikor adaptálták a FUCCI-t ecetmuslicára. Ezúttal ismét a transzgén szerkezetén kellett változtatni, ezúttal a Cdt1-et az E2F1 N-terminális szakaszára cserélték, ami a CRL4 ubikvitin ligázt szabályozza, a Geminint pedig egy CyclinB degronnal helyettesítették. Emellett többféle promotert (UAS<sub>t</sub>, UAS<sub>p</sub>, QUAS, poly-ubiquitin) is kipróbáltak, hogy maximalizálják a transzgén hatékonyságát. Ezt a modellt ezután több *Drosophila*-sejtípust is sikeresen használták (Zielke et al., 2014).

A konstrukció felhasználásának sokszínűségét mutatta Duerr és munkatársainak kísérlete, akik szövetregenerációt tanulmányoztak FUCCI segítségével axolotlökben (*Ambystoma mexicanum*). Ezek a kétéltek képesek amputált végtagjaikat visszánöveszteni felgyülemelő gyorsan proliferáló blasztéma sejtek segítségével. A kutatás alapján ezek a sejtek G<sub>1</sub> fázisban maradnak az idegszálak megszakítása után, ami az ezeken érkező mitogén faktorok (NRG1, transzferrin, FGF/BMP változatok) hiányából adódhat. Emellett a gerincvelő megszakítása után proliferáló ependimális sejteket figyeltek meg a velőben a sérüléstől majdnem 5 mm-re is, aminek oka lehet egy szisztematikus proliferációs válasz a sérülés után, egy egész szervet átívelő proliferációs válasz, vagy akár egy neuronelhalás által kiváltott proliferáció (Duerr et al., 2022).

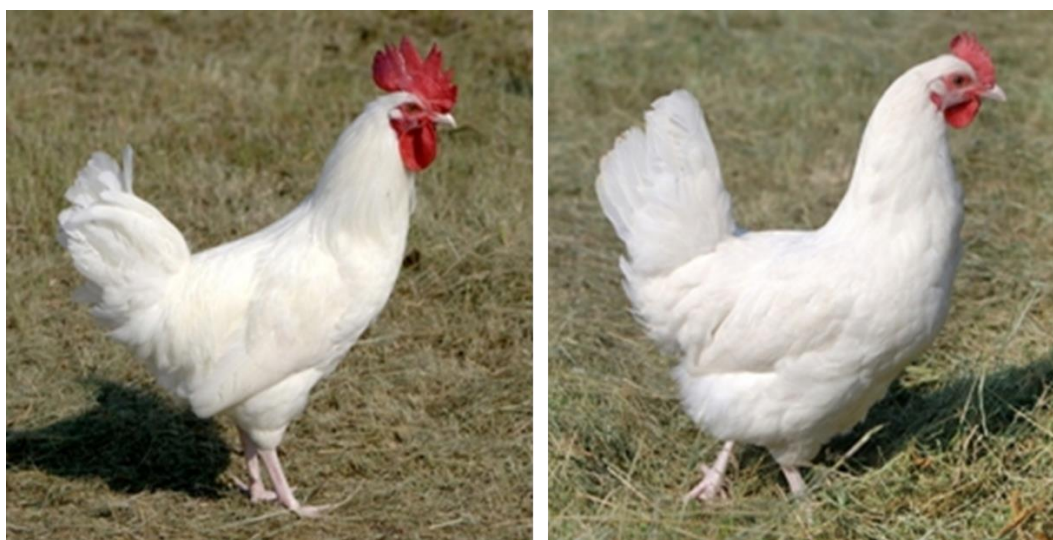
Mivel a fentiek alátámasztják, miszerint a FUCCI konstrukció eddig nem volt elérhető gazdaságilag fontos fajok számára, valamint ez kiegészül a madárfajok fejlődésbiológiai kísérletekben mutatott nagy potenciájával, ezért számunkra ideális választás volt a házityúk faj FUCCI kísérletek tervezésére.

## II. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 1. A kísérletben résztvevő állományok jellemzése

#### 1.1. A fehér magyar tyúkfajta bemutatása

A magyar tyúkfajtákra általánosságban jellemző a közepes testméret (tyúkoknál 2,0-2,3 kg, kakasoknál 2,5-3,0 kg átlag), a jól fejlett, domború mellizom, a magasan tűzött szárny és a mély tojóhas. Lábuk középhosszú, sárga. Fejük kicsi, koponyacsontjuk domború, csőrük rövid, de erős tövű. A taréj közepes méretű, csipkézett fűrésztaraj, mely hátranyúló, felálló, de tojók esetén sokszor dőlt. Az áll-lebeny lekerekedő, a füllebeny ovális, élénkvröses. Mivel a fajta kettőshasznosítású, jó minőségű, finom rostú, ízletes hússal rendelkezik, de emellett tojástermelése sem elhanyagolható (140-150 db/év) (6. ábra).



6. Ábra: Fehér magyar tyúk ([www.genmegorzes.hu](http://www.genmegorzes.hu))

A fehér magyar mellett létezik még kendermagos, sárga és fogolyszínű magyar tyúkfajta is. Az általunk választott egyedek tolla fényes fehér, de idősebb egyedeknél kissé besárgulhat. Csibéik napos korban szintén fehérek. Tojásuk világosbarna, viszonylag kis méretű. Eredetileg az Alföldön és a Duna-Tisza közén volt elterjedt, mivel színezetének köszönhetően jól bírja a napnak való direkt kitétséget (Szalay, 2015). Kísérletünkhöz azért ezt a fajtát választottuk, mert a vele végzett *in vitro* műveletek már jól meghatározottak, és Lázár Bence kollégám által körültekintően dokumentáltak (Lázár et al., 2021).

### *1.2. Állatkísérleti engedélyek*

A kísérlethez felhasznált állatokat a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézet (NBGK HGI) biztosította. A tartáskörülmények megfeleltek a Magyar Állatvédelmi Törvény (1998. XXVIII.) által előírt normáknak. Emellett az NBGK HGI rendelkezik a szükséges Nemzeti Élelmiszerlánc-bizottsági Hivatal Állat-egészségügyi és Állatvédelmi Igazgatósága által kiállított állatkísérleti engedéllyel. A kísérleteket a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Genetika és Biotechnológia Intézet Alkalmazott Embriológia és Össejtbiológia Csoportjának (régiben Nemzeti Agrárkutatói és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet) laboratóriumában végeztem az intézet jóváhagyásával, és az általa biztosított állatkísérleti és transzgénikus állat-előállítás engedélyek értelmében.

### *1.3. Az állományok tartástechnológiája*

Az őscsírasejt-tenyészetek alapításához használt tojások az NBGK HGI génbanki állományából származtak. Az állatokat kültéri kifutóval rendelkező ólakban tartották, 5-6 egyed/m<sup>2</sup> állománysűrűséggel és 7 tojó 1 kakas ivararányban. A tojásrakás kétszintes tojófészekben történt, 5 tojó/tojófészkek használati intenzitással. Az állomány takarmányozása tojótáppal történt, *ad libitum*. A tápot a jobb tojásminőség érdekében mészgittel egészítették ki. A tojásokat naponta kétszer gyűjtötték, majd hűtött tojástárolóba helyezték őket. Maga a keltetés már a MATE GBI laboratóriumában történt Midi F500S keltetőgépben (PL Machine Kft. Tárnok, Magyarország), 37,8°C hőmérsékleten, 70% páratartalommal, óránként kétszeri 45°-os forgatással.

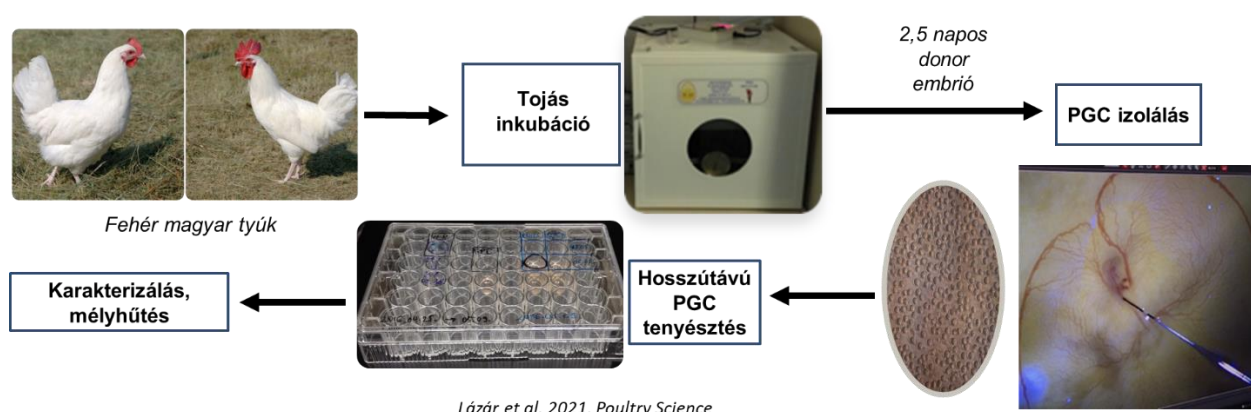
## **2. Az ősvarsejtek izolálása**

A vérvételt Hamburger&Hamilton 15-17. stádiumú (kb. 51-56. óra) embriókból végeztem. A tojásokat a keltetőből kivéve a keltetőben elfoglalt pozíciójukat megtartva fertőtlenítettem 70%-os alkohollal, majd petricsészébe törtem őket, vigyázva, hogy a szikmembrán ne sérüljön, valamint az embrió a szik tetején helyezkedjen el. Maga a vérvétel mikroszkóp alatt, szájpipettára erősített steril üveg mikropillárisal történt, amelynek átmérője kb. 30-40 µm átmérőjű volt. A behatolás az embrió dorzális aortájába történt, ahonnan nagyjából 1,5-2,0 µl vért szívtam le. Ezzel párhuzamosan minden embrióból szövetmintát is izoláltam a későbbi ivarmeghatározás céljából, amit -20°C-on tartottam későbbi analízisig. Minden vérvétel adatait (sorszám, időpont, fejlődési stádium, deformitás) dokumentáltam.

### 3. Az ősvarsejt-vonalak alapítása és fenntartása

Az ősvarsejteket tartalmazó vért PGC tenyésztőmédiumba cseppentettem, amit előzőleg 48-lyukú szövettenyésztő plate lyukaiba mértem ki (300 µl/lyuk). A tápoldatot a Whyte és munkatársai által leírtak alapján (Whyte et al., 2015) állítottam össze (MI. Melléklet). Ez egy szelektív médium, amely támogatja a PGC-k proliferációját, míg eliminálja a vér többi alkotóelemét. Ennek a tápoldatnak a segítségével már 2-3 hét elteltével az izoláció után stabil ősvarsejt-tenyészetek nyerhetőek. A tápoldatot a tenyészeteken egy héten háromszor (hétfő-szerda-péntek) cseréltem. A sejtenyészeteket CO<sub>2</sub>-termosztátban (Sanyo MCO-19AIC (UV) Incubator, Sanyo, Japán) 38°C hőmérsékleten, magas páratartalom és 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett tartottam fent. A magas páratartalom a tenyésztőmédium párolgásának, és ezzel a koncentráció változásának megakadályozására szolgált.

A megfelelő sejtenyészetek három hét után elérték a  $1 \times 10^5$  sejtszámot. A sejtek nagy méretüknél fogva optimális esetben a wellek alján úszva helyezkedtek el, letapadás nélkül. Kis sejtszámnál kb. a médium 30%-át távolítottam el óvatosan a sejtek fölül, majd friss tápoldattal pótoltam. Nagy sejtszámnál a túlnövés elkerülése érdekében a tenyészeteket felszuszpendáltam, a sejtszuspenzió felét új lyukba passzáltam, majd a wellekből a hiányzó mennyiséget friss médium hozzáadásával pótoltam. A tenyészetek megfelelő minőségének fenntartása érdekében szükség esetén a vonalakat 1,5 ml-es csövekben centrifugáltam (800 x g, 3 perc), a felülúszótól elkülönített sejt pelletet pedig DPBS-sel (Gibco, 14190-144, USA) átmostam az elhalt sejtek és más törmelékek eltávolítása érdekében. A teljes folyamatot a 7. ábrán szemléltettem.



**7. Ábra: Ősvarsejt-vonalak alapítása.** A fajtatiszta, génbanki minőségű fehér magyar tyúktojásokat az NBGK HGI állományából kaptam. 2,5 napig inkubáltam őket 37,8°C hőmérsékleten és 70% páratartalommal, majd szájpipettára erősített mikropipettára segítségével vért vettem az embriók dorzális aortájából. Mivel ez a vér tartalmazta a véráramban vándorló ősvarsejteket, a mintákat tenyésztőmédiumba fűjva sejtenyészeteket alapítottam. A specifikus tenyésztőmédium 3 hét alatt eliminálta a vér sejtjes elemeit, míg a PGC-eket támogatta a proliferációban, így tiszta ősvarsejt-vonalakhoz jutottam. A megfelelő sejtszám elérését követően a vonalakat karakterizáltam és mélyhűtöttem a későbbi felhasználás érdekében. Ez a módszer már évek óta jó hatásfokkal működik laborunkban több tradicionális magyar fajta bevonásával. (Szerkesztve Lázár et al., 2021 nyomán.)

#### 4. Az ősvarsejt-vonalak jellemzése

##### 4.1. Ivarmeghatározás

Az ivarmeghatározáshoz a mélyhűtött embrionális szövetmintákat felolvasztottam és kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, 11796828001, USA) segítségével izoláltam belőlük a DNS-t, a cég által megadott protokoll szerint. Az ivarmeghatározáshoz a CHD1 primerpárt használtam (Griffiths et al., 1996; Lee et al., 2010). A DNS minták koncentrációját 25 ng/μl töménységűre állítottam be NanoDrop spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével és MyTaq Red Mix (Bioline Reagents Ltd. UK) hozzáadásával. A PCR-t a ProFlex PCR System (Applied Biosystems, USA) segítségével végeztem. A program első, denaturációs szakasza 1 percen keresztül tartott, ezalatt a minták 95°C-on voltak. A második fázis egy 15 másodperces, 95°C-os, egy 30 másodperces, 48°C-os, és egy 10 másodperces, 72°C-os szakaszból állt. A második fázis huszonnyolc ciklusból állt, míg a számunkra szükséges DNS-szekvenciák felszaporodtak. Ezt egy 5 perces, 72°C-os harmadik fázis követte (*M2. Melléklet*). A kapott termékeket gélelektroforézissel vizsgáltam 1,5%-os gélen, 90 V-os feszültség mellett, kb. 30 percen keresztül. A gélfotókat ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories Inc., USA) géldokumentációs rendszer segítségével készítettem el.

##### 4.2. RNS expressziós vizsgálatok

A stabil sejtenyészetekből sejtmintákat gyűjtöttem, majd PBS-sel átmostam, centrifugáltam és lízis pufferben mélyhűtöttem azokat. Az RNS izolálást a felolvasztást követően, 125 μl tiszta etanol hozzáadása után az RNAaquarius™-Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific, AM1931, USA) protokollja szerint végeztem. A 25 ng/μl végkoncentrációt NanoDrop segítségével állítottam be. 15 μl mintát 15 μl MasterMix-szel kevertem össze, utóbbit a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814, USA) leírása szerint állítottam össze. A PCR protokoll a következő volt: 10 perc előmelegítés 25 °C-on, 120 perc inkubáció 37 °C-on, és egy 5 perces hőkezelés 85 °C-on (összesen 135 perc).

Az így kapott cDNS mintákat kvantitatív real-time PCR-rel vizsgáltuk. Az ehhez használt reagens mintánként 5,75 μl nukleázmentes vizet, 7,5 μl Power SYBERGreen Master Mixet (Applied Biosystems, 4368575, USA), 0,75 μl forward és reverse primert, valamint 0,5 μl cDNS mintát tartalmazott. Glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) (Integrated DNA Technologies, USA) primert használtam kontrollnak, míg a házityúk VASA homológot (CVH) (Integrated DNA Technologies, USA) és a *DAZZL* gén primerét (Deleted in azoospermia-like gene) (Integrated DNA Technologies, USA) össejtspecifikus markerként alkalmaztam. Minden mintát három ismétlésben helyeztem fel. Magához a qPCR-hez a Mastercycler® Realplex Real-

Time PCR System (Eppendorf, Németország) gépet használtam. A PCR program a következő szakaszokból állt: 10 perc 95 °C-on; 40 ciklus (15 másodperc 95 °C-on, 40 másodperc 60 °C-on, és 20 másodperc 68 °C-on); 15 másodperc 95 °C-on, 15 másodperc 48 °C-on, és 15 másodperc 95 °C-on. Az utolsó fázist egy 10 perces előmelegítés előzte meg (*M2. Melléklet*). Referencia festékként ROX-ot használtam.

#### *4.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok*

A részletes protokoll az *M3. Mellékletben* található. A minták fixálása előtt a sejteket PBS-ben mostam, majd tárgylemezre cseppentettem őket 0,1%-os BSA (Sigma, A3311, USA) tartalmú PBS-ben. A fixálás 4%-os PFA-val (Fluka, 30525-89-4, Svájc) történt. Ezután blokkoló oldatot (PBS, 0,1% BSA, 0,1% TritonX (Fluka, 93426, Svájc), 2,5% szamár szérum) tettem a mintákra. Erre azért volt szükség, hogy blokkoljam a nem szükséges expressziós helyeket, valamint áthatolhatóvá tegyem a sejtmembránt az elsődleges és másodlagos ellenanyagok számára.

Össejtspecifikus anti-SSEA-1 (Millipore, MC480, Németország) és ivarsejt-specifikus anti-CVH (Dr. Bertrand Pain, Stem cell and Brain Research Institute (SBRI), Lyon, Franciaország) elsődleges ellenanyagokat használtam, előbbit az Anti-Mouse-IgM-rD549® (Jackson ImmunoResearch, 715-505-140, USA) vörös másodlagos ellenanyaggal, utóbbit az Alexa Fluor® 488 Anti-Rabbit-IgG (H+L) (Life Technologies/Molecular Probes, A-21207, USA) zöld másodlagos ellenanyaggal párosítottam. Mélyvörös TO-PRO™-3 jodid (642-661) (Invitrogen, T3605, USA) nukleuszfestéket használtam minden mintánál (Bink et al., 2001), amit aztán digitális módosítással kék színnel jelöltünk a képeken. Ezután a mintákat ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, P36962, USA) fedőoldattal és fedőlemezzel borítottam. A kész minták kiértékelését Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóp (Leica, Németország) segítségével végeztem.

#### **5. A sejtvonalak mélyhűtése és felolvasztása**

Négy hét tenyésztés után az alapított PGC vonalak már nem tartalmaztak vér sejteket, folyamatosan osztódó PG sejteket tartalmaztak, így sor kerülhetett a mélyhűtésükre. Az ideális sejtszám (kb. 80.000 sejt/300 µl médium) és tisztaság ellenőrzését a NanoEntek Arthur fluoreszcens sejtszámoló géppel (NanoEntek, Dél-Korea) végeztem a sejtek mérete és alakja alapján. A mélyhűtésnél a Kong és mtsai által kidolgozott FAM2 mélyhűtő médiumot használtam, amely 10% FBS-t (Gibco, 10108-165, USA) és 10% DMSO-t (Sigma, D2650, USA) tartalmazó DMEM tápoldatból áll (Kong et al., 2018).

A mélyhűtés előtt a sejteket centrifugáltam, átmostam őket PBS-ben, és sejtszámológép segítségével 100.000 sejtől álló csoportokra osztottam őket. A sejteket ezután 3:1 arányú DMEM+víz keverékben szuszpendáltam. A mélyhűtő médiumot kétszeres koncentrációra (20% DMSO) alakítottam ki, majd fagyasztócsövekbe kimértem 250 µl-t a sejtsuszpenziókból. Ezekre ugyanennyi mélyhűtő médiumot pipettáztam, ezzel a közeget 10% DMSO koncentrációra hígítva, majd a mintákat minél előbb Mr. Frosty™ Freezing Container (Thermo Fischer, USA) mélyhűtő dobozba tettem, és egy éjszakányi -80°C-os tárolás után -150°C-os fagyasztóba helyeztem át. Mivel a DMSO szobahőmérsékleten erős sejtméreg, a mintákhoz való hozzáadását cseppenként végeztem, majd törekedtem arra, hogy a sejtek minél hamarabb -80°C-ra kerüljenek.

A felolvasztás során a mintákat 90 másodpercig 38°C-os vízfürdőbe helyeztem, majd a lehető leggyorsabban 900 µl 3:1 DMEM+víz keveréket adtam hozzájuk, hogy a hígítással enyhítsem a DMSO káros hatását. A sejteket centrifugáltam, a felülúszót leszívtam, és újabb mosást követően tápoldatban szuszpendálva 24 lyukú szövettenyésztő plate-re helyeztem ki őket. A sejtvonalak felvételét követően két napig naponta cseréltem médiumot a tenyészeteken, hogy biztosítsam a megfelelő körülményeket a sejtek akklimatizációjához.

## **6. FUCCI transzgenézis házityúk ősvarsejteiben**

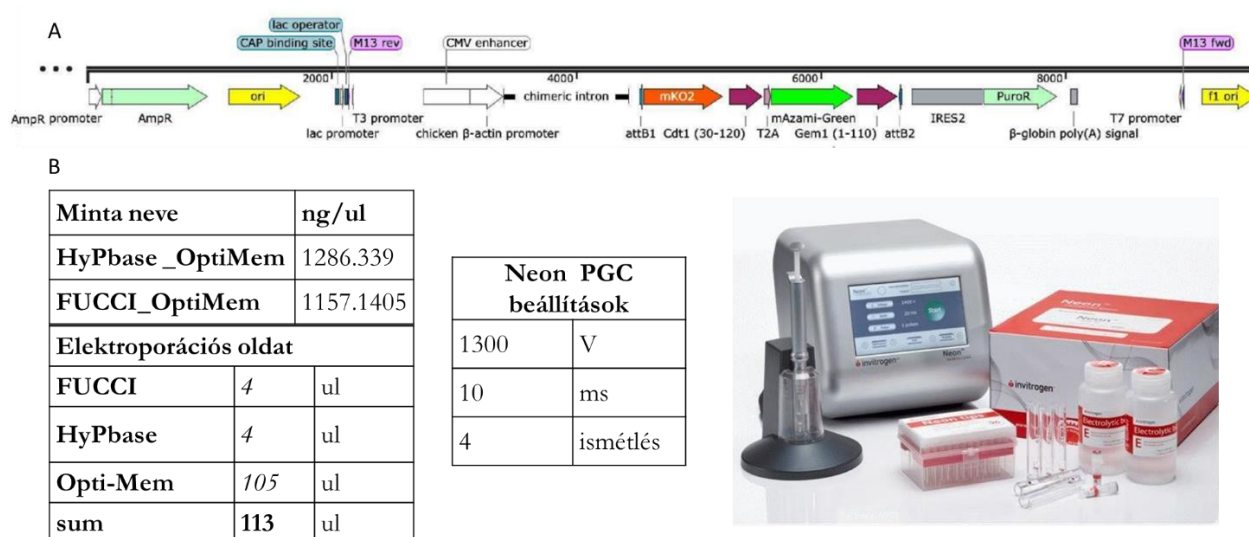
### *6.1. Plazmid izolálás*

A FUCCI transzgént, a piggyBac transzpozont és a hypBase transzpozázt Dr. Nagy András szolgáltatta (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute, Toronto, Kanada). A plazmidokat Dr. Hoffmann Orsolya (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Modellállat Genetika Csoport) segítségével kompetens *Escherichia coli* sejtekbe transzformáltuk, majd ezeket a baktériumokat tápoldaton tenyésztettem, hogy telepeket nyerjek. Az így felnőtt baktérium tenyészetek minden különálló telepe egy adott transzformált baktérium leszármazottait tartalmazta, így individuális telepeket gyűjtöttem és helyeztem őket külön folyékony tápoldatokba. Mikor a folyékony tápoldatban történő tenyésztés hatására a kultúrák elérték a kívánt sejtsűrűséget, az EndoFree® Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 169026122, Németország) segítségével izoláltam a plazmid DNS-t. A mintákat vagy OptiMEM tápoldatban (Gibco, 11058-021, USA), vagy PBS-ben hígítottam a kívánt 1200 ng/µl koncentrációra, hogy összehasonlítsam a két oldat esetleges hatásait az elektroporálás sikerességére.

## 6.2. Elektroporálás

A sejtvonalak jellemzése alapján az '1111' kódú nőivarú és az '1116' kódú hímivarú sejtvonalat választottam ki a transzgenézishez, mivel ezek előzetesen karakterizált, stabil tenyészetek voltak. A két vonalat külön-külön összegyűjtöttem, majd 20 µl-t félreraktam belőlük továbbtenyésztésre abszolút kontrollnak, a maradékot pedig centrifugáltam, PBS-be helyeztem át és megmértem a sejtszámot. Ezután a sejteket centrifugáltam, eltávolítottam a PBS-t, és annyi OptiMEM tápoldatba szuszpendáltam fel őket, hogy kialakítsam az 1 millió sejt/100 µl oldat koncentrációt. Ebből a sejtsuszpenzióból háromszor 100 µl-t mértem szét, egyet az OptiMEM-mel hígított plazmidokhoz, egyet a PBS-sel hígított plazmidokhoz, egyet pedig elektroporálási kontrollnak. Emellett 30 µl sejtsuszpenziót OptiMEM-ben tartottam 15 percen keresztül, hogy megfigyeljem az oldat sejtekre gyakorolt hatását is.

Az elektroporálás menetét a kollégám, Dr. Tóth Roland által Dr. Wilfried A. Kues laboratóriumában (Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt, Németország) elsajátított módszer szerint határoztam meg (Altgilbers et al., 2021). Ez alapján 100 µl sejtsuszpenzió elektroporálásához 10 µg plazmid DNS-re volt szükség, amit 8 µl oldatban oldottam fel. A FUCCI plazmid és a hyPBase enzim aránya a reakcióban 1:1, így 4-4 µl oldatban 5-5 µg volt a plazmid mennyisége, így 1,2 µg/µl lett a plazmid végső koncentrációja. A transzfektáláshoz a Neon Transfection System (Invitrogen, MPK5000, USA) elektroporátort és kiegészítőit használtam. A gép beállításai a következők voltak: 1300 V feszültség, 10 ms időtartam és 4 ismétlés. Ezen metódus részleteit a 8. ábrán foglaltam össze.



**8. Ábra: A sejtek transzfektálásának bemutatása.** A transzgén mérete nagy volt, mivel egyszerre tartalmazta a Cdt1-mKO2 és a Geminin-mAG konstrukciókat, valamint a szelektálást elősegítő puromicin rezisztencia génjét (A). Emiatt a piggyBac transzpozon specifikitásának emelése érdekében HyPbase transzpozázt használtam. Ennek segítségével pontosabban tudtam a célszekvenciát beépíteni az örökítőanyagba. Az elektroporálás részleteit és az oldat részarányait a szakirodalom alapján határoztam meg (B) (Altgilbers et al., 2021).



### *6.3. Transzgénikus sejtvonalak alapítása és fenntartása*

Az elektroporátor-tüben transzfektált sejtoldatot 1-1 csepp formájában a 12-lyukú szövettenyészítő plate-re előre kikészített tenyésztőmédiumba helyeztem, két külön lyukba. A kísérlet másnapján a sejtvonalakot Leica DFC 7000T sztereómikroszkóp (Leica, Németország) segítségével vizsgáltam, hogy ellenőrizsem azok fluoreszcenciáját, és ezzel az elektroporálás sikerességét. A sejtvonalakot az előzőekben már leírtak szerint tenyésztettem tovább.

Az alapított fluoreszcens transzgénikus vonalakat minden második nap ellenőriztem a sztereomikroszkóp alatt. Emellett az elkövetkező hónap során többször ellenőriztem a sejtszámot és a zöld/piros sejtarányt az Arthur fluoreszcens sejtszámlálógéppel, valamint fotókat is készítettem a Leica konfokális mikroszkóppal. Utóbbi vizsgálatokhoz TO-PRO-3™ magfestékkel jelölt mintákat is használtam. Ezek alapján megbízhatóan nyomon tudtam követni a sejtvonalak fejlődését. Tíz nappal az elektroporálást követően a tenyészetek elérték a megfelelő sejtszámot ahhoz, hogy vonalanként két mintát mélyhűthessek, ezzel biztosítva a hosszútávú fennmaradásukat.

### *6.4. Egysejt alapú klóntenyészetek alapítása*

A tiszta transzgénikus tenyészetek létrehozása érdekében egysejt alapú klóntenyészeteket alapítottam. Ehhez 12-lyukú szövettenyészítő plate-re 1800 µl médiumot mértem ki, majd hozzáadtam 100 µl sejtszuspenziót. Az így tizenkilencszeresére hígított sejtoldatból egy kis petricsészébe 80 µl-es cseppeket tettem ki. Ezekből válogattam ki a fluoreszcens sejteket üveg mikropipettával ellátott szájpipetta segítségével. Mivel sokszor egyszerre több sejtet sikerült csak felszívni a kapillárisba, beiktattam egy 30 µl-es ellenőrzőcseppeket, ahová kifújva a kapilláris tartalmát, meg tudtam bizonyosodni róla, hogy a végső 30 µl-es médiumcseppbe már csak egy darab fluoreszcens sejt kerül.

Igyekeztem nagyméretű, zölden fluoreszkáló sejteket kiválasztani, mivel ezek feltehetően osztódás előtt álltak. A PGC-k alapvetően jobban fejlődnek csoportban, feltehetően a társaik által termelt növekedési faktoroknak köszönhetően, így az osztódás előtt álló sejtek kiválogatásával segíteni tudtam a csoportos fejlődést. A végleges cseppeket ismét ellenőriztem, hogy bennük csak egy, fluoreszcenciát mutató sejt található, ezek után pipettával éles szögben felszívtam a médiumot, és óvatosan egy 96-lyukú szövettenyészítő plate 70 µl médiumot tartalmazó lyukaiba cseppentettem a sejtet.

A nőivarú 1111 vonalból alapított egysejt tenyészeteket FCF (FUCCI female), a hímivarú 1116 vonalból alapítottakat FCM (FUCCI male) névvel jelöltem. Mindkét nemből 20-20 klónvonalat próbáltam alapítani 10 nap leforgása alatt (FCF1-9.: 2022.11.23.; FCF10-20+FCM1-5.: 2022.11.24.; FCM6-8.: 2022.11.30.; FCM9-20.: 2022.12.02.). Az alapítást követő első héten a

sejtekről nem távolítottam el médiumot, csak kétnaponta hozzáadtam 30  $\mu$ l-t. A sejteket heti egyszer alapos ellenőrzésnek vettem alá a sztereómikroszkóp alatt. Ezt azért nem végeztem gyakrabban, mert a fluoreszcencia jel megfelelő gerjesztéséhez a tenyésztőlemez fedelét el kellett távolítani, így minden ellenőrzéssel kockáztattam a tenyészetek befertőződését.

Három héttel az első alapítások után 6 klónvonal maradt fenn, három hím (FCM5-7-8) és három tojó (FCF3-4-5) eredetű sejttenyészet formájában. Ezekből az FCF3-4 vonalak, bár kezdetben rendelkeztek fluoreszcencia szignállal, eddigre elvesztették azt. A hat vonalat külön csövekbe mélyhűtöttem a későbbi felhasználás céljából (1 cső/vonal). Mivel a sejtek minősége és a fluoreszcencia erőssége is az FCF5 és az FCM5 vonalakban volt a legkiemelkedőbb, ezért ezt a két klóntenyészetet választottam ki a további kísérletek elvégzésére.

## **7. A FUCCI transzgenikus sejtvonalak stabilitásának igazolása**

### *7.1. A beépülési potenciál vizsgálata: FUCCI sejtek injektálása recipiens embriókba*

A kísérlet folytatásakor a sejtvonalakat a fentiekben leírtak szerint felolvasztottam és újra tenyésztésbe vettem. Mikor a tenyészetek elérték a kívánt sejtmennyiséget és minőséget, egy részüket mindkét nemből összegyűjtöttem, centrifugáltam és 3:1 arányú DMEM-víz keverékbe kevertem. Ezután sejtszámolás segítségével kialakítottam az injektáláshoz ideális 5000 sejt/ $\mu$ l koncentrációt. A szuszpenziókat a kísérlet megkezdéséig (de maximum néhány órára) 1,5 ml-es csövekben az inkubátorba helyeztem 38°C-on.

Az injektáláshoz fehér magyar házityúk tojásokat inkubáltam 60-65 órán keresztül, hogy a bennük levő embriók elérjék a HH 16-17. stádiumot. A keltetés menete az előzőekben leírtak szerint történt, kivéve, hogy a tojások forgatását a munka megkezdése előtt 3-4 órával leállítottam, hogy az embriók biztosan a tojás felső laterális oldalán helyezkedjenek el. A tojásokat a laborban 70%-os alkohollal fertőtlenítettem, majd csipesszel óvatosan ablakot nyitottam a mészhéj tetején, valamint a légkamránál is, hogy a fehérje le tudjon válni a belső membránról. Eltávolítottam az ablaknál a membránt, néhány csepp PBS-sel megakadályoztam az embrió kiszáradását, majd szájpipettára rögzített üveg mikropillárba 2  $\mu$ l melegített sejtsuszpenziót szívtam, és a kapillárist az embrió szívcsövébe vezetve a sejteket a véráramba injektáltam. A tojást ezután UV-fény alatt sterilizált parafilmmel lezártam, és az embriót az ablakkal ellentétes oldalra forgatva visszahelyeztem azt a keltetőbe.

Az injektált embriókat a keltetés 7. napján kibontottam a tojásokból és izoláltam a gonádokat. Azért ezt az időpontot választottam, mert a szakirodalom alapján ekkor az ősvarsejtek már a gonádban tartózkodnak, és egészen a nyolcadik napig proliferálnak is (Méndez et al., 2005), így a FUCCI működése még megfigyelhető. Az izolált gonádokat frissen

sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk és fotóztuk, hogy bizonyítsuk a fluoreszcens jel jelenlétét. Történtek próbálkozások a gonádok PFA-val való fixálására és későbbi konfokális vizsgálatára is, ez azonban nem volt sikeres, feltételezhetően a FUCCI fehérjék nagyon gyors lebomlása miatt.

### *7.2. Kromoszóma vizsgálatok*

A kromoszóma vizsgálatok elvégzéséhez a sejtszuspenzióra 20 µl KaryoMAX™ kolcemicid oldatot (10 µg/mL, Gibco, USA) helyeztem, majd kétórás inkubálás után a tenyészeteket 1,5 ml-es eppendorf csövekbe gyűjtöttem. A sejteket 7 percig 300 g intenzitással centrifugáltam, majd 0,56%-os KCl oldatba szuszpendáltam (hipotóniás kezelés), végül 10 perc szobahőmérsékleten történő inkubálás után három lépésben 3:1 metanol–ecetsav keverékével fixáltam. A sejtszuspenziót nedves tárgylemezre cseppentettem, szobahőmérsékleten szárítottam, majd 5%-os, foszfát pufferben oldott Giemsa festékkel 7 percig festettem (Alfi et al., 1973; Anand et al., 2018). A lemezeket desztillált vizes öblítés után szobahőmérsékleten szárítottam, majd mikroszkóp alatt (Zeiss Axioskop2 Plus) 1200x-os nagyítás mellett vizsgáltam.

A foszfát puffer összetétele:

A oldat: 12,5 g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, 500 ml-re feltöltve desztillált vízzel

B oldat: 4,76 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 ml-re feltöltve desztillált vízzel

Munkaoldat: 20 ml A, 20 ml B, 2ml Giemsa-oldat, pH=7.0

### *7.3. DNS szekvenálás a transzgén beépülésének igazolására*

A genomi DNS izolálása a Roche High Pure PCR Template Preparation Kit segítségével történt a sejtcellulekből, majd a szekvenálás Illumina NovaSeq műszerrel, párosított végű, 150 nt olvasási hosszúságú szekvenálással.

A vizsgálatban a transzgénikus vonalak mellett (FCM5, FCF5) két nem transzgénikus PGC vonalból (1111, 1116) származó minta is részt vett, amit az összehasonlításnál használtunk referenciaként. A szekvenálásban és az adatok kiértékelésében Dr. Barta Endre és Fekete Zsófia segítettek (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Mezőgazdasági Genomikai és Bioinformatikai Csoport).

A szekvenálás minőségét a FastQC program segítségével ellenőriztük az illesztés előtt (Andrews, 2010). A kapott readeket ezután a teljes genomhoz igazítottuk (bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b, Ensembl 110. kiadás) (Martin et al., 2023), kiegészítve a FUCCI vektor fasta szekvenciájával. A PB\_CAG\_FUCCI szekvenciát a legjobb minőségű genomi szekvenciához adtuk hozzá extra kontigként. A komplementált genomot ezután indexáltuk, és a

readek-et a DNS-szekvenciák nagy referencia genomhoz való illesztésére szolgáló bwa-mem2 szoftvercsomag segítségével illesztettük össze (Vasimuddin et al., 2019). Az illesztési paramétereket alapértelmezettre állítottuk.

Elsőként azokat az readeket választottuk ki, amik legalább részben megfeleltek a FUCCI szekvenciának, és ezen readek ID-je alapján szűrtük a teljes illesztett read-sorozatot aSAMtools 1.16 verzió használatával (Danecek et al., 2021). Azon readek segítségével, melyek illeszkedtek a FUCCI szekvenciához, illetve illeszthetőek voltak a FUCCI szekvenciához és a genomi szekvenciához, sikerült beazonosítani a transzgén integráció pontos helyét. Azokban az esetekben ítéltünk meg valamit valós beépülésnek, ha több read is fedte egymást az integrációs szakaszon. Ezekben az esetekben a lefedettség adatokat és a leolvasások igazítási pozícióit szűrtük ki az "aligner" fájljából a pontos koordináták meghatározásához. Az érintett géneket az integrációs koordináták és a vonatkozó annotációs fájl (Ensembl 110. kiadás) keresztezésével határoztuk meg. Az integrációs helyek és a releváns olvasatok pozícióját vizuálisan is ellenőriztük az IGV (Integrative Genomics Viewer) program segítségével (Robinson et al., 2011) (M4. Melléklet).

#### *7.4. Mikotoxinkezelés alkalmazása a sejtciklus befolyásolására*

A kísérletben a T-2 trichotecén és a zearalenon mikoösztrógen toxinokat használtam, mivel ezek jelentős gazdasági károkat okoznak. A T-2 képes megváltoztatni a limfoid DNS szintézist (Rosenstein and Lafarge-Frayssinet, 1983), ezzel befolyásolja a fehérjetermelést, míg a zearalenon az állatok reprodukciójában idéz elő zavarokat (Yazar and Omurtag, 2008). Mivel mindkettő hatással van a termelésre a baromfiiparban, valamint az emberi szervezetre is károsak, ezért számomra kutatásuk nagy jelentőséggel bír.

A kísérletben 5ng/ml T-2 és 20ng/ml zearalenon koncentrációt, valamint ezek kombinált hatását vizsgáltam. Maga a dolgozat mikotoxinkezeléssel kapcsolatos része egyszerre volt egy előkísérlet a FUCCI sejtvonalak későbbi felhasználásához, valamint ezzel szeretnénk volna szemléltetni a sejteket ért negatív hatások függvényében fellépő sejtciklus-változásokat, és azok detektálhatóságát a transzgén jelenlétében. A mikotoxinokat Dr. Szőke Zsuzsanna (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Szaporodásbiológiai és Toxikológiai Csoport) szolgáltatta a kísérlethez.

A mikotoxinokat PGC tenyésztőmédiumban oldottam fel és több lépcsőben hígítottam őket a megfelelő koncentrációra. Minden hígítási lépésnél alapos szuszpendálással oldottam be az anyagot, ügyelve, hogy ne kerüljön ki a mérgező anyag a cső falára vagy a műanyag pipettahegyre. A kísérlet folyamán végig betartottam a mikotoxinoknál kötelező munkavédelmi és veszélyes hulladék kezelési szabályokat. Az FCF5 és FCM5 vonalaktól származó sejteket 12

lyukú plate-re helyeztem 20.000 sejt/lyuk sejtszámmal, majd három napon keresztül mikotoxin tartalmú médiummal kezeltem a PGC-eket, médiumcsere nélkül. A kísérlet előtt és után konfokális mikroszkóp alatt vizsgáltam a sejtek fluoreszcenciáját. Mintánként 5 képet készítettem 10x-es nagyítású objektívvel, amiket a KALSZÁM program (Kalcsevszki Ákos által, konfokális mikroszkópos felvételek analizésére kifejlesztett Java alapú program) segítségével elemeztem, hogy megállapítsam a fluoreszcencia arányát a tenyészetekben.

#### *7.5. Timelapse videók készítése a transzgén működésének igazolására*

A timelapse videók elkészítéséhez az FCF5 és FCM5 sejteket 96 lyukú plate-re helyeztem ki, 9000 sejt/lyuk koncentrációval, majd ezeket a sejteket fűtött szállítódobozban szállítottam. A mérést egy ImageXpress Pico Cell Imaging System (Molecular Devices, USA) automata mikroszkóp segítségével végeztem el, melynek használatát Dr. Uher Ferenc és Dr. Matula Zsolt (Dél-Pesti Centrumkórház, Országos Hematológiai és Infektológiai Intézet), valamint Dr. Hegyi Zoltán (Bio-Science Kft.) biztosították. A mérés 29 órán át tartott, 10 percenként fotózva a tenyészeteket. A kapott adatokat ezután a Fiji képszerkesztő és analizáló programmal (Schindelin et al., 2012) értékeltem ki, valamint timelapse videókat állítottam össze (M5. Melléklet).

### **8. Statisztikai analízis**

A qPCR eredmények esetén minden mintára elvégeztük a target gén expresszió - belső kontroll génextpresszió arány kiszámítását. Ehhez a GenEx 7.0 (Multid Analyses AB, Svédország) szoftvert használtuk a  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  formulával, ahol a  $\Delta Ct = Ct_{target} - Ct_{belső\ kontroll}$ , és a  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct_{tesztmintá} - \Delta Ct_{kontrollmintá}$ . A csoportok közötti statisztikai analízishez t-próbát használtunk, szintén a GenEx 7.0 program segítségével. A prezentált adatokat átlagolt  $\pm$  szórással láttuk el, valamint egy eredményt 0,05-ös p-érték alatt tekintettük szignifikánsnak. A szignifikancia szintjeink a következők voltak:  $p < 0,05$  \*,  $p < 0,01$  \*\*,  $p < 0,001$  \*\*\*.

### III. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

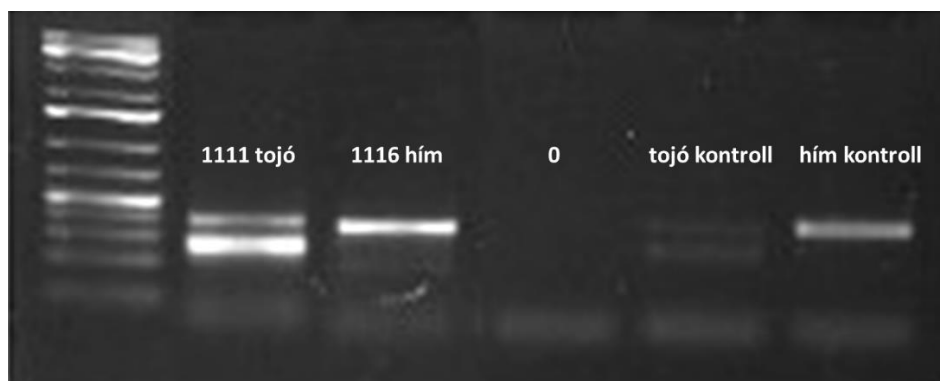
#### 1. Az alapított ősvarsejt-vonalak jellemzése

##### 1.1. Alapítási statisztika

A kísérletben részt vevő sejtvonalak 2019-ben lettek alapítva és mélyhűtve Lázár Bence kollégám által, és intézetünk génbanki állományát alkották. Összesen 42 vérvétel történt a fehér magyar fajtában, amiből 20 sejtvonala alapítása lett sikeres, ez 47,6%-os hatékonyságnak felel meg. Ezekből az alapításokból összesen 120 mintát mélyhűtöttek, amelyek a  $-150^{\circ}\text{C}$  mélyhűtőben levő génbankunkban, valamint a NBGK HGI génbankjában vannak eltárolva (Lázár, 2020). Az alapításokat leszámítva a sejtvonalak jellemzése már az én munkám eredménye.

##### 1.2. Ivarmeghatározás

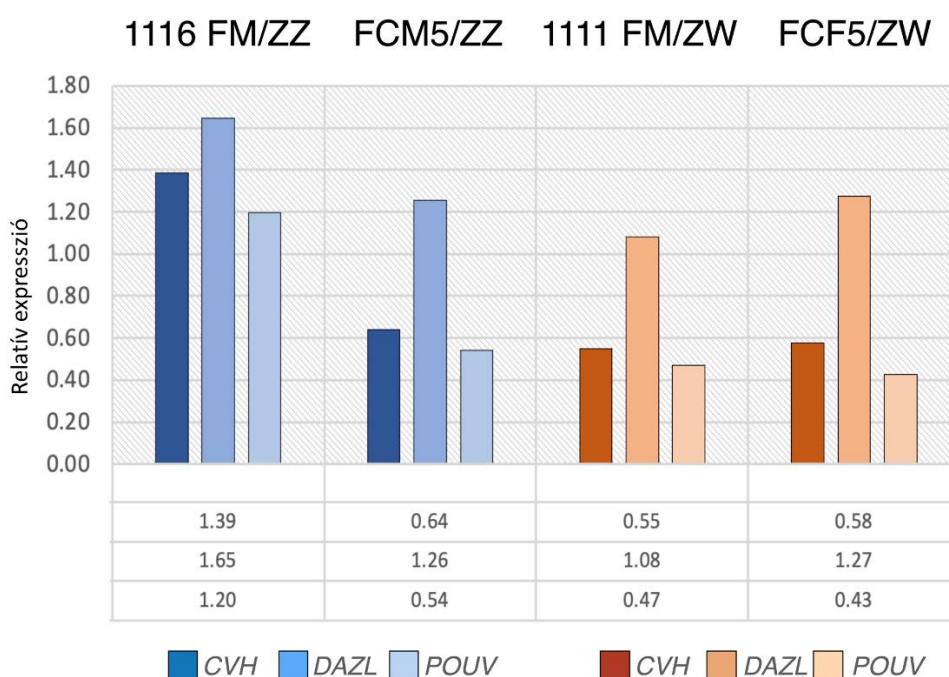
Az ivarmeghatározást a sejtvonala-alapítás során eltett szövetmintákból végeztem. A PCR segítségével történő ivarmeghatározás alapján elmondható, hogy a 20 alapított sejtvonalból 14 hímivarú, míg 6 minta nőivarú volt. Ez 70%-os hím és 30%-os tojó eredetű sejtvonala részarányának felel meg. Az első PCR során egyedül a 1121-es minta nem adott eredményt, azonban a megismételt vizsgálat után már ez is egyértelműen hímivarúnak bizonyult. A kísérletbe az 1111-es jelölésű tojó, és az 1116-os jelölésű hímivarú sejtvonala választottuk, mivel ezek rendelkeztek a legígéretesebb proliferációs képességgel (9. ábra).



**9. Ábra:** Az eredeti sejtvonala ivari determinációja. Az ivarmeghatározáshoz szövetmintákból izolált DNS-t használtunk. A CHD1 primerre alapozott PCR segítségével gélelektroforézis útján vizualizáltam az eredményeket. A gélfotó alapján az 1111 vonal kettős jelet adott, ami a női ivarú madarakra jellemző, míg az 1116 vonal egy jelet produkált, ami a hímivart jellemzi. A kontrollok az elvártak szerint működtek, bár a tojó kontroll halványabb jele az alacsonyabb DNS koncentrációt feltételezi.

### 1.3. RNS expressziós vizsgálat

Ahhoz, hogy bizonyítsam a sejtek ősvarsejt jellegét, valamint megfelelő működésüket igazoljam, elsődlegesen kvantitatív valósídejű PCR-t végeztem belőlük izolált RNS-ről írt cDNS-t. ROX festéket használtam, referenciagénnek pedig a GAPDH expressziót tekintettem. A két ivarsejt-specifikus marker a CVH és a DAZL voltak. Kontrollként egy 1116-os sejtvonalból származó párhuzamos mintát használtam. A qPCR alapján megállapítottam, hogy mindkét általam választott sejtvonal expresszálta az ivarsejt-specifikus markereket, így alkalmasak nemcsak a génbanki megőrzésre, hanem további kísérletekben való felhasználásra is (10. ábra).

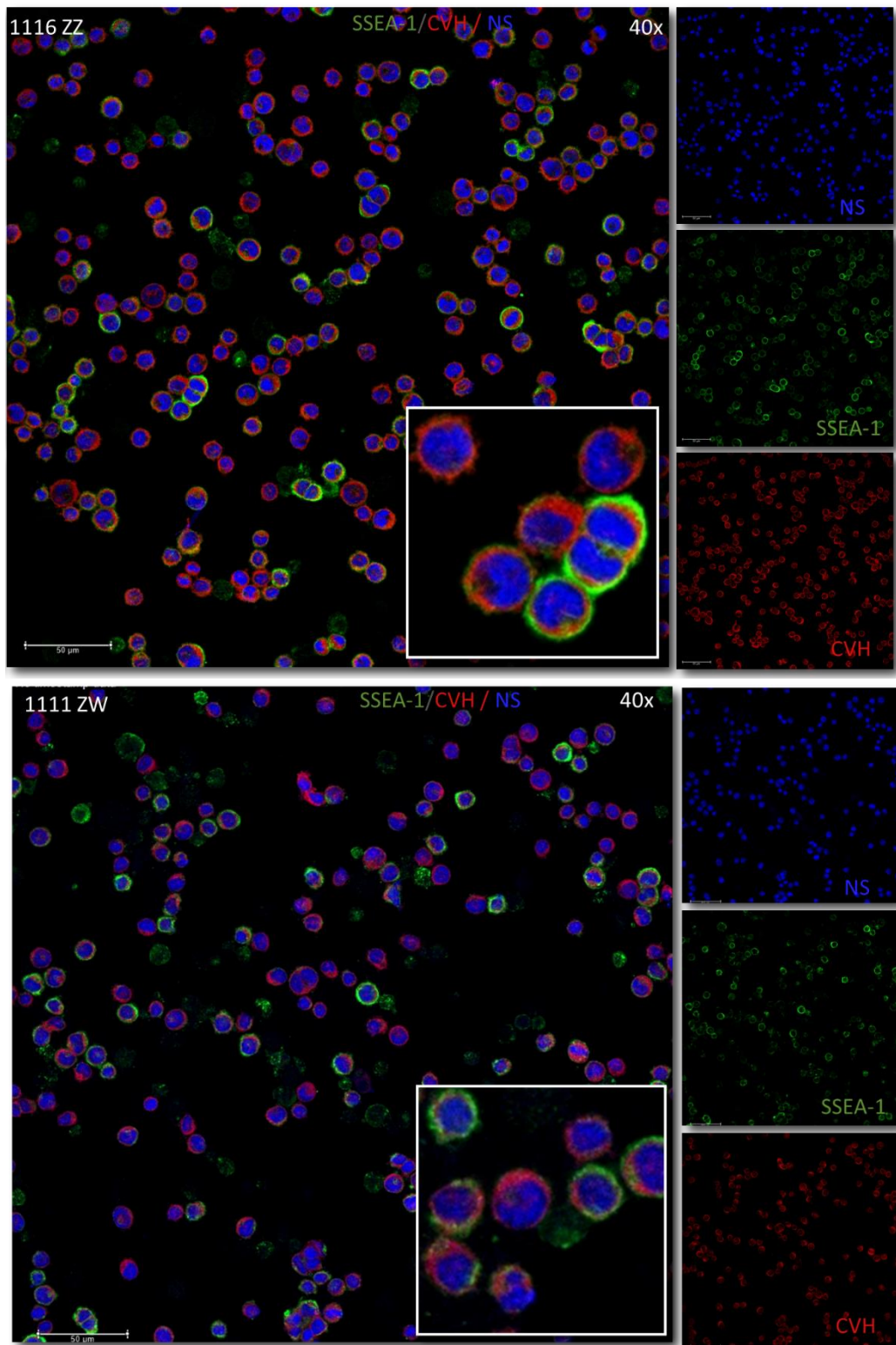


**10. Ábra: Eredeti és transzgenikus klón sejtvonalak RNS expressziós mintázatai.** Az ábra alapján megállapítható, hogy mindegyik sejtvonal expresszálta az ivarsejt-specifikus CVH és DAZL, valamint az őssejt-specifikus cPOUV markereket. Emellett jól megfigyelhető volt egy korábbi felfedezésünk is, miszerint az eredeti állapothoz képest (1116), a mélyhűtés után közvetlenül a hím sejtek (FCM5) expressziós szintjei lecsökkennek a női ivarú sejtek (1111, FCF5) expressziós szintjére (Ecker et al., 2023).

### 1.4. Immunhisztokémiai vizsgálat

A sejtvonalak jellemzésének utolsó lépéseként az eredeti sejtvonalakat immunhisztokémiai analízisnek vettem alá. A festésnél használt ellenanyagok az anti-SSEA-1 őssejtspecifikus, és az anti-CVH ivarsejt-specifikus markerek voltak. Emellett TO-PRO™-3 sejtmagfestéket is használtam a jobb vizualizálás érdekében. Mivel az SSEA-1 expressziója membrán-specifikus, a CVH expressziója pedig citoplazma-specifikus, így az egyes jelek jól elkülönültek a sejten belül. A konfokális mikroszkóppal készített fotók alapján mindkét sejtvonal expresszálta mindkét markert, így ismét sikerült alátámasztani, hogy megfelelő állapotú PG-sejtekkel tudtam megkezdeni a kísérletet. Az immunfestés lépését a transzgenézisen átesett sejtvonalakon már

nem ismételt meg, ugyanis a FUCCI zöld/piros fluoreszcenciája interferált volna a rendelkezésünkre álló másodlagos ellenanyagok szignáljával (11. ábra).



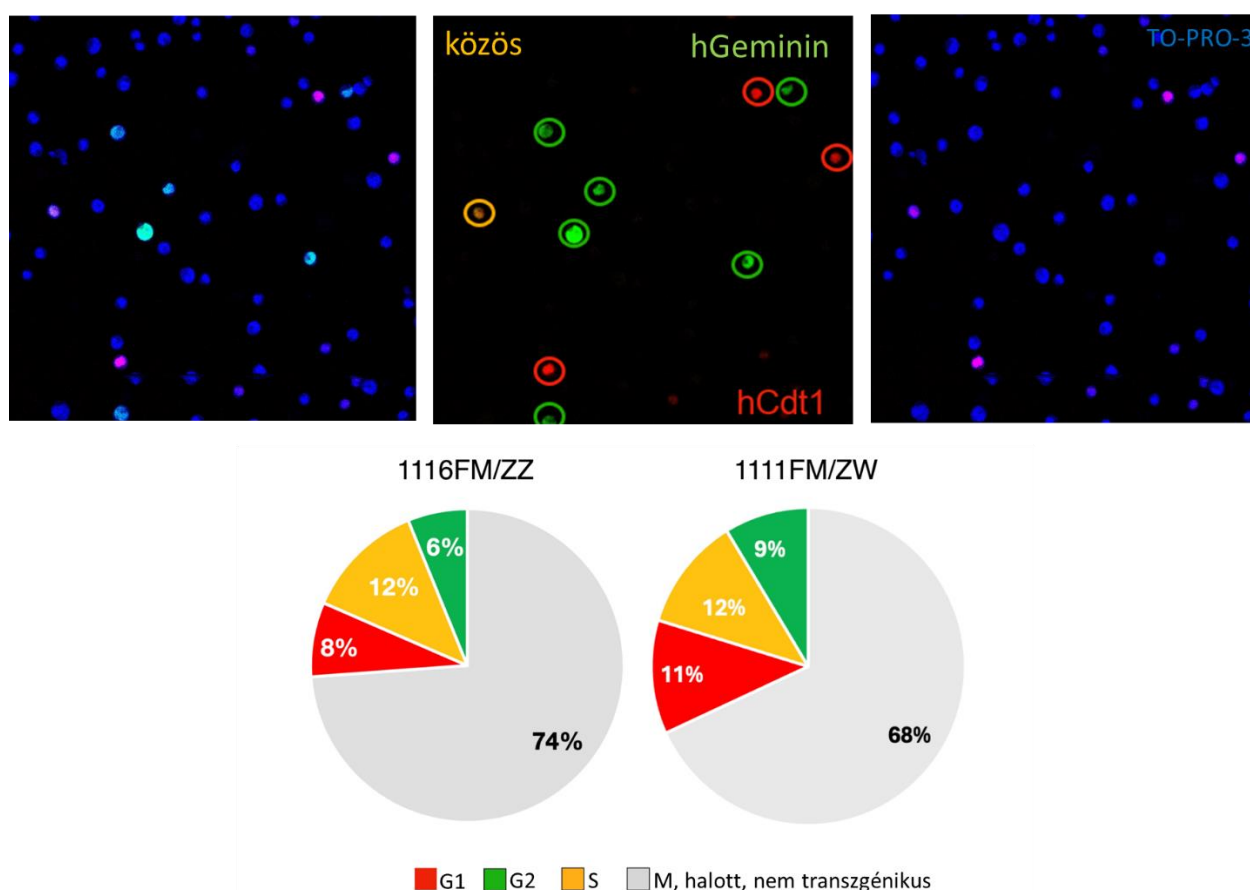
**11. Ábra: A sejtvonalak immunhisztokémiai festése.** Az immunfestés során őssejt-specifikus anti-SSEA-1 és ivarsejt-specifikus anti-CVH ellenanyagot, valamint sejtmagspecifikus TO-PRO™-3 festéket használtam. Az eredmények alapján mindkét sejtvonal megbízhatóan expresszálta a használt ellenanyagoknak megfelelő fehérjéket, így ezek a sejtek egyértelműen ősvarsejteknek tekinthetők.



## 2. A FUCCI sejtvonalak vizsgálatai

### 2.1. Transzgénexpressziós eredmények az elektroporálást követően

Az elektroporálást követő első napon már sikeresen detektálható volt a FUCCI transzgén fluoreszcenciájának jelenléte, mind a sztereómikroszkóp alatt, mind az Arthur fluoreszcens sejtszámláló gép segítségével (12. ábra). Az adatok alátámasztották a transzgénikus sejtek jelenlétét a tenyészetekben. Az Arthur sejtszámlológép mérései alapján a hím sejtvonala esetén a fluoreszcens sejtek aránya összesen 26% volt, míg ez a női ivarú sejtvonalnál 32%-ot tett ki. Mivel azonban a FUCCI sejtek az M fázisban nem mutatnak fluoreszcenciát, így a valóságban ezeknél magasabb transzgénikus aránnyal rendelkezünk.

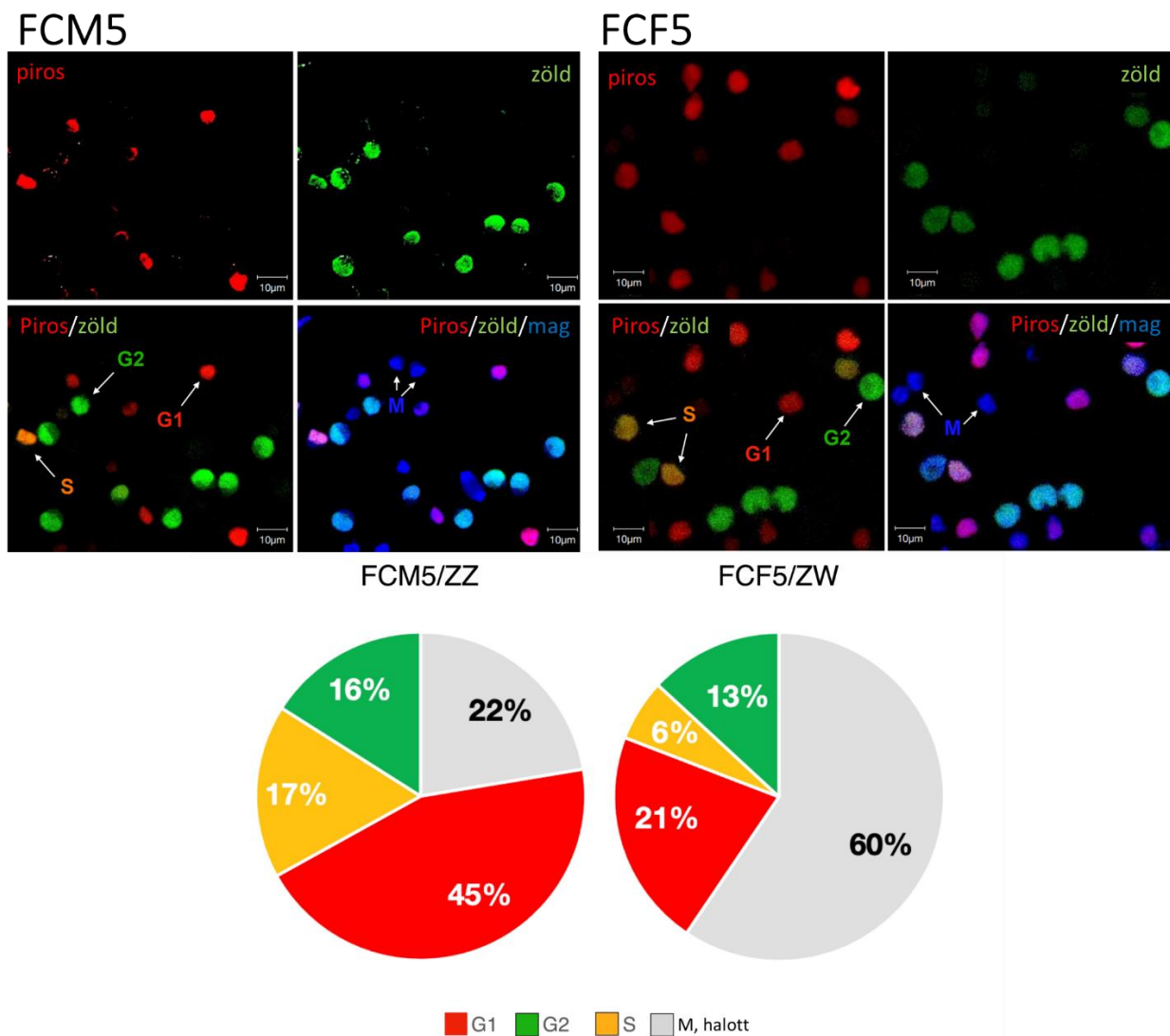


**12. ábra: FUCCI expresszió az elektroporálást követően.** A konfokális mikroszkóppal készült képeken a To-PRO-3 sejtmagfestéssel együtt is jól látszik a hGeminin expresszióját jelző zöld, és a hCDT1 expresszióját jelző piros fluoreszcencia. Ez jól mutatja, hogy egy időpontban többféle sejtosztódási fázisban levő sejtek egyszerre voltak jelen a tenyészetekben. Ezt az Arthur sejtszámlolóval mért eredmények is alátámasztják.

### 2.2. Transzgénexpressziós eredmények a klónozást követően

A tenyészetek minőségének folyamatos monitorozásával sikerült meghatározni azt a pontot, amikor a vonalak megfelelőek voltak az egy sejt alapú tenyészetek alapítására. Ezt az időpontot

az Arthur fluoreszcens sejtszámológéppel készült felvételek, valamint a konfokális mikroszkóppal készített fotók alapján sikerült meghatározni a tenyészetben jelen levő fluoreszcencia megoszlása alapján (13. ábra). Az adatok alapján egyértelmű volt, hogy a klón tenyészetekben jelentősen magasabb arányban képviselték magukat a fluoreszcens sejtek, mint a kiindulási transzgenikus vonalakban. Ez az emelkedés a hímivar esetén 52%, míg a nőivarban 8% volt. A nőivarban tapasztalt kisebb emelkedés feltehetően részben a vonalnál megfigyelt alacsonyabb proliferációs rátának, részben a női ivarú PGC tenyészetekre általánosságban jellemző aggregációképzésnek tudható be.

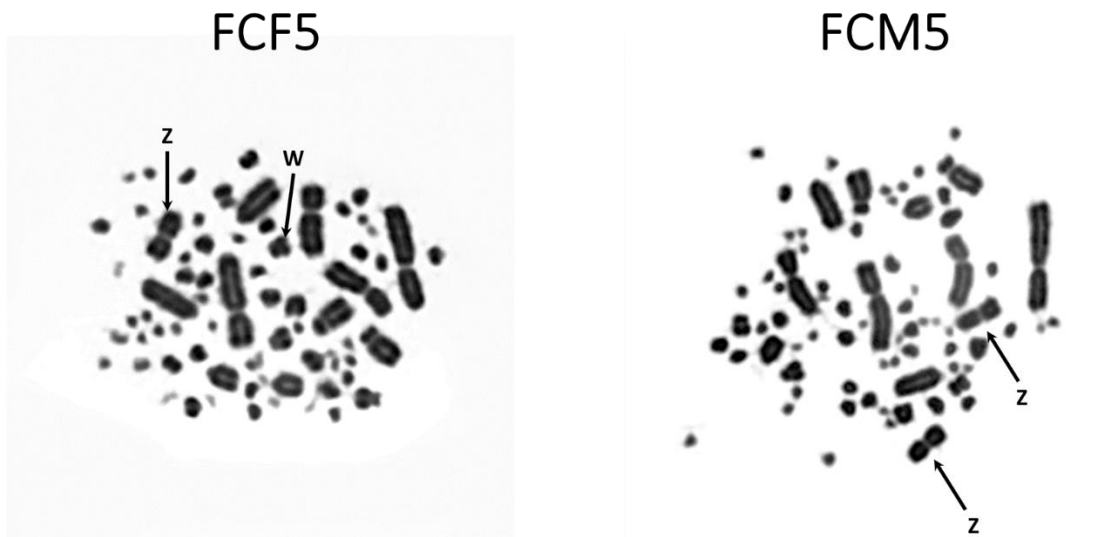


**13. ábra: Fucci expresszió az egysejt tenyészetekben.** A klón sejtvonalak jelentősen magasabb fluoreszcens sejtaránnyal rendelkeztek, mint az eredeti transzgenikus vonalak. Ezt mind a konfokális felvételek, mind az Arthur sejtszámológéppel végzett mérések alátámasztották. A nőivarban megfigyelhető kisebb emelkedés feltehetően a sejtvonal lassabb osztódásának, valamint a nőivarú sejtvonalak aggregátumképzési hajlamának nemkívánatos hatásai miatt történt.

### 2.3. A klón sejtvonalak karakterizálási eredményei

Az egyetlen sejt kiindulási alapból tenyésztett FCF5 és FCM5 sejtvonalakat a fentiek szerint, valamint annak kiegészítésével jellemeztem. Az eredmények alapján mindkét sejtvonal a hosszútávú *in vitro* tenyésztés ellenére is megőrizte a jellegzetes ivari- és őssejt génexpressziós tulajdonságait. Mindkét vonal esetén a vártnak megfelelő ivar eredményt kaptam (FCF5 valóban tojó eredetű, FCM5 valóban hím eredetű, nem történt technikai hiba a hosszú tenyésztési idő során), valamint a transzgenézis ellenére is stabilan expresszálták a CVH és DAZL markereket. A génexpressziós eredmények azt mutatták, hogy az elektroporálás nem gyakorolt semmilyen szignifikáns hatást ezen két gén működésére (10. ábra). Az immunhisztokémiai vizsgálatok megismétlésére a fluoreszcens interferencia miatt nem volt lehetőség.

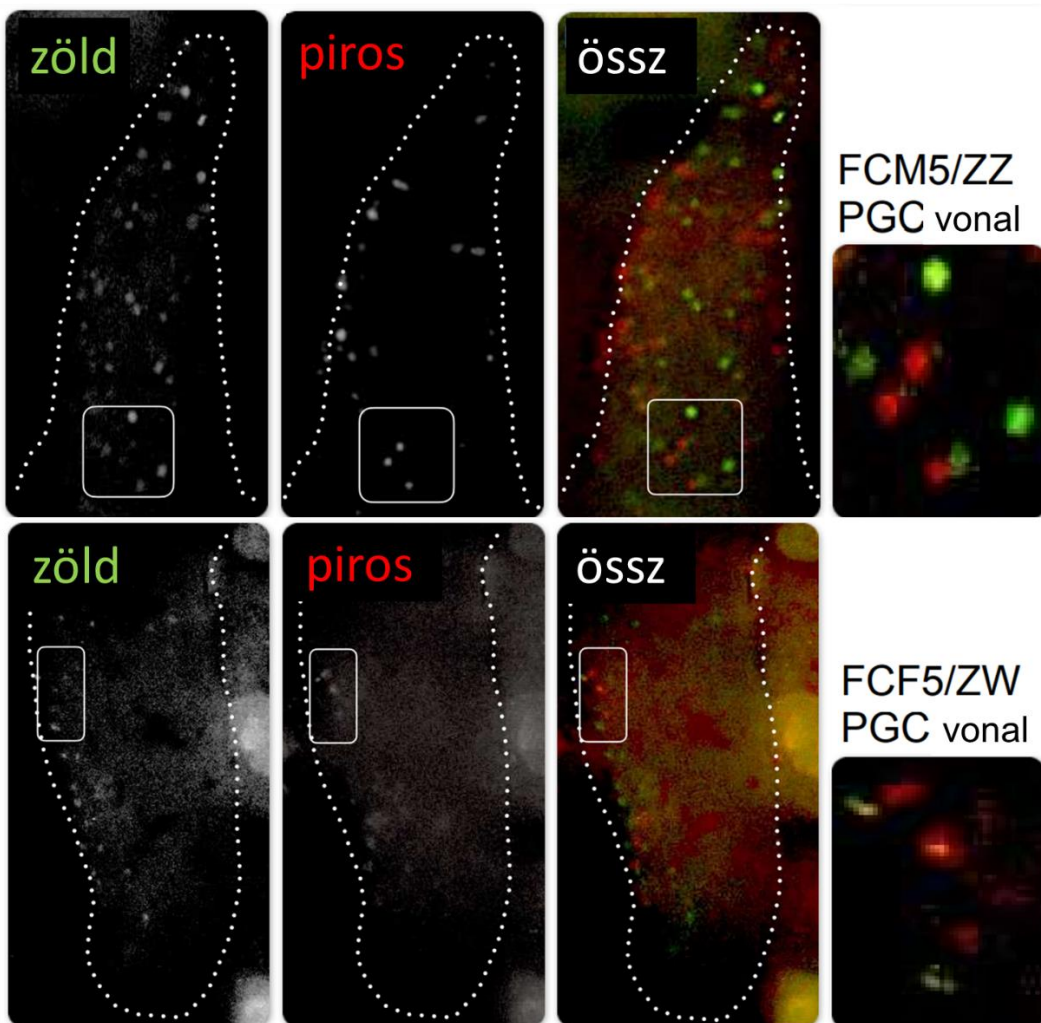
A hosszú *in vitro* sejttenyésztés egyik veszélye, hogy a sejtosztódási folyamat valahol hibát szenved, és ez esetlegesen a kromoszóma szám megváltozását okozza. Ezért, az eredményeket kiegészítendő, a sejttenyészetekből kromoszóma vizsgálatot végeztünk. Ebben Dr. Várkonyi Eszter és Molnár Mariann (NBGK HGI) segített nekünk. Az eredmények alapján megállapítható volt, hogy egyik klón sejtvonal esetében sem található kromoszóma szám eltérés. A vizsgálatok szerint mindkét sejttenyészet 8 pár makrokromoszómát és 30 pár mikrokromoszómát tartalmazott, míg az FCF5 a ZW ivari kromoszómapárt, az FCM5 pedig a ZZ ivari kromoszómapárt hordozta. Tehát a sejtvonalak diploid kromoszóma száma  $2n = 78$  (14. ábra).



**14. ábra: A klón sejtvonalak metafázisos kromoszómakészlete.** A hosszútávú sejttenyésztés egyik veszélye, hogy megváltozhat a sejtekben a kromoszómaszám. Ezt ellenőrizendő citogenetikai vizsgálatot végeztünk a klón sejttenyészeteken. Az eredmények alapján megállapítható, hogy mindkét sejtvonal rendelkezett a megfelelő számú (78) kromoszómával, valamint a megfelelő változatú (ZW női ivarban, ZZ hímivarban) ivari kromoszómával.

#### 2.4. Sejtintegráció hatékonysága recipiens embriókba

A FUCCI transzgén tartalmazó PGC sejteket recipiens embriókba injektáltam, hogy vizsgáljam a sejtek beépülési képességét. Az injektálás után a kezelt embriókból 6,5 napos korban izoláltam a gonádokat és sztereómikroszkóp alatt vizsgáltam a beépülést a fluoreszcencia jelenléte alapján. Hímivar esetén összesen 10 injektálás történt, amiből 5 embrió élte meg a 6,5 napos kort. Ezek közül 3-ban találtam az ivarszervben fluoreszcens sejteket beépülve. Nőivarnál több kísérletet végeztem; 31 injektálásból 20 embrióból tudtam gonádot izolálni, amelyekből 3 tartalmazott fluoreszcens sejteket. Itt azonban fontos megjegyezni, hogy több esetben észleltem fluoreszcens sejteket a gonádon kívüli erekben, tehát az injektálás sikeres volt, csak a beépülés nem történt meg. Ez könnyen lehet, hogy a viszonylag korai gonádiszolálásnak tudható be, így még nem minden sejt vándorolt el az ivarszervekbe. Bár próbálkozás történt a kiméra ivarszervek fixálására, a későbbi metszés és konfokális elemzés érdekében, ez azonban nem járt sikerrel, feltehetően a FUCCI által használt sejtciklus-specifikus fehérjék gyors lebomlása miatt (15. ábra).



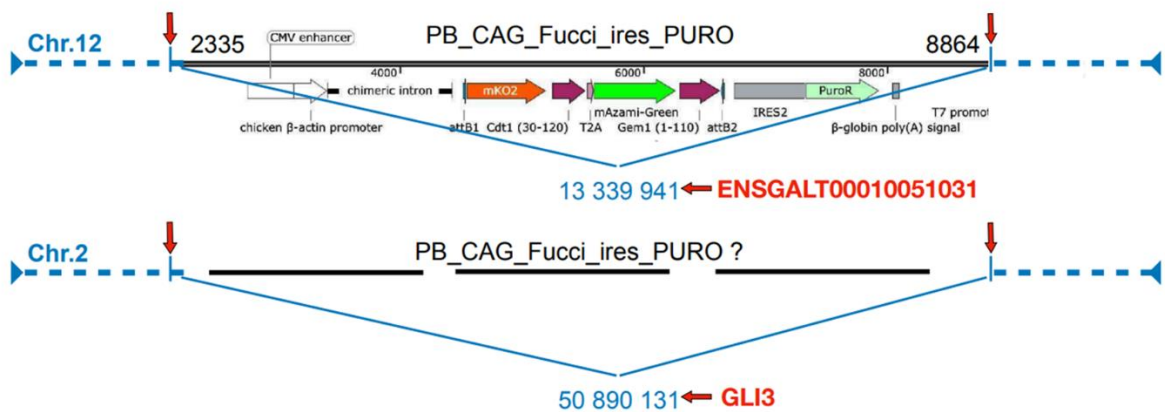
15. ábra: Transzgenikus sejtek integrálódása recipiens embriókba. A klón vonalaktól származó sejtuszupenziót recipiens embriókba injektálva ivarszervi kiméra egyedeket állítottam elő. Ezek ivarszerveikben hordozták a piros és zöld fluoreszcenciával rendelkező FUCCI pozitív sejteket, ami bizonyította a sejtvonalak beépülési képességét.

## 2.5. Szekvenálási eredmények

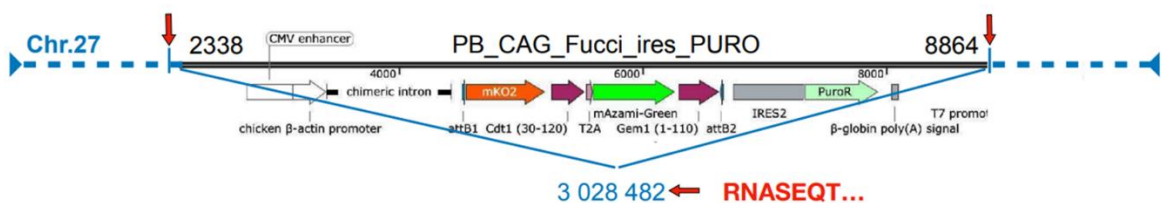
A transzgén beépülésének igazolása érdekében két általam létrehozott egy sejt eredetű sejtvonalon szekvenálást végeztünk, hogy megállapíthassuk a konstrukció integrációjának számát, illetve az integrációk elhelyezkedését a genomban. Az FCM5 sejtvonalon két lókuszon is sikerült kimutatni szekvenciaegyezést, ezek a NC052533.1: 50 890 131 (chr2) és a NC\_052543.1: 13 339 941 (chr12) koordinátákkal rendelkeznek, melyek a GLI3 és a CADPS kódoló régiói. Mindkét inszerció esetén intronba történt a beépülés. Az FCF5 sejtvonalon egy beépülésről számolhatok be, mely a NC052558.1:3028482 (chr27) koordinátánál található, amely egy intergénikus régió, a legközelebb eső gének a (Ensembl ID, no name) LOC121107680 és a NGFR (anotációs verzió: Ensembl release 110). A két sejtvonalon mindhárom integrációjára igaz, hogy egy TTA A szekvencia után helyezkednek el.

Az FCM5 esetén a 12-es kromoszómán történt beépülésnél, valamint az FCF5-ben történt integrációnál a teljes FUCCI transzgén beépült (vektor koordináták: PB\_CAG\_FUCCI:2338-8864). A harmadik integráció esetén is nagy valószínűséggel ez a helyzet áll fenn, azonban ezt nem tudtam tökéletesen alátámasztani, köszönhetően a régióban levő néhány egymást fedő readnek. Ez esetben a mellérendelt readek a PB\_CAG\_FUCCI:2335-8864 vektor koordinátáin belül helyezkednek el (16. ábra).

### FCM5 PGC vonal



### FCF5 PGC vonal



**16. ábra: Transzgén integráció helye a különböző ivarú klón PGC vonalak genomjába.** Az FCM5 hímivarú vonal genomjába két kópiában történt beépülés, a 2. és a 12. kromoszómákon, mindkét esetben intron régióba (a chr2 esetén az ENSGALT00010051031-be, a chr12 esetén a GLI3-ba). Ezzel szemben az FCF5 nőivarú vonal genomjába egy beépülés történt, egy exon szakaszra. Ez magyarázatot adhat a hím vonal erősebb fluoreszcenciájára is.

Emellett állandó fals pozitív jelet észleltem minden minta esetén (transzgénikus és nem transzgénikus) a NC\_052545.1:4183720-4185523 (chr14) helyen. Ez az ACTB gén kódoló régiója, és minden esetben hasonló számú mellérendelt readet találtam. Ez azonban szerintem azzal magyarázható, hogy a fehér magyar tyúk genomjában is megtalálható az általunk használt házityúk béta aktin promóter, és ennek a jelét kaptam vissza a mérés során.

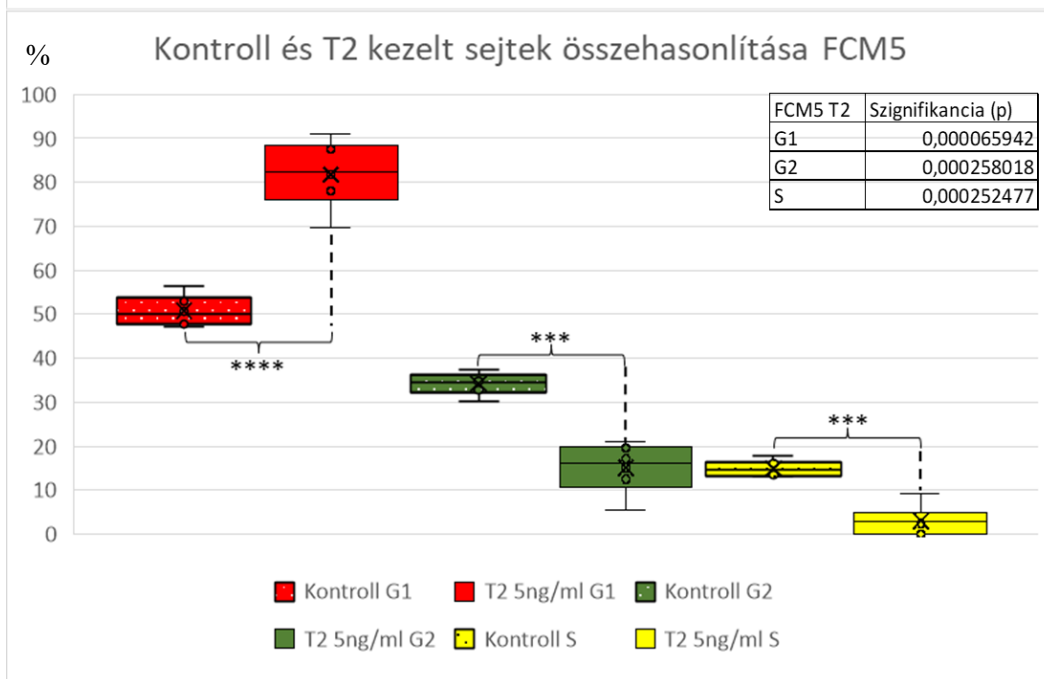
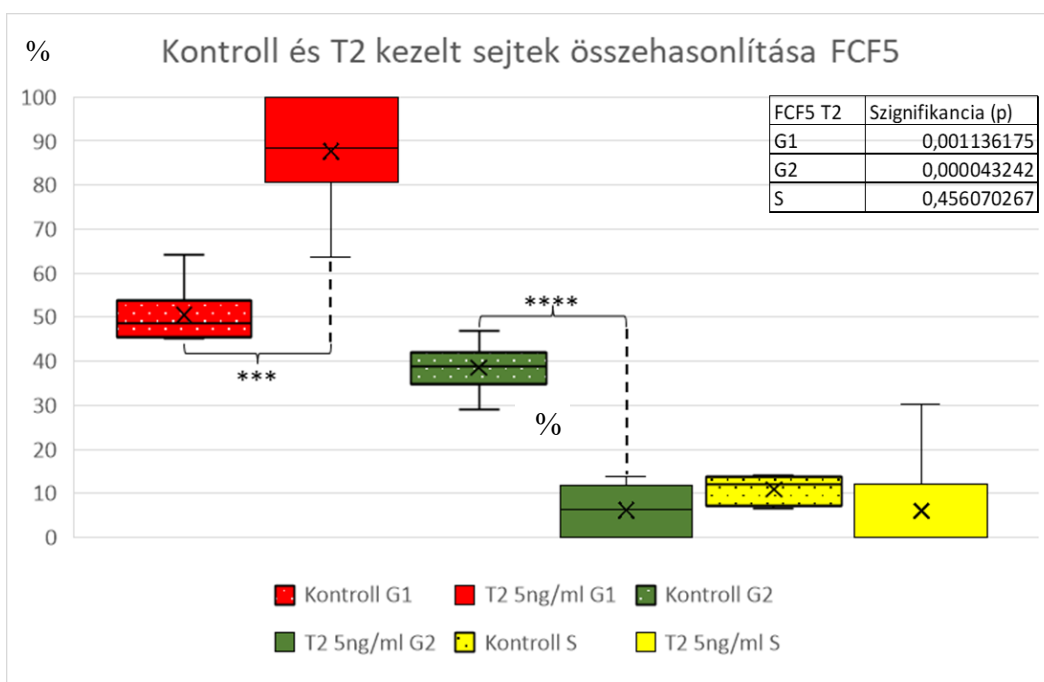
#### *2.6. A sejtek reakciója mikotoxin hatására és a médiumcsere hiányára*

A külső tényezőknek a sejtciklus változásaira gyakorolt hatásainak vizsgálatára a sejteket T-2 és zearalenon toxint tartalmazó médiumokkal kezeltem három napon keresztül. A tenyészetekről konfokális mikroszkóppal képeket készítettem a kezelés előtt és után, és ezeket összehasonlítva vizsgáltam a különböző színű fluoreszcenciák arányának eltolódását a mikotoxinok jelenlétének hatására.

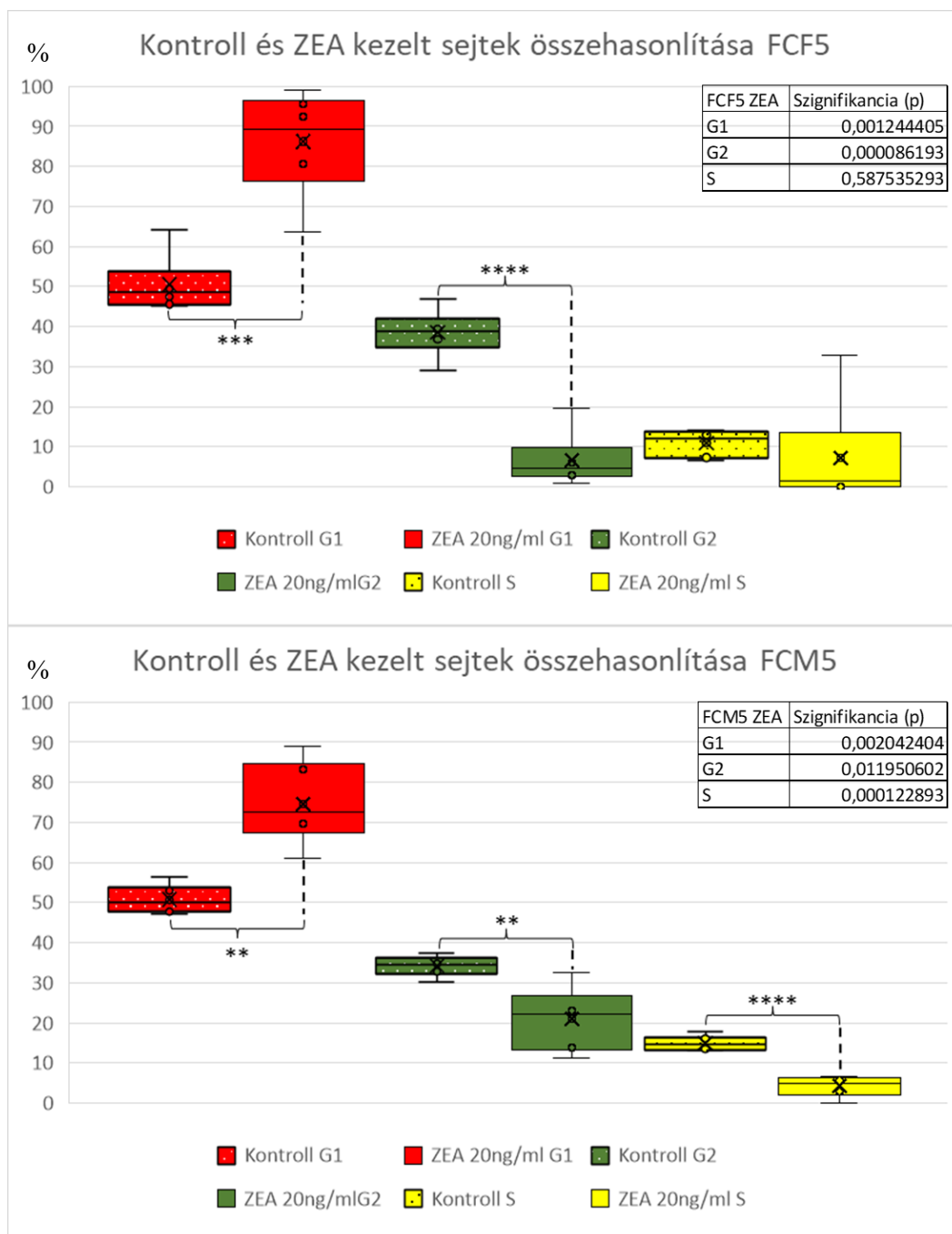
A kapott adatok alapján úgy tűnt, hogy a T-2 toxin három nap alatt szignifikánsan megnövelte a piros, G<sub>1</sub> fázisban levő sejtek arányát mindkét tenyészetben, míg a zöld G<sub>2</sub>-es sejtek aránya mindkét tenyészetben, a sárga S fázisban levő sejtek aránya pedig a hímivarú sejtvonalon szignifikánsan csökkent (*17. ábra*).

A második fázisban a tenyészeteket 20ng/ml koncentrációjú zearalenon toxinnal kezeltük, a mérés menete megegyezett a fentiekben leírtakkal. Az eredmények szintén nagyban hasonlítottak a T-2 kezelés után tapasztaltakhoz, a hímivar esetén mindhárom állapotban, a nőivar esetén a G<sub>1</sub> és G<sub>2</sub> fázisokban mutattak erős szignifikanciát az adatok (*18. ábra*).

Végül a két mikotoxin együttes hatására is kíváncsiak voltunk, hogy ellenőrizzük az esetleges erősítő/gyengítő kölcsönhatásokat közöttük. Ennek érdekében egyszerre alkalmaztunk 5ng/ml T-2 és 20ng/ml zearalenon tartalmú médiumot a sejteken. Az eredmény ismételen a már leírt sémát követte: a vörös sejtek arányának megnövekedése és a zöld sejtek arányának csökkenése mindkét sejtvonalon szignifikáns volt, míg a sárga sejtek arányának csökkenése a hímivarú sejtek esetén mutatott szignifikanciát (*19. ábra*).

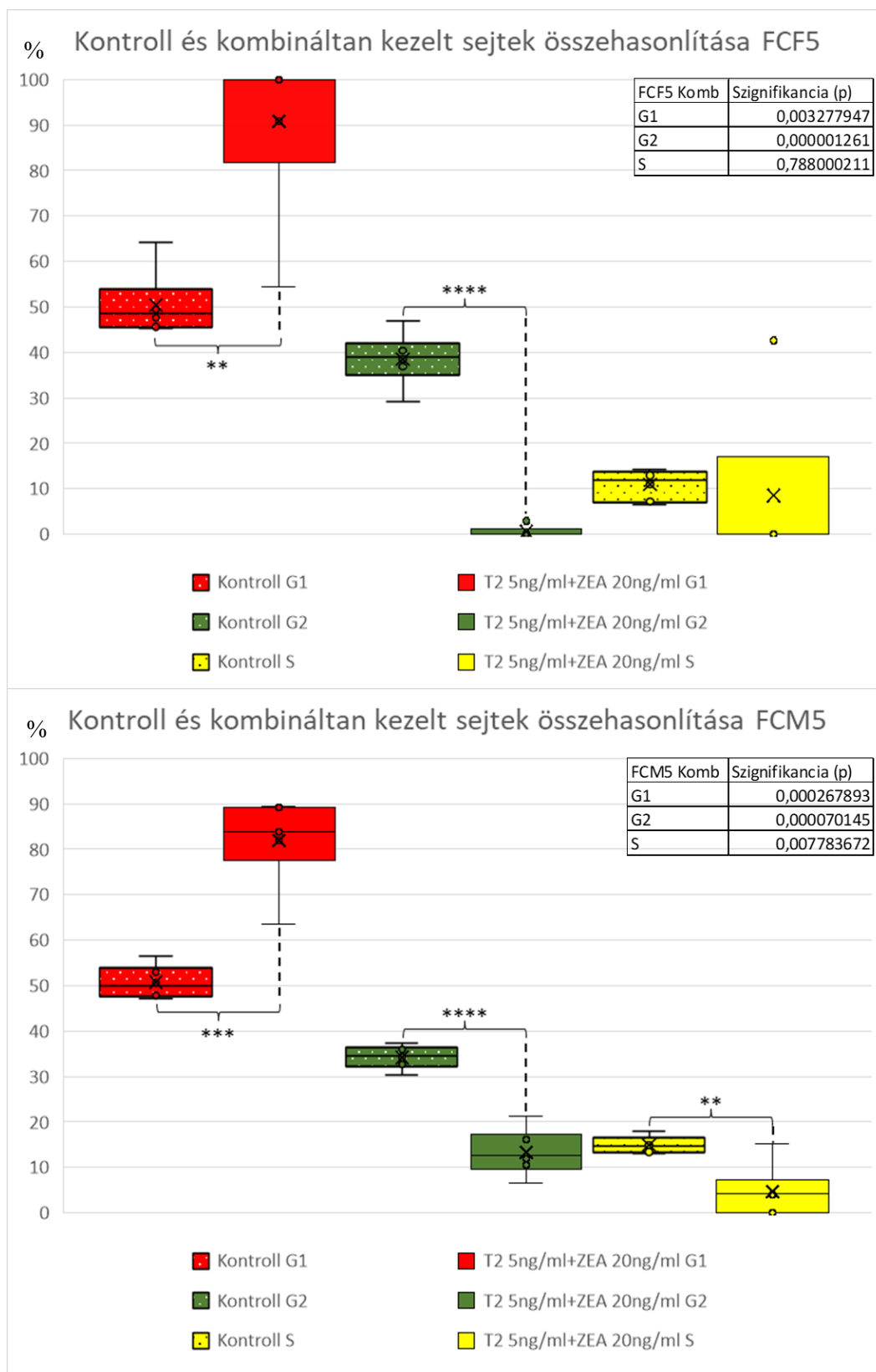


**17. ábra: A T-2 toxin hatása a sejtciklusra.** A mikotoxin jelenlétének hatására a tenyészetekben megnőtt a pirossal jelölt G1 sejt-fázisú sejtek aránya, míg a zölddel jelölt G2-es és a sárgával jelölt S fázisú sejtek aránya lecsökkent. Ezek a változások az FCF5 vonal S fázisú sejtjeit kivéve mindenhol erős szignifikanciát mutattak.



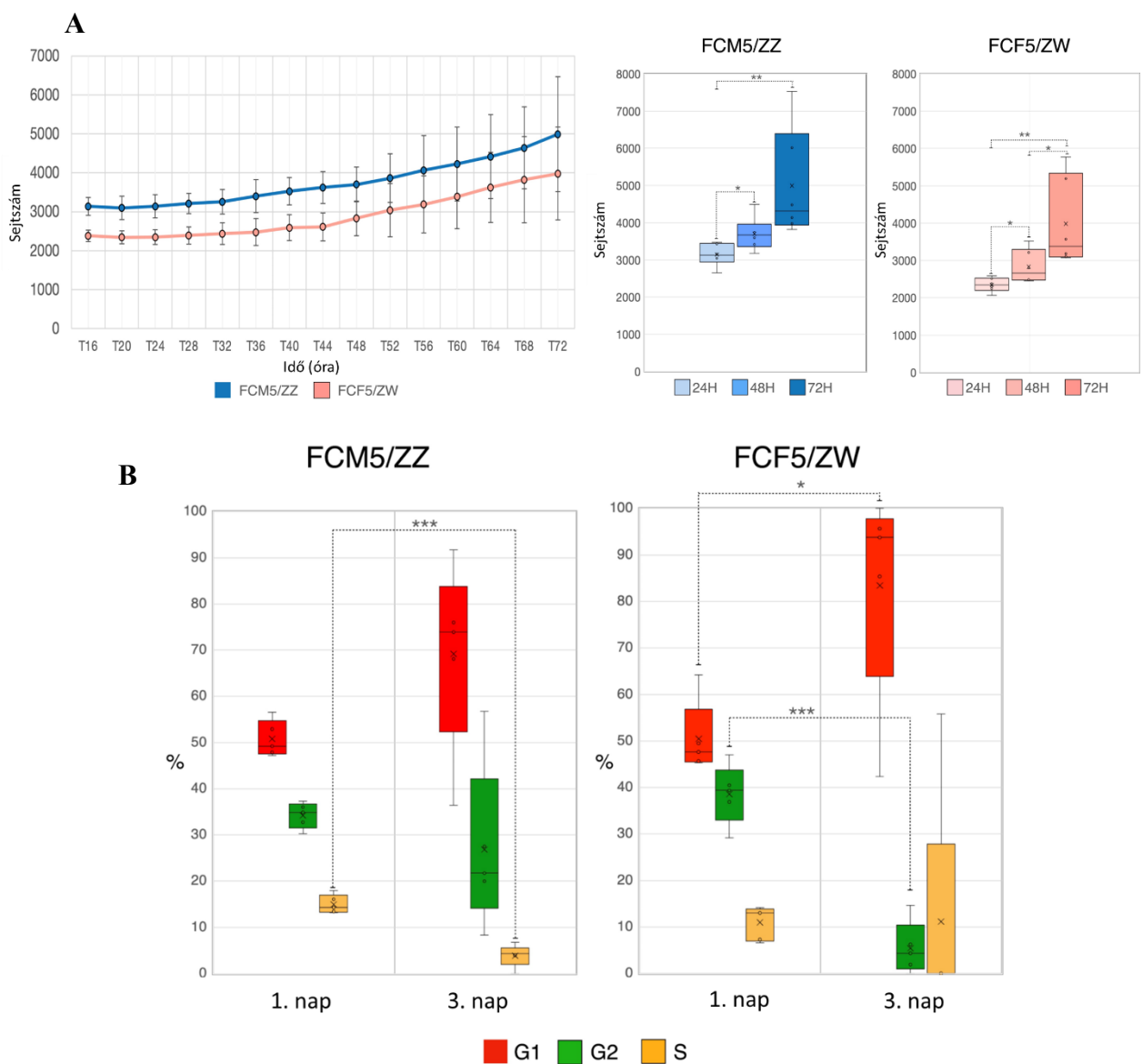
**18. ábra: A zearalenon toxin hatása a sejtciklusra.** A mikotoxin jelenlétének hatására a tenyészetekben szignifikánsan megnőtt a pirossal jelölt G1 sejt-fázisú sejtek aránya, míg a zölddel jelölt G2-es és a sárgával jelölt S fázisú sejtek aránya szignifikánsan csökkent, kivéve az S fázisú FCF5 sejtek esetén.





**19. ábra: Mikotoxinok kombinált hatása a sejtciklusra.** A mikotoxinok jelenlétének hatására a tenyészetekben ismételten szignifikánsan megnőtt a pirossal jelölt G1 sejt-fázisú sejtek aránya, míg a zölddel jelölt G2-es és a sárgával jelölt S fázisú sejtek aránya szignifikánsan csökkent. Ez alól ismét csak egyedül az FCF5 vonal S fázisú sejtjei alkottak kivételt.

Azonban, mivel a mikotoxinkezelés során nem történt médiumcsere a sejteken, így lehetőségem nyílt annak a vizsgálatára is, hogy egy háromnapos friss médium nélküli időszak hogyan hat a sejtek proliferációjára. Ennek érdekében megismételtem a kísérletet mikotoxinkezelés nélkül is. Az így kapott eredmények kifejezetten hasonlóak voltak a mikotoxinkezelés után kapottakhoz. Bár a sejtszám a 24. és a 72. óra között szignifikánsan megnőtt mindkét sejtvonalonban, a vörös sejtek aránya mindkét esetben megugrott, míg a zöld és sárga sejtek aránya lecsökkent. A piros sejtarány-növekedés és a zöld sejtarány-csökkenés a nőivarú sejtvonalonban, a sárga sejtarány-csökkenés pedig a hímivarú sejtvonalonban volt szignifikáns, azonban maguk a tendenciák mindkét sejtvonalonban megfigyelhetőek voltak (20. ábra).

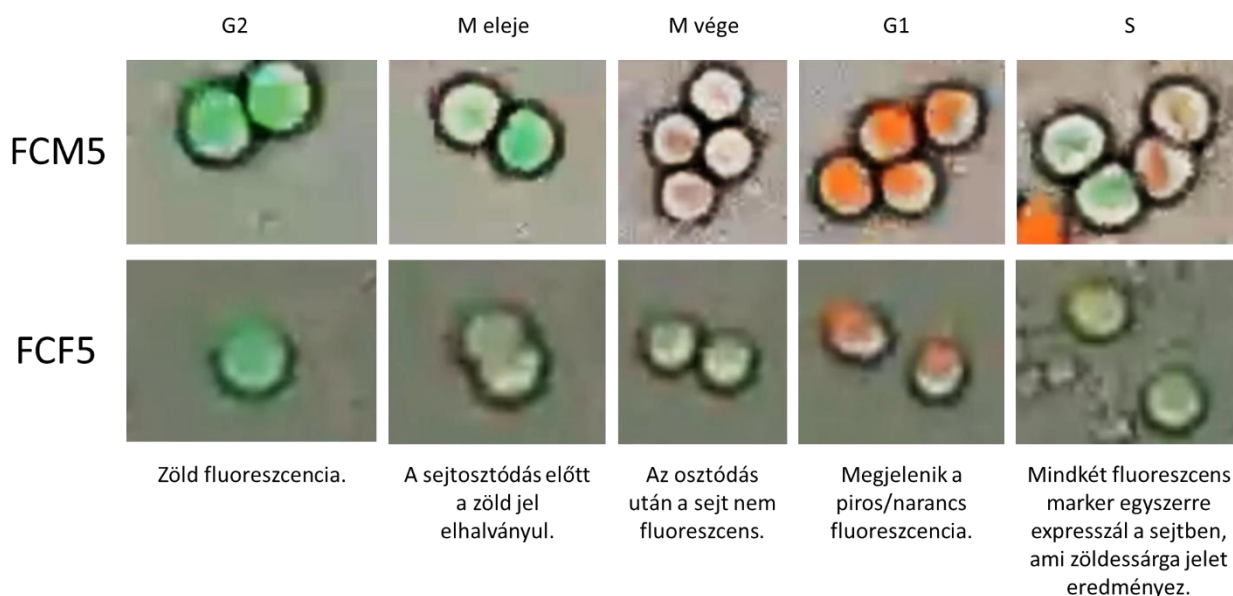


20. ábra: A médiumcsere hiányának hatása a sejtciklusra. Bár a sejtszám a 24. és a 72. óra között folyamatosan növekedett mindkét sejtvonalonban (A), az említett időszakban a  $G_1$  fázisban levő sejtek aránya megugrott, míg az S és  $G_2$  fázisban levő sejtek aránya lecsökkent (B). Utóbbi hímek esetén az S fázisú sejteknél, női ivarban a  $G_1$  és  $G_2$  fázisú sejteknél mutatott szignifikanciát.

Ezek alapján az a következtetés vonható le, hogy bár a mikotoxinhatás mérésekor az eredményt befolyásolhatta a médiumcsere elmaradása, az adatok szórása a mikotoxinkezelés esetén jóval kisebb volt, ami a mikotoxinok jelenléte által kiváltott drasztikusabb hatásokat bizonyítja. Ennek megerősítésére a mikotoxinhatás kísérlet megismétlését tervezem rendszeres médiumcserével, hogy kiszűrjem a friss médium hiányának hatását az eredményekből.

### 2.7. Sejtek transzgenexpressziós változásainak bizonyítása

A sejtek fluoreszcenciájának ciklikus változását automata mikroszkóp segítségével vizsgáltam. A készült képsorozatot a Fiji programmal analizáltam és készítettem belőle timelapse videót a jobb vizualizálás érdekében. Ez alapján egyértelműen megfigyelhető, ahogy a sejtek osztódás után pirosan fluoreszkálnak, majd egy rövid sárga szakaszt követően zöld színre váltanak, végül a következő sejtosztódás előtt elvesztik a színüket (21. ábra).



**21. ábra:** A *FUCCI* ősvarsejtek színváltozása a különböző sejtciklus szakaszokban. Jól elkülönül a két riporter individuális (piros vagy zöld) és együttes (piros és zöld → sárga/zöldessárga) expressziója a sejtciklus különböző stádiumaiban.

#### IV. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A különböző háziasított madárfajok nagy jelentőséggel bírnak az emberiség számára, mind gazdasági, mind élelmezési és ezeknek okán kísérleti szempontokból is. Gazdaságilag a világ legjelentősebb állatifehérje-forrása, ezzel a baromfihús a legnagyobb mennyiségben előállított húсарu, köszönhetően könnyű tarthatóságuknak, jó takarmányértékesítésüknek, valamint annak, hogy minden nagy kultúra és vallás engedélyezi a fogyasztásukat. Húsuk mellett azonban a tojás-, valamint a tolltermelés is fontos iparágak számít. Kísérleti szempontból a madarak remek szaporodásbiológiai és embriológiai modellt szolgáltatnak (Bednarczyk et al., 2021), emellett magas fehérjetartalma miatt a tojásuk ígéretes bioreaktor-jelölt különböző fehérjék termeltetésére (Sheridan, 2016). Emiatt a madarakkal kapcsolatos kísérletek tervezése és sikeres lebonyolítása nagyon fontos. Az általam végzett kutatómunka ehhez nyújthat segítséget.

A madár ősvarsejtek egyre nagyobb szerepet kapnak a különböző kutatásokban. Bizonyították már szerepüket az állategészségügyben (Trefil et al., 2017), a génmegőrzés során (Chaipipat et al., 2022; Lázár et al., 2021), valamint a transzgenézisben is (Petitte and Mozdziak, 2014). A házityúk esetén a PGC-k hosszútávú tenyésztése már jól megoldható (Whyte et al., 2015), valamint más fajok ősvarsejtjeinek felhasználására is történnek fejlesztések (Chen et al., 2019b; Nakamura, 2015). Ebből kiindulva a madár ősvarsejtek felhasználása egyre nagyobb teret nyerhet a közeljövőben.

Az irodalmi áttekintésben bemutatott néhány kutatással igyekeztem felvázolni egy transzgenikus technológia új fajra való adaptálásának nehézségeit, valamint azt is, hogy a múltban folytatott kutatások hogy segítettek hozzá engem egy már részletesen kidolgozott, jól működő eszköz eléréséhez. Emellett jól bemutatják a FUCCI transzgenikus vonalakban rejlő lehetőségeket. Az eredményeimből az a következtetés vonható le, hogy ennek a technikának az adaptálása nagy gazdasági haszonnal rendelkező állatfajokra fontos információkat szolgáltathat azok fejlődésbiológiai tulajdonságairól, külső tényezőkre adott reakcióikról és a szaporodásbiológiájukat befolyásoló tényezőkről. Az általunk választott házityúk faj emellett remek modell az embriológiai fejlődés vizsgálata szempontjából, míg a létrehozott ősvarsejt-vonalak értékes adatokkal szolgálhatnak az ivarszervek és ivarsejtek kialakulását befolyásoló hatásokról.

Kísérleteim során megfigyeltem, hogy mikotoxinok jelenlétében a tenyészetek sejtosztódás-szinkronizációra utaló magatartást mutatnak, ugyanis voltak olyan mintáim, amikben a sejtek 100%-a piros expresszióval rendelkezett, vagyis G<sub>1</sub>/G<sub>0</sub> fázisban maradtak. Ez összhangban van olyan megfigyelésekkel, melyek szerint az alacsony hőmérséklet okozta stressz is sejtciklus-szinkronizációt vált ki (Enninga et al., 1984). Sejtciklus szintronizálás terén már többféle

módszert kifejlesztettek, akár fizikális (a sejtek mérete, sűrűsége alapján válogatják szét a különböző stádiumú sejteket centrifugálás, áramlási citometria, vagy dielektroforézis segítségével) vagy kémiai (mitotikus szelekció, DNS szintézis inhibíció, szérummegvonás) módszerekkel (Banfalvi, 2016). Az általunk tapasztalt jelenség dokumentálása jól bizonyítja, hogy a FUCCI sejtvonalak kiválóan alkalmasak különböző környezeti stresszhatások következményeinek vizsgálatára.

### ***1. Javaslatok***

Az általam sikeresen létrehozott stabil FUCCI-pozitív transzgénikus házityúk ősvarsejt-vonalak több kutatási területen is kiválóan felhasználhatóak. A kísérleteim végén érintőlegesen, elsősorban a transzgén működésének bemutatása érdekében kitértem az egyes mikotoxinok hatásainak vizsgálatára FUCCI-PGC vonalak segítségével. Ez a témakör nagy jelentőséggel bír, hiszen a mikotoxinok nemcsak használlatainkra vannak káros hatással, hanem az általuk termelt termékekben akkumulálódva, azokon keresztül az emberi szervezetet is veszélyeztethetik. Emiatt nagy szükség van a mikotoxinhatások kutatására, mind gazdasági, mind egészségügyi szempontokból. Az ebben a dolgozatban bemutatott kísérletben csupán két mikotoxin hatását vizsgáltam, azonban ezek mellett mindenképpen javaslom több más (deoxinivalenol, aflatoxin, fumonizin B1) mikotoxin bevonását az ilyen típusú vizsgálatokba. Ugyanígy érdemes a különböző mikotoxinok kombinált hatásait vizsgálni.

Az ősvarsejtek remek modellt szolgáltatnak az embrionális fejlődés, azon belül pedig az egyes ivarok és azok ivarsejtjei fejlődésének vizsgálatára madárfajokban. Mivel ezek a sejtek a test változatos területein haladnak át migrációjuk során, folyamatos hatások érik őket. Ezek között előfordulhatnak a mikotoxinok által generált negatív hatások is. Bizonyos mikotoxinok kifejezetten káros hatással lehetnek az embrionális fejlődésre, ezek kutatása pedig nem csak állategészségügyi és termelési előnyökkel járhat, de feltárhat a humán gyógyászatban is fontos tendenciákat.

A toxikus hatásokon kívül a klímaváltozással járó hőmérséklet-emelkedés hatásainak sejtszintű kutatása is aktuális. Ez kifejezetten fontos lehet madárfajok esetén, hiszen ezeknél az anya testén kívül fejlődnek az utódok, így jobban ki vannak téve a környezeti hőmérsékletnek. Csoportunk a korábbiakban már foglalkozott naposcsibék hőkezelésével, és annak hatásaival az embriók fejlődésére és az RNS expresszióra (Tóth et al., 2021). A FUCCI sejtvonalak új lehetőséget adnak az őscsírarsejtek hőhatásra adott fejlődésbeli és génexpressziós válaszainak vizsgálatára. Másrésztől újabb magyar fajták bevonásával pontosabban felmérhetnénk azok

hőmérséklet-toleranciáját, így meghatározva genetikai értéküket a globális felmelegedés ellen folytatott harcban.

Ez a kísérlet már megindult kollégám, Tóth Arnold, valamint B.Sc. hallgatója, Bognár Júlia munkája által. A kontrollnak számító 38°C hőmérsékleten tartott minták mellett 40, 41, 42 és 43 °C-on kezelt mintákkal dolgoznak, és már a kísérlet kezdeti szakaszában bizonyították, hogy az általam alapított FUCCI modell remekül használható a hőhatások vizsgálatára is.

Az általam létrehozott sejtvonalak a laboratóriumokban általánosan használt technikák fejlesztésére is alkalmasak lehetnek. A PGC-k az embrionális fejlődés során nem egyenletesen proliferálnak, így egyes fejlődési szakaszok optimálisabbak lehetnek bizonyos műveletek (pl. kiméra gonád izolálás) végrehajtására, mint mások. Ehhez jó eszközt biztosítanak a FUCCI sejtvonalak. Szintén érdemes lehet protokollt fejleszteni egy teljes tenyésztési sejtciklusának szinkronizálására, mivel bizonyos fejlődési stádiumban levő sejtek esetleg jobb határfokkal épülhetnek be a gonádokba és biztosabban alapíthatnak kolóniákat, mint más sejtek. Emellett szinkronizált sejtvonalak létrehozásával nagyban fejleszthetnénk akár az ivarszervi kimérelőállítás határfokát, akár a PGC-alapú transzgenezis hatékonyságát is.

A PGC-k mellett azonban érdemes lehet más sejt típusokat is megvizsgálni a FUCCI struktúra segítségével. Ehhez szükséges lenne transzgenikus ivarszervi kimérák előállítása, majd ezek keresztezésével transzgenikus állatok létrehozása. Ezen egyedek, mivel már minden sejtjükben hordoznák a transzgént, új távlatokat nyitnának meg a külső tényezők különböző sejt típusok ciklusára gyakorolt hatásainak vizsgálatában.

A fentiekben bemutatott kutatások jól reprezentálják, hogy a FUCCI-rendszer adaptálható új fajokra is. Madár ősvarsejtek esetén ennek elsődleges akadálya az univerzális tenyésztőmédiüm hiánya. Jelenleg az egyetlen faj, ami számára stabilan működő tenyésztésre alkalmas tápoldat áll rendelkezésünkre, a házityúk. Ez azonban nem jelenti azt, hogy ne történnének erőfeszítések más fajok bevonására is. Készültek már tenyésztőmédiümök házikacsa (*Anas platyrhynchos domestica*), és fürj számára (Chen et al., 2019b; Tae et al., 2008), valamint laboratóriumunkban történtek próbálkozások a házilúd és a parlagi gyöngytyúk (*Numida meleagris*) bevonására, emellett tervben vannak bronzpulykához kapcsolódó kísérletek is. Amennyiben ezek a tápoldat-fejlesztések megoldják az egyes fajok ősvarsejtjeinek hosszútávú *in vitro* fenntartását, megnyílik egy új lehetőség a gazdaságilag jelentős baromfifajták transzgenikus vizsgálatára.



## V. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK

Új tudományos eredményeim a következők:

1. Optimalizáltam és sikeresen alkalmaztam a piggyBac transzpozon közvetítette elektroporálás módszerét FUCCI riporter vektor hatékony bejuttatására házityúk-ősivarsejtbe.
2. Elsőként hoztam létre hímivarú (ZZ genotípusú) és nőivarú (ZW genotípusú), a FUCCI vektort stabilan integrálódva tartalmazó házityúk ősvarsejt tenyészetekből kiindulva egy sejt eredetű ősvarsejt-vonalakat.
3. Igazoltam, hogy az általam létrehozott egy sejt eredetű, a FUCCI vektort stabilan integrálódva tartalmazó FCF5 (ZW) és FCM5 (ZZ) ősvarsejt-vonalak sejtjei képesek beépülni recipiens embriók ivarszervébe.
4. Teljes genom szekvenálással igazoltam, hogy a FUCCI vektor az FCF5 sejtvonala esetén egy kópiában, míg az FCM5 sejtvonala esetében két kópiában integrálódott a sejtek genomjába.
5. Az FCM5 és FCF5 sejtvonalaik esetében igazoltam timelapse videó felvételek készítésével és elemzésével, hogy a sejtek által expresszált fluoreszcens fehérjék kifejeződése a sejtciklus fázisainak megfelelően változik.
6. Igazoltam, hogy az FCM5 és FCF5 sejtvonalaikban szignifikánsan nő a G<sub>1</sub> fázisban levő sejtek aránya a tenyésztés során a tápoldatban létrejövő kedvezőtlen változásokra, így a tápoldat csere hiányára, illetve T-2 és zearalenon kezelés hatására.





## VI. ÖSSZEFOGLALÁS

A baromfi a globális gazdaság szempontjából az egyik legfontosabb állatcsoport, mivel alapvető szerepet játszik az emberi táplálkozásban, továbbá számos egyéb területen, így a tolltermelés területén, mint bioreaktor, illetve mint modell szervezet fejlődésbiológiai kutatásokban.

A baromfitenyésztés területén végzett kutatások kiemelt jelentőségűek annak érdekében, hogy optimalizálni lehessen a tartási, takarmányozási és tenyésztési paramétereket, illetve, hogy teljesebb képet kapjunk fejlődésükről, az őket érő környezeti hatások következményeiről, és más fajokkal való biológiai hasonlóságaikról. Különös figyelmet érdemelnek a baromfifajok genetikai megőrzésének lehetőségei, transzgenézisük, valamint külső tényezőkkel szembeni rezisztenciájának vizsgálata, amely a jelenlegi tudományos kutatások egyik kiemelt feladata.

Az ősvarsejtek (primordial germ cells, PGC) madárfajok esetében sokrétű eszközként szolgálnak a biológiai kutatásokban. Potenciális alkalmazásuk kiterjed a génmegőrzésre, hatékony vektorként funkcionálnak a transzgenézis során, és *in vitro* modellként fontos szerepet töltenek be az ivardetermináció mechanizmusainak vizsgálatában. A PGC-k, mint az ivarsejtek prekursorai, a fejlődésük során végbemenő egyedi vándorlásuk révén könnyen hozzáférhetőek, így madarak esetében a legfontosabb embrionális sejttípusnak tekinthetők és számos biotechnológiai módszer kiindulópontjai. Nagy sejtméretük elősegíti a megfigyelésüket, valamint megfelelő tápoldatban hosszú távon fenntarthatóak. Ugyanakkor hátrányuk, hogy minden madárfaj esetében specifikus tápoldatot igényelnek, és jelenleg csak a házityúk (*Gallus gallus domesticus*) esetében áll rendelkezésre stabilan, jól működő tenyésztő médium. Jelenleg is folynak kutatások annak érdekében, hogy más madárfajok ősvarsejtjei számára is hosszú távon fenntartható tenyésztési körülményeket fejlesszenek ki.

A fluoreszcens ubikvitináció-alapú sejtciklus indikátor (FUCCI) egy rendkívül hasznos transzgén szerkezet, mely a sejtciklus változásait egy ciklus-specifikus fehérjéhez kötött riportergén struktúra segítségével színváltozással jelzi. Ez az eszköz remek lehetőséget nyújt a sejtek osztódásának megfigyelésére, ezzel a különböző külső tényezők sejtciklusra gyakorolt hatásainak vizsgálatára. Egyebek mellett olyan betegségek működésének megértésére használták, mint az Alzheimer-kór vagy a rák, valamint szövetregenerációs kutatásokban is szerepet játszott. Eddig több fajra adaptálták a technikát, köztük humán, egér, zebradánió, zsákállat és axolotl sejtekre, de madarakra még nem. A dolgozatomban leírt kutatás a FUCCI-komplex házityúk fajra történő sikeres alkalmazásról számol be, valamint bemutatja a technika nyújtotta vizsgálati lehetőségeket különböző kísérletekben.

Kísérleteim során sikeresen hoztam létre mindkét ivarból származó transzgénikus FUCCI háziyúk-ősivarsejt (PGC) tenyészeteket, amelyekből egysejt alapú sejt vonalakat állítottam elő. A stabil sejttenyészeteket részletesen jellemeztem, beleértve génexpressziós profiljuk és immunhisztokémiai tulajdonságaik vizsgálatát, valamint beépülési potenciáljukat recipiens embriókba. Sikeresen hoztam létre ivarszervi kimérákat is. Kromoszómaanalízissel bizonyítottam, hogy a kariotípus nem változott sem az elektroporáció, sem a hosszú távú tenyésztés hatására. DNS-szekvenálással igazoltam a transzgén jelenlétét a nőivarú sejtek 27-es kromoszómáján, illetve a hímivarú sejtek 2-es és 12-es kromoszómáin. A transzgénikus sejt vonalakban a FUCCI rendszer működését mikotoxinkezeléssel, médiumcsere elhagyásával és automatizált mikroszkópos timelapse elemzéssel vizualizáltam. Hosszabb médiumcsere nélküli időszak során, valamint mikotoxin kezelés hatására mindkét tenyészetben megfigyeltem a G1 fázisban lévő, piros fluoreszcenciát mutató sejtek arányának növekedését.

## VII. SUMMARY

From an economic perspective, poultry species are among the most important animal groups globally, principally due to their significant role in human nutrition and other essential applications such as feather production, bioreactor potential, and their utility as developmental biology models. Consequently, research on these species is fundamental for optimizing management practices, improving feeding regimens, and enhancing their utility in various fields. Furthermore, investigating their developmental processes, responses to environmental factors, and biological similarities with other species is essential. In this context, the exploration of avian gene preservation strategies, transgenesis, and resistance to environmental stressors represents a critical area of contemporary research.

Primordial germ cells (PGCs) are invaluable, multifunctional tools in avian biology. They offer a solution for avian gene preservation, serve as efficient vectors for transgenesis, and provide a robust *in vitro* model for studying sexual determination. As the precursor cells of gametes, PGCs undergo a unique migratory process during development, which makes them easily accessible for experimental procedures, therefore PGCs are a highly important embryonic cell type in birds and they are used by avian biotechnology extensively. Their large size facilitates their observation, and under optimal culture conditions, they can be maintained long-term. However, one limitation is that each avian species requires a specific culture medium, and currently, only chicken PGCs have a well-established, stable medium. Ongoing research aims to develop long-term culture systems for PGCs from other avian species.

The fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator (FUCCI) is a valuable transgenic tool that visualizes cell cycle progression through colour changes, driven by a reporter gene system linked to phase-specific proteins. FUCCI was used for experiments aiming the discovery of disease mechanisms, such as Alzheimer's disease and cancer, and on tissue regeneration. Until now, the technique was adapted to several species, like human, mouse, zebrafish, *Ciona* and axolotl, but not to avian species. This study focuses on the successful adaptation of the FUCCI system to the chicken (*Gallus gallus domesticus*) and demonstrates its research potential in various experimental applications.

To achieve this, transgenic FUCCI PGC lines were established from both male and female chickens. Following the stabilization of these lines, the FCF5 (female) and FCM5 (male) lines were characterized to confirm the successful insertion and functional expression of the FUCCI construct. The cell lines were further analysed using quantitative PCR (qPCR) and immunohistochemical staining to assess their gene expression and protein localization profiles. Chromosomal staining was performed to verify the stability of the karyotype after long-term

culture. Gonadal chimeras were generated by injecting PGCs into recipient embryos, demonstrating the integration capacity of these lines. DNA sequencing confirmed the presence of the FUCCI construct in both the FCF5 line (on chromosome 27) and the FCM5 line (on chromosomes 2 and 12). Additionally, a T-2 toxin assay was used to evaluate the response of the cells to a toxic environment, revealing that FUCCI reliably indicates cellular reactions through colour changes. During extended periods without medium exchange or mycotoxin presence in the medium, an increase in red-labelled cells in the G1 phase was observed in both cell lines, reflecting changes in cell cycle dynamics under nutrient-deprived conditions.

In summary this tool enables precise monitoring of cell division dynamics and the impact of various external factors on the cell cycle.

## VIII. IRODALOMJEGYZÉK

- Abdulhasan, M., Ruden, X., Marben, T., Harris, S., Ruden, D. M., Awonuga, A. O., Puscheck, E. E. and Rappolee, D. A.** (2022). Using Live Imaging and Fluorescence Ubiquitinated Cell Cycle Indicator Embryonic Stem Cells to Distinguish G1 Cell Cycle Delays for General Stressors like Perfluoro-Octanoic Acid and Hyperosmotic Sorbitol or G2 Cell Cycle Delay for Mutagenic Stressors like Benzo(a)pyrene. *Stem Cells Development* **31**, 296–310.
- Abe, T., Sakaue-Sawano, A., Kiyonari, H., Shioi, G., Inoue, K. I., Horiuchi, T., Nakao, K., Miyawaki, A., Aizawa, S. and Fujimori, T.** (2013). Visualization of cell cycle in mouse embryos with Fucci2 reporter directed by Rosa26 promoter. *Development* **140**, 237–246.
- Aire, T. A.** (2014). Spermiogenesis in birds. *Spermatogenesis* **4**, e959392.
- Alev, C., Nakano, M., Wu, Y., Horiuchi, H. and Sheng, G.** (2013). Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cells. *Methods of Molecular Biology* **1074**, 151–173.
- Alfi, O. S., Donnell, G. N. and Derencsenyi, A.** (1973). C-banding of Human Chromosomes Produced by D.N.ase. *The Lancet* **302**, 505.
- Altgilbers, S., Klein, S., Dierks, C., Weigend, S. and Kues, W. A.** (2021). Cultivation and characterization of primordial germ cells from blue layer hybrids (Araucana crossbreeds) and generation of germline chimeric chickens. *Scientific Reports* **11**,.
- Anand, M., Lázár, B., Tóth, R., Páll, E., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Homolya, L., Hegyi, Z., Hidas, A. and Gócza, E.** (2018). Enhancement of chicken primordial germ cell in vitro maintenance using an automated cell image analyser. *Acta Veterinaria Hungarica* **66**, 518–529.
- Andrews, S.** (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.
- Arafa, A. S., Bloomer, R. J., Wilson, H. R., Simpson, C. F. and Harms, R. H.** (1981). Susceptibility Of Various Poultry Species To Dietary Aflatoxin. *British Poultry Science* **22**, 431–436.
- Aramaki, S., Sato, F., Kato, T., Soh, T., Kato, Y. and Hattori, M. A.** (2007). Molecular cloning and expression of dead end homologue in chicken primordial germ cells. *Cell Tissue Research* **330**, 45–52.
- Arias, E. E. and Walter, J. C.** (2007). Strength in numbers: Preventing rereplication via multiple mechanisms in eukaryotic cells. *Genes Development* **21**, 497–518.
- Asano, A. and Tajima, A.** (2017). Development and Preservation of Avian Sperm. In *Avian Reproduction From Behavior to Molecules* (ed. Sasanami, T.), pp. 59–75. Singapore: Springer Nature.
- Bachvarova, R. F., Skromne, I. and Stern, C. D.** (1998). Induction of primitive streak and Hensen's node by the posterior marginal zone in the early chick embryo. *Development* **125**, 3521–3534.
- Bachvarova, R. F., Crother, B. I., Manova, K., Chatfield, J., Shoemaker, C. M., Crews, D. P. and Johnson, A. D.** (2009). Expression of Dazl and Vasa in turtle embryos and ovaries: Evidence for inductive specification of germ cells. *Evolution&Development* **11**, 525–534.

- Bakst, M. R., Wishart, G. and Brillard, J.-P.** (1994). Oviducal Sperm Selection, Transport, and Storage in Poultry. *Poultry Science Reviews* **5**, 117–143.
- Bakst, M. R., Donoghue, A. M., Yoho, D. E., Moyle, J. R., Whipple, S. M., Camp, M. J., Liu, G. Q. and Bramwell, R. K.** (2010). Comparisons of sperm storage tubule distribution and number in 4 strains of mature broiler breeders and in turkey hens before and after the onset of photostimulation. *Poultry Science* **89**, 986–992.
- Bakst, M. R.** (2011). Physiology and endocrinology symposium: Role of the oviduct in maintaining sustained fertility in hens. *Journal of Animal Science* **89**, 1323–1329.
- Banfalvi, G.** (2016). Overview of cell synchronization. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 3–27. New York: Springer Science+Business Media.
- Barna, J., Liptói, K. and Patakiné Várkonyi, E.** (2016). Save what can be saved-new possibilities in in vitro gene preservation of poultry species Literature review. *Magyar Állatorvosok Lapja* **138**, 621–630.
- Bashir, T., Dorrello, N. V., Amador, V., Guardavaccaro, D. and Pagano, M.** (2004). Control of the SCF Skp2-Cks1 ubiquitin ligase by the APC/C Cdh1 ubiquitin ligase. *Nature* **11**, 190–193.
- Bednarczyk, M., Dunislawska, A., Stadnicka, K. and Grochowska, E.** (2021). Chicken embryo as a model in epigenetic research. *Poultry Science* **100**,.
- Bellairs, T. H., Lorenz, F. W. and Dunlap, T.** (1978). Cleavage in the chick embryo. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **43**, 55–69.
- Benjamin, J. M., Torke, S. J., Demeler, B. and McGarry, T. J.** (2004). Geminin has dimerization, Cdt1-binding, and destruction domains that are required for biological activity. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 45957–45968.
- Bink, K., Walch, A., Feuchtinger, A., Eisenmann, H., Hutzler, P., Höfler, H. and Werner, M.** (2001). TO-PRO-3 is an optimal fluorescent dye for nuclear counterstaining in dual-colour FISH on paraffin sections. *Histochemistry and Cell Biology* **115**, 293–299.
- Birkhead, T. R. and Moller, A. P.** (1993). *Sexual selection and the temporal separation of reproductive events: sperm storage data from reptiles, birds and mammals*.
- Blow, J. J. and Dutta, A.** (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **6**, 476–486.
- Bobr, L. W., Ogasawara, F. X. and Lorenz, F. W.** (1963). DISTRIBUTION OF SPERMATOZOA IN THE OVIDUCT AND FERTILITY IN DOMESTIC BIRDS IL TRANSPORT OF SPERMATOZOA IN THE FOWL OVIDUCT. *Journal of Reproduction and Fertility* **8**, 49–58.
- Boutette, J. B., Ramsay, E. C., Kania, S. A. and Potgieter, L. N. D.** (2000). Improved bird sexing by DNA sequencing. In *Proceedings of the Association of Avian Veterinarians*, pp. 229–231. Portland USA.
- Brillard, J. P.** (1993). Sperm Storage and Transport Following Natural Mating and Artificial Insemination. *Poultry Science* **72**, 923–928.

- Carsience, R. S., Clark, M. E., Verrinder Gibbins, A. M. and Etches, R. J.** (1993). Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* **117**, 669–675.
- Chaipipat, S., Sritabtim, K., Piyasanti, Y., Prukudom, S., Jurutha, J., Phetpila, V., Sinsiri, R., Kammongkun, J., Molee, A., Thiangtum, K., et al.** (2023). Initiative on Avian Primordial Germ Cell Cryobanking in Thailand. *Biopreservation and Biobanking* **21**, 458–466.
- Challagulla, A., Jenkins, K. A., O’Neil, T. E., Shi, S., Morris, K. R., Wise, T. G., Paradkar, P. N., Tizard, M. L., Doran, T. J. and Schat, K. A.** (2021). In vivo inhibition of marek’s disease virus in transgenic chickens expressing Cas9 and gRNA against ICP4. *Microorganisms* **9**, 1–17.
- Chang, I. K., Tajima, A., Chikamune, T. and Ohno, T.** (1995). Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge. *Cell Biology International* **19**, 143–149.
- Chang, I. K., Naito, M., Kuwana, T., Mizutani, M. and Sakurai, M.** (1998). Production of Germline Chimeric Quail by Transfer of Gonadal Primordial Germ Cells Preserved in Liquid Nitrogen. *Japanese Poultry Science* **35**, 321–328.
- Chang, Y., Hellwarth, P. B., Randolph, L. N., Sun, Y., Xing, Y., Zhu, W., Lian, X. L. and Bao, X.** (2020). Fluorescent indicators for continuous and lineage-specific reporting of cell-cycle phases in human pluripotent stem cells. *Biotechnology&Bioengineering* **117**, 2177–2186.
- Chapman, S. C., Matsumoto, K., Cai, Q. and Schoenwolf, G. C.** (2007). Specification of germ layer identity in the chick gastrula. *BMC Developmental Biology* **7**,.
- Chen, Y., Hata, T., Rehman, F., Kang, L., Yang, L., Kim, B. Y. S. and Nguyen, J. H.** (2019a). Visualization of Hepatocellular Regeneration in Mice After Partial Hepatectomy. *Journal of Surgical Research* **235**, 494–500.
- Chen, Y. C., Lin, S. P., Chang, Y. Y., Chang, W. P., Wei, L. Y., Liu, H. C., Huang, J. F., Pain, B. and Wu, S. C.** (2019b). In vitro culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poultry Science* **98**, 1820–1832.
- Chicheportiche, A., Ruat, M., Boussin, F. D. and Daynac, M.** (2018). Isolation of neural stem and progenitor cells from the adult brain and live imaging of their cell cycle with the FUCCI system. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 69–78. Humana Press Inc.
- Chittajallu, D. R., Florian, S., Kohler, R. H., Iwamoto, Y., Orth, J. D., Weissleder, R., Danuser, G. and Mitchison, T. J.** (2015). In vivo cell-cycle profiling in xenograft tumors by quantitative intravital microscopy. *Nature Methods* **12**, 577–585.
- Choi, W. Y., Gemberling, M., Wang, J., Holdway, J. E., Shen, M. C., Karlstrom, R. O. and Poss, K. D.** (2013). In vivo monitoring of cardiomyocyte proliferation to identify chemical modifiers of heart regeneration. *Development* **140**, 660–666.
- Christensen, V. L., Fairchild, B. D. and Ort, D. T.** (2005). The relationship between sperm hydrolysis of the perivitelline layer and embryonic livability. *Journal of Applied Poultry Research* **14**, 60–68.



- Cook, J. G., Chasse, D. A. D. and Nevins, J. R.** (2004). The Regulated Association of Cdt1 with Minichromosome Maintenance Proteins and Cdc6 in Mammalian Cells. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 9625–9633.
- Cooper, C. A., Challagulla, A., Jenkins, K. A., Wise, T. G., O’Neil, T. E., Morris, K. R., Tizard, M. L. and Doran, T. J.** (2017). Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). *Transgenic Research* **26**, 331–347.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A. and Davies, R. M.** (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* **10**,.
- Danicke, S.** (2002). Prevention and control of mycotoxins in the poultry production chain: a European view. *World’s Poultry Science Journal* **58**.
- De Melo Bernardo, A., Sprenkels, K., Rodrigues, G., Noce, T. and De Sousa Lopes, S. M. C.** (2012). Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation. *Biology Open* **1**, 1146–1152.
- Didier, E., Didier, P., Fargeix, N., Guillot, J. and Thiery, J.-P.** (1990). Expression and distribution of carbohydrate sequences in chick germ cells: a comparative study with lectins and the NC-1/HNK-1 monoclonal antibody. *International Journal of Developmental Biology* **34**, 421–431.
- Divya, D., Shukla, R., Chatterjee, R., Sagar, G., Rajendra Prasad, A. and Bhattacharya, T.** (2021). Production of Transgenic Chimeric Chicken from Cryopreserved Primordial Germ Cells and its Validation by Developing shRNA Transgenic Chicken Chimera. *Research Square*. Preprint
- Du Plessis, L. and Soley, J. T.** (2014). A re-evaluation of sperm ultrastructure in the emu, *Dromaius novaehollandiae*. *Theriogenology* **81**, 1073–1084.
- Duerr, T. J., Jeon, E. K., Wells, K. M., Villanueva, A., Seifert, A. W., McCusker, C. D. and Monaghan, J. R.** (2022). A constitutively expressed fluorescent ubiquitination-based cell-cycle indicator (FUCCI) in axolotls for studying tissue regeneration. *Development* **149**,.
- Eberhart, C. G., Maines, J. Z. and Wasserman, S. A.** (1996). Meiotic cell cycle requirement for a fly homologue of human Deleted in Azoospermia. *Nature* **381**, 783–785.
- Ecker, A., Lázár, B., Tóth, R. I., Urbán, M., Tokodyné Szabadi, N., Salinas Aponte, M. T., Adnan, M., Várkonyi, E. and Góczy, E.** (2023). The Effects of Freezing Media on the Characteristics of Male and Female Chicken Primordial Germ Cell Lines. *Life* **13**,.
- Eddy, E. M.** (1976). Germ plasm and the differentiation of the germ cell line. *International Review of Cytology* **43**, 229–280.
- Enninga, I. C., Groenendijk, R. T. L., Van Zeeland, A. A. and Simons, J. W. I. M.** (1984). Use of low temperature for growth arrest and synchronization of human diploid fibroblasts. *Mutation Research* **130**, 343–352.
- Esponda, P. and Bedford, J. M.** (1985). Surface of the Rooster Spermatozoon Changes in Passing Through the Wolffian Duct. *Journal of Experimental Zoology* **234**, 441–449.
- Eyal-Giladi, H., Ginsburg, M. and Farbarov, A.** (1981). Avian primordial germ cells are of epiblastic origin. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **65**, 9.

- Eyal-Giladi, H., Debby, A. and Harel, N.** (1992). The posterior section of the chick's area pellucida and its involvement in hypoblast and primitive streak formation. *Development* **116**, 819–830.
- Ezaz, T., Stiglec, R., Veyrunes, F. and Marshall Graves, J. A.** (2006). Relationships between Vertebrate ZW and XY Sex Chromosome Systems. *Current Biology* **16**,.
- FAO** (2023). Gateway to poultry production and products.
- Filazi, A., Yurdakok-Dikman, B., Kuzukiran, O. and Sireli, U. T.** (2017). Mycotoxins in Poultry. In *Poultry Science* (ed. Manafi, M.), pp. 73–92. Rijeka: InTech.
- Fofanova, K. A.** (1965). Morphologic data on polyspermy in chickens. In *Federation proceedings. Translation supplement*, pp. 239–247.
- Frieß, A. E., Sinowatz, F., Wrobel, K.-H. and Scklek-Winnisch, R.** (1978). Cell and Tissue Research The Uterovaginal Sperm Host Glands of the Quail (*Coturnix coturnix japonica*). *Cell and Tissue Research* **191**, 101–114.
- Fujimoto, T., Ukeshima, A. and Kiyofuji, R.** (1976). The Origin, Migration and Morphology of the Primordial Germ Cells in the Chick Embryo. *Anatomical Record* **185**, 139–153.
- Gilbert, S. F. and Barresi, M. J. F.** (2016). *Developmental Biology*. 11th Edition. Sunderland: Sinauer Associates, Inc.
- Ginsburg, M. and Eyal-Giladi, H.** (1987). Primordial germ cells of the young chick blastoderm originate from the central zone of the area pellucida irrespective of the embryo-forming process. *Development* **101**, 209–219.
- Ginsburg, M., Hochman, J. and Eyal-Giladi, H.** (1989). Immunohistochemical analysis of the segregation process of the quail germ cell lineage. *International Journal of Developmental Biology* **33**, 389–395.
- Goldsmith, J. B.** (1935). The primordial germ cells of the chick. I. The effect on the gonad of complete and partial removal of the germinal crescent and of removal of other parts of the blastodisc. *Journal of Morphology* **58**, 537–553.
- Gordon, J. W. and Ruddle, F. H.** (1981). Integration and stable germ line transmission of genes injected into mouse pronuclei. *Science (1979)* **214**, 1244–1246.
- Graham, G. J. and Wright, E. G.** (1997). Haemopoietic stem cells: their heterogeneity and regulation. *International Journal of Experimental Pathology* **78**, 197–218.
- Griffiths, R., Daan, S. and Dijkstra, C.** (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **263**, 1251–1256.
- Hajji, K., Martin, C., Perramon, A. and Dieterlen-Liévre** (1988). Sexual phenotype of avian chimeric gonads with germinal and stromal cells of opposite genetic sexes. *Biological Structures and Morphogenesis* **1**, 107–116.
- Hamburger, V. and Hamilton, H. L.** (1951). A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Journal of Morphology* **88**, 49–92.
- Harper, E. H.** (1904). THE FERTILIZATION AND EARLY DEVELOPMENT OF THE PIGEON'S EGG. *American Journal of Anatomy* **3**, 349–386.

- Hen, G., Friedman-Einat, M. and Sela-Donenfeld, D.** (2014). Primordial germ cells in the dorsal mesentery of the chicken embryo demonstrate left-right asymmetry and polarized distribution of the EMA1 epitope. *Journal of Anatomy* **224**, 556–563.
- Holt, W. V. and Lloyd, R. E.** (2010). Sperm storage in the vertebrate female reproductive tract: How does it work so well? *Theriogenology* **73**, 713–722.
- Holt, W. V.** (2011). Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: An interspecies comparison. *Reproduction in Domestic Animals* **46**, 68–74.
- Howarth, B.** (1971). An Examination for Sperm Capacitation in the Fowl. *Biology of Reproduction* **3**, 338-341.
- Hrabia, A., Takagi, S., Ono, T. and Shimada, K.** (2003). Fertilization and Development of Quail Oocytes after Intracytoplasmic Sperm injection. *Biology of Reproduction* **69**, 1651–1657.
- Hu, T., Taylor, L., Sherman, A., Tiambo, C. K., Kemp, S. J., Whitelaw, B., Hawken, R. J., Djikeng, A. and McGrew, M. J.** (2022). A low-tech, cost-effective and efficient method for safeguarding genetic diversity by direct cryopreservation of poultry embryonic reproductive cells. *Elife* **11**,.
- Hubert, J.** (1970). Etude cytologique et cytochimique des cellules germinales des reptiles au cours du developpement embryonnaire et apres la naissance. *Zeitschrift fur Zellforschung und mikroskopische Anatomie* **107**, 249–264.
- Hughes, G. C.** (1963). The population of germ cells in the developing female chick. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **11**, 513–536.
- Idoko-Akoh, A., Goldhill, D. H., Sheppard, C. M., Bialy, D., Quantrill, J. L., Sukhova, K., Brown, J. C., Richardson, S., Campbell, C., Taylor, L., et al.** (2023). Creating resistance to avian influenza infection through genome editing of the ANP32 gene family. *Nature Communications* **14**,.
- Illmensee, K. and Mahiwald, A. P.** (1976). The autonomous function of germ plasm in a somatic region of the Drosophila egg. *Experimental Cell Research* **97**, 127–140.
- Israels, E. D. and Israels, L. G.** (2000). The Cell Cycle. *Oncologist* **5**, 510–513.
- Jung, J. G., Kim, D. K., Park, T. S., Lee, S. D., Lim, J. M. and Han, J. Y.** (2005). Development of Novel Markers for the Characterization of Chicken Primordial Germ Cells. *Stem Cells* **23**, 689–698.
- Kagami, H., Clark, M. E., Verrinder Gibbins, A. M. and Etches, R. J.** (1995). Sexual Differentiation of Chimeric Chickens Containing ZZ and ZW Cells in the Germline. *Molecular Reproduction and Development* **42**, 379–387.
- Kagami, H., Tagami, T., Matsubara, Y., Harumi, T., Hanada, H., Maruyama, K., Sakurai, M., Kuwana, T. and Naito, M.** (1997). The Developmental Origin of Primordial Germ Cells and the Transmission of the Donor-Derived Gametes in Mixed-Sex Germline Chimeras to the Offspring in the Chicken. *Molecular Reproduction and Development* **48**, 501–510.
- Karagenc, L., Cinnamon, Y., Ginsburg, M. and Petite, J. N.** (1996). Origin of Primordial Germ Cells in the Prestreak Chick Embryo. *Developmental Genetics* **19**, 290–301.

- Karasawa, S., Araki, T., Nagai, T., Mizuno, H. and Miyawaki, A.** (2004). Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer. *Biochemical Journal* **22**, 307-312.
- Kienast, Y., Von Baumgarten, L., Fuhrmann, M., Klinkert, W. E. F., Goldbrunner, R., Herms, J. and Winkler, F.** (2010). Real-time imaging reveals the single steps of brain metastasis formation. *Nature Medicine* **16**, 116–122.
- Kim, Y. M. and Han, J. Y.** (2018). The early development of germ cells in chicken. *International Journal of Developmental Biology* **62**, 141–148.
- Kim, G. D., Lee, J. H., Song, S., Kim, S. W., Han, J. S., Shin, S. P., Park, B. C. and Park, T. S.** (2020). Generation of myostatin-knockout chickens mediated by D10A-Cas9 nickase. *FASEB Journal* **34**, 5688–5696.
- Kimura, T. and Nakano, T.** (2011). Induction of pluripotency in primordial germ cells. *Histology&Histopathology* **26**, 643–650.
- King, A. and McLelland, J.** (1984a). Female reproductive system. In *Birds: their structure and function* (ed. King, A.) and McLelland, J.), pp. 145–165. Philadelphia: Baillière Tindal.
- King, A. and McLelland, J.** (1984b). Male reproductive system. In *Birds: their structure and function* (ed. King, A.) and McLelland, J.), pp. 166–174. Philadelphia: Baillière Tindal.
- Kino, K., Pain, B., Leibo, S. P., Cochran, M., Clark, M. E. and Etches, R. J.** (1997). Production of Chicken Chimeras from Injection of Frozen-Thawed Blastodermal Cells. *Poultry Science* **76**, 753-760.
- Kirby, J. D. and Forman, P. D.** (2000). Reproduction in male birds. In *Avian Physiology* (ed. Whittow, G. C.), pp. 597–615. San Diego: San Diego Academic Press.
- Kito, G., Aramaki, S., Tanaka, K., Soh, T., Yamauchi, N. and Hattori, M.-A.** (2010). Temporal and Spatial Differential Expression of Chicken Germline-specific Proteins cDAZL, CDH and CVH During Gametogenesis. *Journal of Reproduction and Development* **56**, 341-346.
- Kochav, S., Ginsburg, M. and Eyal-Giladi, H.** (1980). From Cleavage to Primitive Streak Formation: A Complementary Normal Table and a New Look at the First Stages of the Development of the Chick II. Microscopic Anatomy and Cell Population Dynamics. *Developmental Biology* **79**, 296-308.
- Koh, S. B., Mascalchi, P., Rodriguez, E., Lin, Y., Jodrell, D. I., Richards, F. M. and Lyons, S. K.** (2017). A quantitative FastFUCCI assay defines cell cycle dynamics at a single-cell level. *Journal of Cell Science* **130**, 512–520.
- Kohno, S., Parrott, B. B., Yatsu, R., Miyagawa, S., Moore, B. C., Iguchi, T. and Guillette, L. J.** (2014). Gonadal differentiation in reptiles exhibiting environmental sex determination. *Sexual Development* **8**, 208–226.
- Kolozsvári, T.** (2009). A mikotoxinok szerepe a gazdasági haszonállatok takarmányozásában.
- Kong, L., Qiu, L., Guo, Q., Chen, Y., Zhang, X., Chen, B., Zhang, Y. and Chang, G.** (2018). Long-term in vitro culture and preliminary establishment of chicken primordial germ cell lines. *Public Library of Science One* **13**,.

- Kuwana, T., Miyayama, Y., Kajiwara, Y. and Fuamoto, T.** (1987). Behavior of Chick Primordial Germ Cells Moving Toward Gonadal Primordium In Vitro: Scanning Electron Microscopic Study. *Anatomical Record* **219**, 164–170.
- Kuwana, T., Hashimoto, K., Nakanishi, A., Yasuda, Y., Tajima, A. and Naito, M.** (1996). Long-term culture of avian embryonic cells in vitro. *International Journal of Developmental Biology* **40**, 1061–1064.
- Kwon, M. S., Koo, B. C., Choi, B. R., Lee, H. T., Kim, Y. H., Ryu, W. S., Shim, H., Kim, J. H., Kim, N. H. and Kim, T.** (2004). Development of transgenic chickens expressing enhanced green fluorescent protein. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **320**, 442–448.
- Lasko, P. F. and Ashburner, M.** (1988). The product of the Drosophila gene vasa is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* **335**, 611–617.
- Lavial, F., Acloque, H., Bachelard, E., Nieto, M. A., Samarut, J. and Pain, B.** (2009). Ectopic expression of Cvh (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Developmental Biology* **330**, 73–82.
- Lavial, F. and Pain, B.** (2010). Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. *Development, Growth&Differentiation* **52**, 101–114.
- Lázár, B.** (2020). Madár ősvarsejtek izolálása és fejlődési potenciáljának jellemzése in vitro és in vivo.
- Lázár, B., Molnár, M., Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., McGrew, M. J., Gócza, E. and Patakiné Várkonyi, E.** (2021). Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. *Poultry Science* **100**, 101207.
- Lee, J. C. I., Tsai, L. C., Hwa, P. Y., Chan, C. L., Huang, A., Chin, S. C., Wang, L. C., Lin, J. T., Linacre, A. and Hsieh, H. M.** (2010). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Molecular Cell Probes* **24**, 27–31.
- Lee, H. C., Choi, H. J., Park, T. S., Lee, S. I., Kim, Y. M., Rengaraj, D., Nagai, H., Sheng, G., Lim, J. M. and Han, J. Y.** (2013). Cleavage events and sperm dynamics in chick intrauterine embryos. *Public Library of Science One* **8**,.
- Lee, H. C., Choi, H. J., Lee, H. G., Lim, J. M., Ono, T. and Han, J. Y.** (2016). DAZL expression explains origin and central formation of primordial germ cells in chickens. *Stem Cells and Development* **25**, 68–79.
- Lee, J., Ma, J. and Lee, K.** (2019). Direct delivery of adenoviral CRISPR/Cas9 vector into the blastoderm for generation of targeted gene knockout in quail. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 13288–13292.
- Lee, J., Kim, D. H. and Lee, K.** (2020a). Muscle hyperplasia in Japanese quail by single amino acid deletion in MSTN propeptide. *International Journal of Molecular Science* **21**,.
- Lee, J., Kim, D. H. and Lee, K.** (2020b). Current approaches and applications in avian genome editing. *International Journal of Molecular Science* **21**,.

- Lejong, M., Choa-Duterre, M., Vanmuylder, N. and Louryan, S.** (2020). Is Vasa such a highly specific marker for primordial germ cells? A comparison of VASA and HSP90 proteins expression in young chicken embryos. *Morphologie* **104**, 20–26.
- Liptoi, K., Horvath, G., Gal, J., Varadi, E. and Barna, J.** (2013). Preliminary results of the application of gonadal tissue transfer in various chicken breeds in the poultry gene conservation. *Animal Reproduction Science* **141**, 86–89.
- Liptoi, K., Buda, K., Rohn, E., Drobnyak, A., Meleg, E. E., Palinkas-Bodzsar, N., Vegi, B. and Barna, J.** (2020). Improvement of the application of gonadal tissue allotransplantation in the in vitro conservation of chicken genetic lines. *Animal Reproduction Science* **213**,.
- Long, J. A.** (2006). Avian Semen Cryopreservation: What Are the Biological Challenges? *Poultry Science* **85**, 232–236.
- Lu, Y., West, F. D., Jordan, B. J., Mumaw, J. L., Jordan, E. T. and Gallegos-Cardenas, A.** (2012). Avian-induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells Development* **21**, 394–403.
- Lüders, J. and Stearns, T.** (2007). Microtubule-organizing centres: a re-evaluation. *Nature Review. Molecular Cell Biology* **8**, 161–167.
- Macdonald, J., Glover, J. D., Taylor, L., Sang, H. M. and McGrew, M. J.** (2010). Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *Public Library of Science One* **5**,.
- Macdonald, J., Taylor, L., Sherman, A., Kawakami, K., Takahashi, Y., Sang, H. M. and McGrew, M. J.** (2012). Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**,.
- Marcus, J. M., Burke, R. T., Desisto, J. A., Landesman, Y. and Orth, J. D.** (2015). Longitudinal tracking of single live cancer cells to understand cell cycle effects of the nuclear export inhibitor, selinexor. *Scientific Reports* **5**,.
- Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., et al.** (2023). Ensembl 2023. *Nucleic Acids Research* **51**, D933–D941.
- McGarry, T. J. and Kirschner, M. W.** (1998). Geminin, an Inhibitor of DNA Replication, Is Degraded during Mitosis. *Cell* **93**, 1043-1053.
- Méndez, C., Carrasco, E. and Pedernera, E.** (2005). Adenohypophysis regulates cell proliferation in the gonads of the developing chick embryo. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Comparative Experimental Biology* **303**, 179–185.
- Meyer, D. B.** (1960). Application of the Periodic Acid-Schiff Technique to Whole Chick Embryos. *Biotechnic and Histochemistry* **35**, 83–89.
- Meyer, D. B.** (1964). The Migration of Primordial Germ Cells in the Chick Embryo. *Developmental Biology* **10**, 156-190.
- Mizushima, S., Takagi, S., Ono, T., Atsumi, Y., Tsukada, A., Saito, N. and Shimada, K.** (2009). Phospholipase C $\zeta$  mRNA expression and its potency during spermatogenesis for

- activation of quail oocyte as a sperm factor. *Molecular Reproduction and Development* **76**, 1200–1207.
- Mizushima, S., Hiyama, G., Shiba, K., Inaba, K., Dohra, H., Ono, T., Shimada, K. and Sasanami, T.** (2014). The birth of quail chicks after intracytoplasmic sperm injection. *Development* **141**, 3799–3806.
- Mizushima, S.** (2017). Fertilization 2: Polyspermic Fertilization. In *Avian Reproduction From Behavior to Molecules* (ed. Sasanami, T.), pp. 105–125. Singapore: Springer Nature.
- Mokubedi, S. M., Phoku, J. Z., Changwa, R. N., Gbashi, S. and Njobeh, P. B.** (2019). Analysis of mycotoxins contamination in poultry feeds manufactured in selected provinces of South Africa using UHPLC-MS/MS. *Toxins* **11**,.
- Morris, S. A., Crim, J. W., Rodriguez, S., Cordoba, D. E., Esponda, P. and Bedford, J. M.** (1987). Specificity of Sperm-Binding Wolffian Duct Proteins in the Rooster and Their Persistence on Spermatozoa in the Female Host Glands. *Journal of Experimental Zoology* **242**, 189-198.
- Mozdziak, P. E., Wysocki, R., Angerman-Stewart, J., Pardue, S. L. and Petite, J. N.** (2006). Production of Chick Germline Chimeras from Fluorescence-Activated Cell-Sorted Gonocytes. *Poultry Science* **85**, 1764–1768.
- Nagai, H., Sezaki, M., Kakiguchi, K., Nakaya, Y., Lee, H. C., Ladher, R., Sasanami, T., Han, J. Y., Yonemura, S. and Sheng, G.** (2015). Cellular analysis of cleavage-stage chick embryos reveals hidden conservation in vertebrate early development. *Development* **142**, 1279–1286.
- Naito, M., Tajima, A., Tagami, T., Yasuda, Y. and Kuwana, T.** (1994). Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *Journal of Reproduction and Fertility* **102**, 321–325.
- Naito, M., Matsubara, Y., Harumi, T., Tagami, T., Kagami, H., Sakurai, M. and Kuwana, T.** (1999). Differentiation of donor primordial germ cells into functional gametes in the gonads of mixed-sex germline chimaeric chickens produced by transfer of primordial germ cells isolated from embryonic blood. *Anatomical Record* **117**, 291–298.
- Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Usui, F., Mushika, T., Ono, T., Setioko, A. R., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T.** (2007). Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poultry Science* **86**, 2182–2193.
- Nakamura, Y., Usui, F., Miyahara, D., Mori, T., Watanabe, H., Ono, T., Takeda, K., Nirasawa, K., Kagami, H. and Tagami, T.** (2011). Viability and Functionality of Primordial Germ Cells after Freeze-thaw in Chickens. *Journal of Poultry Science* **48**, 57–63.
- Nakamura, Y., Tasai, M., Takeda, K., Nirasawa, K. and Tagami, T.** (2013a). Production of Functional Gametes from Cryopreserved Primordial Germ Cells of the Japanese Quail. *Journal of Reproduction and Development* **59**, 580–587.
- Nakamura, Y., Kagami, H. and Tagami, T.** (2013b). Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells. *Development, Growth&Differentiation* **55**, 20–40.
- Nakamura, Y.** (2015). Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Development* **62**, 431–437.

- Nakanishi, A., Utsumi, K. and Iritani, A.** (1990). Early Nuclear Events of In Vitro Fertilization in the Domestic Fowl (*Gallus domesticus*). *Molecular Reproduction and Development* **26**, 217–221.
- Nandi, S., Whyte, J., Taylor, L., Sherman, A., Nair, V., Kaiser, P. and Mcgrew, M. J.** (2016). Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. *Poultry Science* **95**, 1905–1911.
- New, D. A. T.** (1956). The formation of sub-blastodermic fluid in hens' eggs. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **43**, 221–227.
- Nieuwkoop, P. D. and Sutasurya, L. A.** (1979). The migration of the primordial germ cells. In *Primordial germ cells in the chordates*, pp. 113–127. London: Cambridge University Press.
- Nishitani, H., Lygerou, Z., Nishimoto, T. and Nurse, P.** (2000). The Cdt1 protein is required to license DNA for replication in fission yeast. *Nature* **404**, 625–628.
- Nishitani, H., Lygerou, Z. and Nishimoto, T.** (2004). Proteolysis of DNA replication licensing factor Cdt1 in S-phase is performed independently of Geminin through its N-terminal region. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 30807–30816.
- Nishitani, H., Sugimoto, N., Roukos, V., Nakanishi, Y., Saijo, M., Obuse, C., Tsurimoto, T., Nakayama, K. I., Nakayama, K., Fujita, M., et al.** (2006). Two E3 ubiquitin ligases, SCF-Skp2 and DDB1-Cul4, target human Cdt1 for proteolysis. *EMBO Journal* **25**, 1126–1136.
- Nishiyama, H.** (1950). On the differences of the forms of phallus in the adult cock. In *Science Bulletin, Faculty of Agriculture.*, pp. 47–50. Kyushu.
- Nishiyama, H.** (1954). Studies on the reproductive physiology of the cock. V. The influence of androgen on the accessory organs of the phallus. In *Proceedings of the 10th World's Poultry Congress, Section A*, pp. 88–90.
- Ochieng, P. E., Scippo, M. L., Kemboi, D. C., Croubels, S., Okoth, S., Kang'ethe, E. K., Doupovec, B., Gathumbi, J. K., Lindahl, J. F. and Antonissen, G.** (2021). Mycotoxins in poultry feed and feed ingredients from sub-saharan africa and their impact on the production of broiler and layer chickens: A review. *Toxins* **13**,.
- Okorokov, A. L., Orlova, E. V., Kingsbury, S. R., Bagneris, C., Gohlke, U., Williams, G. H. and Stoeber, K.** (2004). Molecular structure of human geminin. *Nature Structural & Molecular Biology* **11**, 1021–1022.
- Olsen, M. W. and Neher, B. H.** (1948). The site of fertilization in the domestic fowl. *Journal of Experimental Zoology* **109**, 355–366.
- Olsen, L. C., Aasland, R. and Fjose, A.** (1997). A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mechanisms of Development* **66**, 95–105.
- Ono, T. and Machida, Y.** (1999). Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A* **122**, 255–259.
- Pain, B., Clark, M. E., Shen, M., Nakazawa, H., Sakurai, M., Samarut, J. and Etches, R. J.** (1996). Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* **122**, 2339–2348.



- Park, H. J., Park, T. S., Kim, T. M., Kim, J. N., Shin, S. S., Lim, J. M. and Han, J. Y.** (2006). Establishment of an in vitro culture system for chicken preblastodermal cells. *Molecular Reproduction and Development* **73**, 452–461.
- Park, T. S., Park, J., Lee, J. H., Park, J. W. and Park, B. C.** (2019). Disruption of G0/G1 switch gene 2 (G0S2) reduced abdominal fat deposition and altered fatty acid composition in chicken. *Federation of American Societies for Experimental Biology Journal* **33**, 1188–1198.
- Patakiné Várkonyi, E., Gócsa, E. and Lázár, B.** (2017). Génmegőrzés embrionális sejtek segítségével. In *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében* (ed. Szalay, I.), p. 214. Budapest: Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó.
- Patterson, J. T.** (1910). Studies on the early development of the hen's egg. I History of the early cleavage and of the accessory cleavage. *Journal of Morphology* **21**, 101–134.
- Péczely, P.** (2013). *Madár szaporodásbiológia*. Budapest: Agroinform Kiadó.
- Pei, W. and Burgess, S. M.** (2019). Microinjection in zebrafish for genome editing and functional studies. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 459–474. Humana Press Inc.
- Petitte, J. N., Clark, M. E., Liu, G., Verrinder Gibbins, A. M. and Etches, R. J.** (1990). Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* **108**, 185–189.
- Petitte, J. N.** (2006). Avian germplasm preservation: Embryonic stem cells or primordial germ cells? In *Poultry Science*, pp. 237–242. Poultry Science Association.
- Petitte, J. N. and Mozdziak, P. E.** (2014). Production of Transgenic Poultry. In *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook: Third Edition*, pp. 335–357. Elsevier Inc.
- Pfeiffer, J., Tarbashevich, K., Bandemer, J., Palm, T. and Raz, E.** (2018). Rapid progression through the cell cycle ensures efficient migration of primordial germ cells – The role of Hsp90. *Developmental Biology* **436**, 84–93.
- Pokorná, M. and Kratochvíl, L.** (2009). Phylogeny of sex-determining mechanisms in squamate reptiles: are sex chromosomes an evolutionary trap? *Zoological Journal of the Linnean Society* **156**, 168–183.
- Pollock, C. G. and Orosz, S. E.** (2002). Avian reproductive anatomy, physiology and endocrinology. *The Veterinary Clinics: Exotic Animal Practice* **5**, 441–474.
- Poon, J., Wessel, G. M. and Yajima, M.** (2016). An unregulated regulator: Vasa expression in the development of somatic cells and in tumorigenesis. *Developmental Biology* **415**, 24–32.
- Potten, C. S. and Morris, R. J.** (1988). Epithelial stem cells in vivo. *Journal of Cell Science Supplement* **10**, 45–62.
- Prasedya, E. S., Miyake, M., Kobayashi, D. and Hazama, A.** (2016). Carrageenan delays cell cycle progression in human cancer cells in vitro demonstrated by FUCCI imaging. *BMC Complementary and Alternative Medicine* **16**,.
- Reynaud, G.** (1969). Transfert de cellules germinates primordiales de dindon a l'embryon de poulet par injection intravasculaire. *Journal of Embryology and Experimental Morphology* **21**, 485–507.

- Reynaud, G.** (1976). Capacites reproductrices et descendance de Poulets ayant subi un transfer de cellules germinales primordiales durant la vie embryonnaire. *Wilhelm Roux's Archives of Developmental Biology* **179**, 85–110.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. and Mesirov, J. P.** (2011). Integrative genomics viewer. *Nature Biotechnology* **29**, 24–26.
- Rosenquist, G. C.** (1966). A radioautographic study of labeled grafts in the chick blastoderm: Development from primitive-streak stages to stage 12. *Contributions to Embryology* **38**, 31–110.
- Rosenquist, G. C.** (1972). Endoderm Movements in the Chick Embryo between the Early Short Streak and Head Process Stages. *Journal of Experimental Zoology* **180**, 95–104.
- Rosenstein, Y. and Lafarge-Frayssinet, C.** (1983). Inhibitory Effect of Fusarium T2-Toxin on Lymphoid DNA and Protein Synthesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* **70**, 283–288.
- Ruggiu, M., Speed, R., Taggart, M., McKay, S. J., Kilanowski, F., Saunders, P., Dorin, J. and Cooke, H. J.** (1997). The mouse Dazl gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* **389**, 73–77.
- Sakaue-Sawano, A., Kurokawa, H., Morimura, T., Hanyu, A., Hama, H., Osawa, H., Kashiwagi, S., Fukami, K., Miyata, T., Miyoshi, H., et al.** (2008). Visualizing Spatiotemporal Dynamics of Multicellular Cell-Cycle Progression. *Cell* **132**, 487–498.
- Sakaue-Sawano, A., Kobayashi, T., Ohtawa, K. and Miyawaki, A.** (2011). Drug-induced cell cycle modulation leading to cell-cycle arrest, nuclear mis-segregation, or endoreplication. *BMC Cell Biology* **12**,.
- Sasanami, T., Matsuzaki, M., Mizushima, S. and Hiyama, G.** (2013). Sperm Storage in the Female Reproductive Tract in Birds. *Journal of Reproduction and Development* **59**, 334–338.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods* **9**, 676–682.
- Schindler, H., Ben-David, E., Hurwitz, S. and Kempenich, O.** (1967). The Relation of Spermatozoa to the Glandular Tissue in the Storage Sites of the Hen Oviduct. *Poultry Science* **46**, 1462–1471.
- Schoenwolf, G. C.** (1991). Cell movements in the epiblast during gastrulation and neurulation in avian embryos. In *Gastrulation: Movements, Patterns, and Molecules* (ed. Keller, R.), Clark Jr., W. H.), and Griffin, F.), pp. 1–28. New York: Plenum.
- Setioko, A. R., Tagami, T., Tase, H., Nakamura, Y., Takeda, K. and Nirasawa, K.** (2007). Cryopreservation of premordial germ cells (PGCs) from White Leghorn embryos using commercial cryoprotectants. *Journal of Poultry Science* **73**-77.
- Sheridan, C.** (2016). FDA approves ‘farmaceutical’ drug from transgenic chickens. *Nature Biotechnology* **34**, 117–119.
- Simon, D.** (1957). La localisation primaire des cellules germinales de l’embryon de poulet: preuves experimentales. *Comptes rendus des séances de la Société de biologie* **151**, 1010–1012.

- Smith, C. A., Roeszler, K. N., Bowles, J., Koopman, P. and Sinclair, A. H.** (2008). Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid. *BMC Developmental Biology* **8**.
- Stebler, J., Spieler, D., Slanchev, K., Molyneaux, K. A., Richter, U., Cojocar, V., Tarabykin, V., Wylie, C., Kessel, M. and Raz, E.** (2004). Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: The role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Developmental Biology* **272**, 351–361.
- Stefos, K. and Arrighi, F. E.** (1971). Heterochromatic nature of W chromosomes in birds. *Experimental Cell Research* **68**, 228–231.
- Stern, C. D.** (2004). *Gastrulation: From Cells to Embryo*. (ed. Stern, C. D.) London: Cold Springs Harbour Laboratory .
- Sugiyama, M., Sakaue-Sawano, A., Iimura, T., Fukami, K., Kitaguchi, T., Kawakami, K., Okamoto, H., Higashijima, S.-I. and Miyawaki, A.** (2009). Illuminating cell-cycle progression in the developing zebrafish embryo. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**.
- Swartz, W. J.** (1982). Acid and Alkaline Phosphatase Activity in Migrating Primordial Germ Cells of the Early Chick Embryo. *Anatomical Record* **202**, 379–385.
- Swift, C. H.** (1914). Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick. *American Journal of Anatomy* **15**, 483–516.
- Swift, C. H.** (1915). Origin of the definitive sex-cells in the female chick and their relation to the primordial germ-cells. *American Journal of Anatomy* **18**, 441–470.
- Swift, C. H.** (1916). Origin of the sex-cords and definitive spermatogonia in the male chick. *American Journal of Anatomy* **20**, 375–410.
- Szalay, I.** (2015). Régi magyar baromfifajták a XXI. században (Old Hungarian Poultry in the 21th century). Budapest: Mezőgazda Kiadó.
- Tachinante, F.** (1974). Sur les échanges interspeci- fiques de cellules germinales entre le poulet et la caille, en culture organotypique et en greffes coelomiques. *Comptes Rendus de l'Academie des Sciences* **278**, 1895–1898.
- Tada, S.** (2007). Cdt1 and geminin: role during cell cycle progression and DNA damage in higher eukaryotes. *Frontiers in Bioscience* **1**, 1629–1641.
- Tae, S. P., Kim, M. A., Jeong, M. L. and Jae, Y. H.** (2008). Production of quail (*Coturnix japonica*) germline chimeras derived from in vitro-cultured gonadal primordial germ cells. *Molecular Reproduction and Development* **75**, 274–281.
- Tagami, T., Kagami, H., Matsubara, Y., Harumi, T., Naito, M., Takeda, K., Hanada, H. and Nirasawa, K.** (2007). Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*gallus gallus domesticus*). *Molecular Reproduction and Development* **74**, 68–75.
- Tagami, T., Miyahara, D. and Nakamura, Y.** (2017). Avian primordial germ cells. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 1–18. Springer New York LLC.

- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y. and Kuwana, T.** (1998). Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *Journal of Experimental Zoology*.
- Tajima, A., Hayashi, H., Kamizumi, A., Ogura, J., Kuwana, T. and Chikamune, T.** (1999). Study on the Concentration of Circulating Primordial Germ Cells (cPGCs) in Early Chick Embryos. *Journal of Experimental Zoology* **284**, 759–764.
- Takagi, S., Ono, T., Tsukada, A., Atsumi, Y., Mizushima, ‡ S, Saito, N. and Shimada, K.** (2007). Fertilization and Blastoderm Development of Quail Oocytes After Intracytoplasmic Injection of Chicken Sperm Bearing the W Chromosome. *Poultry Science* **86**, 937–943.
- Tam, P. P. L. and Zhou, S. X.** (1996). The allocation of epiblast cells to ectodermal and germ-line lineages is influenced by the position of the cells in the gastrulating mouse embryo. *Developmental Biology* **178**, 124–132.
- Tanaka, K., Wada, T., Koga, O., Nishio, Y., Hertelendy, F. and Louis, S.** (1994). Chick production by in vitro fertilization of the fowl ovum. *Journal of Reproduction and Fertility* **100**, 447–449.
- Tiambo, C. K., Kibui, P. W., Kamidi, C., Muteti, C., Hu, T., Kemp, S. and Mcgrew, M.** (2021). Laboratory training manual on biobanking and recovery of indigenous poultry genetic resources by cryopreservation of primordial germ cells (PGCs). in *ILRI Manual*, Nairobi, Kenya.
- Tonus, C., Connan, D., Waroux, O., Vandenhove, B., Wayet, J., Gillet, L., Desmecht, D., Antoine, N., Ectors, F. J. and Grobet, L.** (2017). Cryopreservation of chicken primordial germ cells by vitrification and slow freezing: A comparative study. *Theriogenology* **88**, 197–206.
- Tóth, R., Szabadi, N. T., Lázár, B., Buda, K., Végi, B., Barna, J., Várkonyi, E. P., Liptói, K., Pain, B. and Góczy, E.** (2021). Effect of post-hatch heat-treatment in heat-stressed transylvanian naked neck chicken. *Animals* **11**,
- Trefil, P., Aumann, D., Koslová, A., Mucksová, J., Benešová, B., Kalina, J., Wurmser, C., Fries, R., Elleder, D., Schusser, B., et al.** (2017). Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: A new way towards efficient transgenesis in chicken. *Scientific Reports* **7**,
- Tsunekawa, N., Naito, M., Sakai, Y., Nishida, T. and Noce, T.** (2000). Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* **127**, 2741–2750.
- Tyack, S. G., Jenkins, K. A., O’Neil, T. E., Wise, T. G., Morris, K. R., Bruce, M. P., McLeod, S., Wade, A. J., McKay, J., Moore, R. J., et al.** (2013). A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Research* **22**, 1257–1264.
- Uchida, I. A. and Freeman, V. C. P.** (1985). Triploidy and chromosomes. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* **151**, 65–69.
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A. and Memili, E.** (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Frontiers of Veterinary Science* **6**,

- Urven, L. E., Erickson, C. A., Abbott, U. K. and McCarrey, J. R.** (1988). Analysis of germ line development in the chick embryo using an anti-mouse EC cell antibody. *Development* **103**, 299–304.
- Urven, L. E., Abbott, U. K. and Erickson, C. A.** (1989). Distribution of Extracellular Matrix in the Migratory Pathway of Avian Primordial Germ Cells. *Anatomical Record* **224**, 14–21.
- Vasimuddin, M. D., Misra, S., Li, H. and Aluru, S.** (2019). Efficient architecture-aware acceleration of BWA-MEM for multicore systems. In *Proceedings - 2019 IEEE 33rd International Parallel and Distributed Processing Symposium, IPDPS 2019*, pp. 314–324. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.
- Venkatarama, T., Lai, F., Luo, X., Zhou, K., Newman, K. and Lou King, M.** (2010). Repression of zygotic gene expression in the *Xenopus* germline. *Development* **137**, 651–660.
- Véron, N., Qu, Z., Kipen, P. A. S., Hirst, C. E. and Marcelle, C.** (2015). CRISPR mediated somatic cell genome engineering in the chicken. *Developmental Biology* **407**, 68–74.
- Waddington, D., Gribbin, C. and Sterling, R. J.** (1998). Chronology of events in the first cell cycle of the polyspermic egg of the domestic fowl (*Gallus domesticus*). *International Journal of Developmental Biology* **42**, 625–628.
- Waldeyer, W.** (1870). Eirstock und Ei. Eine Beitrag zur Anatomie und Entwicklungsgeschichte der Sexualorgane. Leipzig: W. Engelmann.
- Wang, L., Chen, M. J., Chen, D. Y., Peng, S. F., Zhou, X. L., Liao, Y. Y., Yang, X. G., Xu, H. Y., Lu, S. S., Zhang, M., et al.** (2017). Derivation and characterization of primordial germ cells from Guangxi yellow-feather chickens. *Poultry Science* **96**, 1419–1425.
- Warren, D. C. and Scott, H. M.** (1935). The Time Factor in Egg Formation. *Poultry Science* **XIV**, 195–207.
- Watt, F. M.** (1998). Epidermal stem cells: markers, patterning and the control of stem cell fate. *Philosophical Transactions of the Royal Society B, Biological Science* 831–837.
- Weidinger, G., Rg Stebler, J., Slanchev, K., Dumstrei, K., Wise, C., Lovell-Badge, R., Thisse, C., Thisse, B. and Raz, E.** (2003). dead end, a Novel Vertebrate Germ Plasm Component, Is Required for Zebrafish Primordial Germ Cell Migration and Survival Results and Discussion Zebrafish dead end RNA Is a Component of the Germ Plasm and Is Specifically Expressed in Primordial Germ Cells. *Current Biology* **13**, 1429–1434.
- Wentworth, B. C., Tsai, H., Hallett, J. H., Gonzales, D. S. and Rajcic-Spasojevic, G.** (1989). Manipulation of Avian Primordial Germ Cells and Gonadal Differentiation. *Poultry Science* **68**, 999–1010.
- Whyte, J., Glover, J. D., Woodcock, M., Brzeczczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P. and McGrew, M. J.** (2015). FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports* **5**, 1171–1182.
- Willier, B. H.** (1937). Experimentally produced sterile gonads and the problem of the origin of germ cells in the chick embryo. *Anatomical Record* **70**, 89–112.
- Witschi, E.** (1961). Sex and secondary sexual characters. In *Biology and comparative physiology* (ed. Marshal, A.), pp. 115–168. New York: Academic Press.

- Wolpert, L., Tickle, C., Lawrence, P., Meyerowitz, E., Robertson, E., Smith, J. and Jessell, T.** (2010). *Principles of Development*. 4th Edition. Oxford University Press.
- Woodcock, M. E., Gheyas, A. A., Mason, A. S., Nandi, S., Taylor, L., Sherman, A., Smith, J., Burt, D. W., Hawken, R. and McGrew, M. J.** (2019). Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **116**, 20930–20937.
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J. and Yeste, M.** (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Animal Reproduction Science* **246**,.
- Yang, G. and Fujihara, N.** (1999). Long-Term Proliferation of Chicken Primordial Germ Cells Cultured In Vitro. *Journal of Reproduction and Development* **45**.
- Yano, S., Tazawa, H., Hashimoto, Y., Shirakawa, Y., Kuroda, S., Nishizaki, M., Kishimoto, H., Uno, F., Nagasaka, T., Urata, Y., et al.** (2013). A genetically engineered oncolytic adenovirus decoys and lethally traps quiescent cancer stem-like cells in S/G2/M phases. *Clinical Cancer Research* **19**, 6495–6505.
- Yano, S., Zhang, Y., Miwa, S., Tome, Y., Hiroshima, Y., Uehara, F., Yamamoto, M., Suetsugu, A., Kishimoto, H., Tazawa, H., et al.** (2014a). Spatial-temporal FUCCI imaging of each cell in a tumor demonstrates locational dependence of cell cycle dynamics and chemoresponsiveness. *Cell Cycle* **13**, 2110–2119.
- Yano, S., Zhang, Y., Zhao, M., Hiroshima, Y., Miwa, S., Uehara, F., Kishimoto, H., Tazawa, H., Bouvet, M., Fujiwara, T., et al.** (2014b). Tumor-targeting salmonella typhimurium A1-R decoys quiescent cancer cells to cycle as visualized by FUCCI imaging and become sensitive to chemotherapy. *Cell Cycle* **13**, 3958–3963.
- Yano, S., Takehara, K., Zhao, M., Tan, Y., Han, Q., Li, S., Bouvet, M., Fujiwara, T. and Hoffman, R. M.** (2016). Tumor-specific cell-cycle decoy by Salmonella typhimurium A1-R combined with tumor-selective cell-cycle trap by methioninase overcome tumor intrinsic chemoresistance as visualized by FUCCI imaging. *Cell Cycle* **15**, 1715–1723.
- Yano, S., Takehara, K., Tazawa, H., Kishimoto, H., Urata, Y., Kagawa, S., Fujiwara, T., Hoffman, R. M. and Fujiwara, T.** (2017). Cell-cycle-dependent drug-resistant quiescent cancer cells induce tumor angiogenesis after chemotherapy as visualized by real-time FUCCI imaging. *Cell Cycle* **16**, 406–414.
- Yasuda, Y., Tajima, A., Fujimoto, T. and Kuwana, T.** (1992). A method to obtain avian germ-line chimaeras using isolated primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Fertility* **96**, 521–528.
- Yazar, S. and Omurtag, G. Z.** (2008). Fumonisin, trichothecenes and zearalenone in cereals. *International Journal of Molecular Science* **9**, 2062–2090.
- Youngren, K. K., Coveney, D., Peng, X., Bhattacharya, C., Schmidt, L. S., Nickerson, M. L., Lamb, B. T., Deng, J. M., Behringer, R. R., Capel, B., et al.** (2005). The Ter mutation in the dead end gene causes germ cell loss and testicular germ cell tumours. *Nature* **435**, 360–364.
- Zhao, D. F. and Kuwana, T.** (2003). Purification of avian circulating primordial germ cells by Nycodenz density gradient centrifugation. *British Poultry Science* **44**, 30–35.

**Zielke, N., Korzelius, J., van Straaten, M., Bender, K., Schuhknecht, G. F. P., Dutta, D., Xiang, J. and Edgar, B. A.** (2014). Fly-FUCCI: A Versatile Tool for Studying Cell Proliferation in Complex Tissues. *Cell Reports* **7**, 588–598.

**Zielke, N. and Edgar, B. A.** (2015). FUCCI sensors: Powerful new tools for analysis of cell proliferation. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology* **4**, 469–487.

## IX. TOVÁBBI MELLÉKLETEK

### 1. M1 – Házityúk ősvarsejtek tenyésztőmédiumának pontos összetétele

Komponens	Mennyiség 50 ml médiumhoz
DMEM (Gibco, Cat No. 21068-028)	34,8 ml
Steril víz (Gibco, 15230-089)	10,7 ml
Pyruvate (100x, Gibco 11360039)	664,5 µl
MEM Vitamin Solution (100x, Gibco, 11120052)	464,5 µl
MEM Amino acids (Sigma, M5550)	464,5 µl
B27 suplement (50x, Gibco, 17504044)	1,0 ml
Glutamax (100x, Gibco, 35050038)	0,5 ml
NEAA (100x, Gibco, 11140035)	0,5 ml
Nucleosides (100x, EmbryoMax, ES-008-D)	0,5 ml
B-mercaptoethanol (50 mM, Gibco, 31350010)	0,1 ml
CaCl <sub>2</sub> (100mM, Sigma, C4901-100G)	0,075 ml
Ovalbumin (20%, Sigma, A5503)	0,5 ml
Heparin (50mg/ml, Sigma, H3149)	0,1 ml
Pen/Strep (100x, Gibco, 15070-063)	0,1 ml
Házityúk szérum (0.2% végkoncentráció, Sigma, C5405)	100 µl
h-ActivinA (25ug/ml, Invitrogen, PHC9564)	50 µl
h-FGF2 (10 ng/ul, Gibco, 13256-029)	20 µl
Ovotransferin (10mg/ml, Sigma, C7786)	25 µl

### 2. M2 – PCR és qPCR paraméterek

#### PCR

Primer megnevezése	Referencia szám	Szekvencia	PCR termék hossza (bp)	Forrás
CHD1-Z	NC_006127.4	FW TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT	461	Wang et al., 2017.
		RV CCTTTT ATTGATCCATCAAGCCT		
CHD1-W	NC_006126.4	FW TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT	322	
		RV CCTTTT ATTGATCCATCAAGCCT		



Reakció	Paraméterek		
	Hőmérséklet	Idő	Ismétlés
<i>CHDI sex PCR</i>	95 °C	1 perc	1x
	95 °C	15 mp	} 28x
	48 °C	30 mp	
	72 °C	10 mp	
	72 °C	5 perc	1x

## qPCR

Gén	Gén teljes neve (szervezet)	NCBI azonosító	Primerek	PCR termék (bp)
<i>cGAPDH</i>	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ( <i>Gallus gallus</i> )	NM_204305.1	FW GACGTGCAGCAGGAACACTA	112
			RV CTTGGACTTTGCCAGAGAGG	
<i>DAZL</i>	Deleted in azoospermia-like ( <i>Gallus gallus</i> )	NM_204218.1	FW TTGTCTTGAAGGCCTCGTTT	136
			RV ATCCTTGGCAGGTTGTTGAC	
<i>CVH</i>	DEAD-box helicase 4 ( <i>DDX4</i> )( <i>Gallus gallus</i> )	NM_204708.1	FW GAACCTACCATCCACCAGCA	113
			RV ATGCTACCGAAGTTGCCACA	

Reakció	Paraméterek		
	Hőmérséklet	Idő	Ismétlés
<i>cDNS írás</i>	25 °C	10 perc	1x
	37 °C	120 perc	1x
	85 °C	5 perc	1x
<i>qPCR futtatás</i>	95 °C	10 perc	1x
	95 °C	15 mp	} 40x
	60 °C	40 mp	
	68 °C	20 mp	
	95 °C	15 mp	1x
	48 °C	15 mp	1x
	95 °C	15 mp	1x

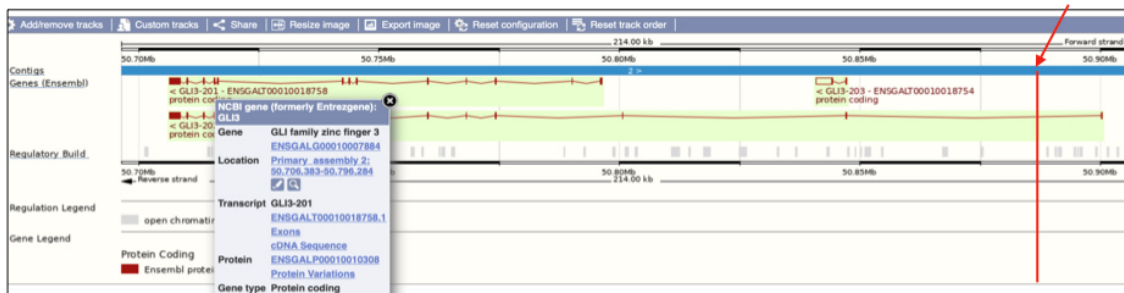
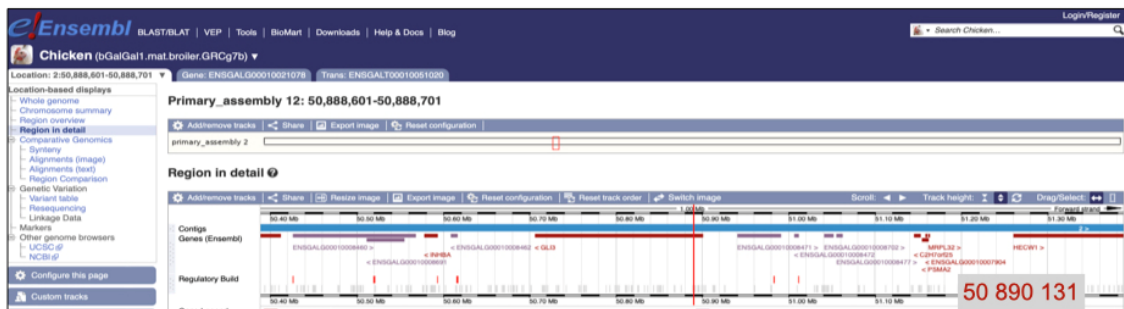
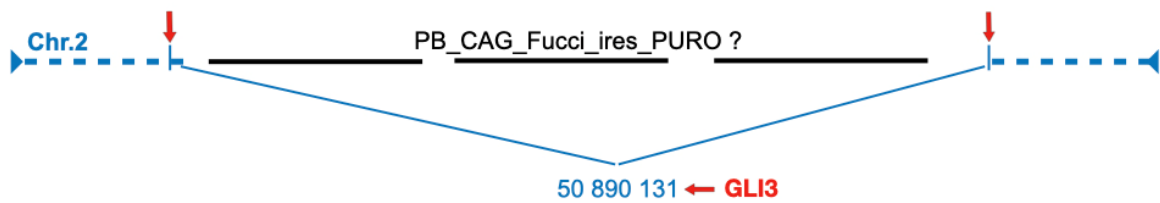
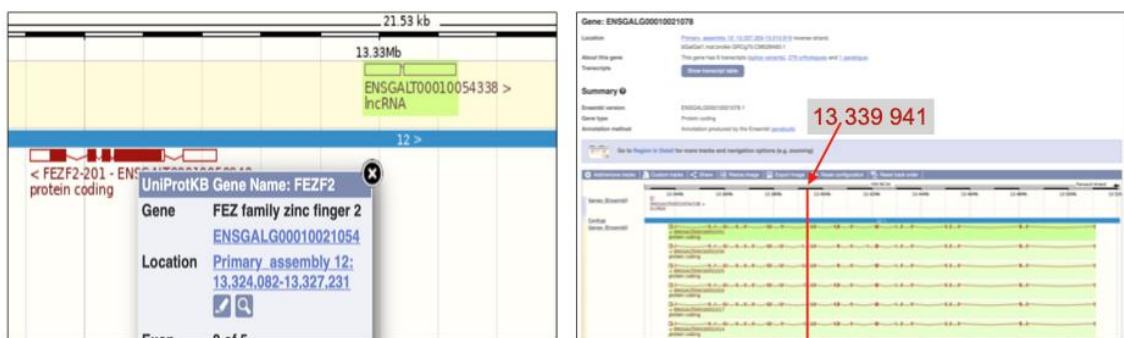
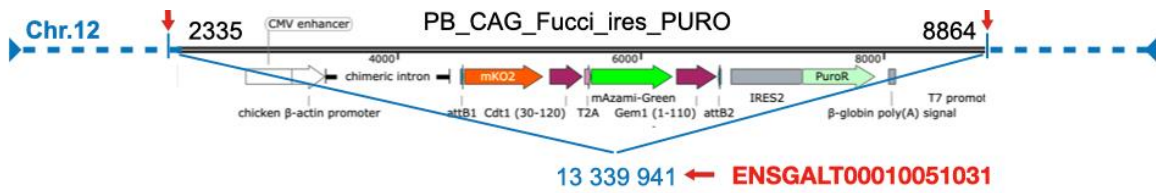
### 3. M3 - Immunhisztokémiai festés pontos protokollja és reagensai

	Festés lépései	Oldat	Inkubálási idő	Inkubálási hőmérséklet	Megjegyzés
1	Ősivarsejt pellet szuszpendálása	0,1% BSA-PBS		szobahőmérséklet	
2	Fixálás	4% PFA	10 min	szobahőmérséklet	
3	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	
4	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	
5	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	
6	Permeabilizálás, blokkolás	Blokkoló oldat	45 min	szobahőmérséklet	
7	Elsődleges ellenanyag	1st Ab 0,1% BSA-PBS-ben	1 éjszaka	4°C	
8	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	
9	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	
10	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	
11	Másodlagos ellenanyag	2st Ab 0,1% BSA-PBS-ben	60 min	37°C	sötétben
12	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	sötétben
13	Magfestés	TO-PRO™-3 Iodide 0,01% BSA-PBS-ben	15 min	szobahőmérséklet	sötétben
14	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	sötétben
15	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	sötétben
16	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 min	szobahőmérséklet	sötétben
17	Lefedő oldat	ProLong® Gold Antifade beágyazó médium		szobahőmérséklet	sötétben
18	Lefedés, tárolás			4°C	sötétben

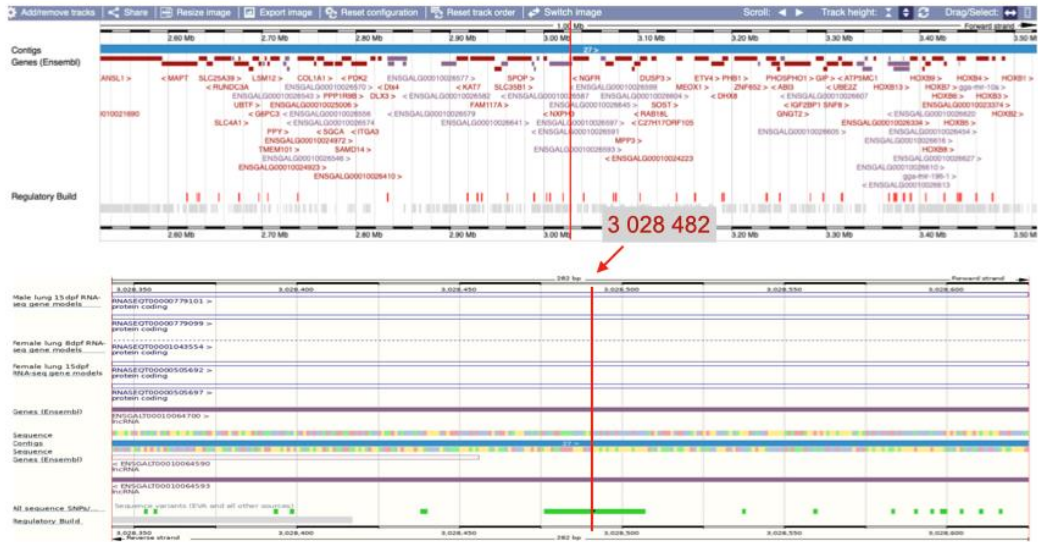
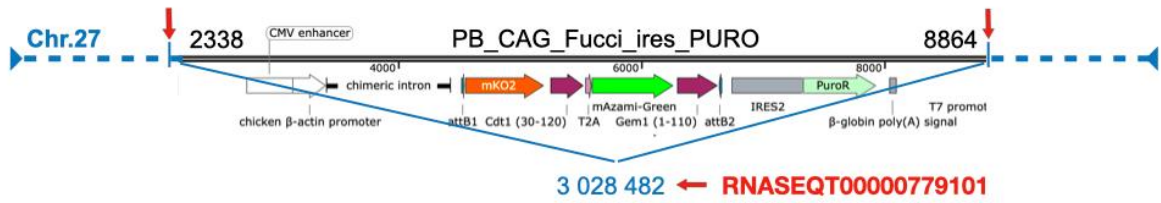
Anyag	Referencia szám	Hígítás	Típus	Specifitás
anit-CVH	B. Pain (INSERM)	1:100	nyúl IgG	ősivarsejt
anti-SSEA-1	ab16285, MC480	1:100	egér IgM	őssejt (nyúl, egér, házityúk)
Donkey anti-rabbit IgG (H+L) - Alexa Fluor 555	A-31572	1:500	szamár IgG	anti-rabbit IgG
Donkey anti-Mouse IgM (μ) - Alexa Fluor 488	715-485-140	1:400	szamár IgG	anti-mouse IgM
TO-PRO™-3 Iodide (642/661)	T3605	1:500 (1 μM)		
szamár szérum (DS)	017-000-121	6 g / 100 ml		
ProLong® Diamond Antifade beágyazó médium	P36962	10 μl		

#### 4. M4 – Szekvenálási kiegészítő adatok

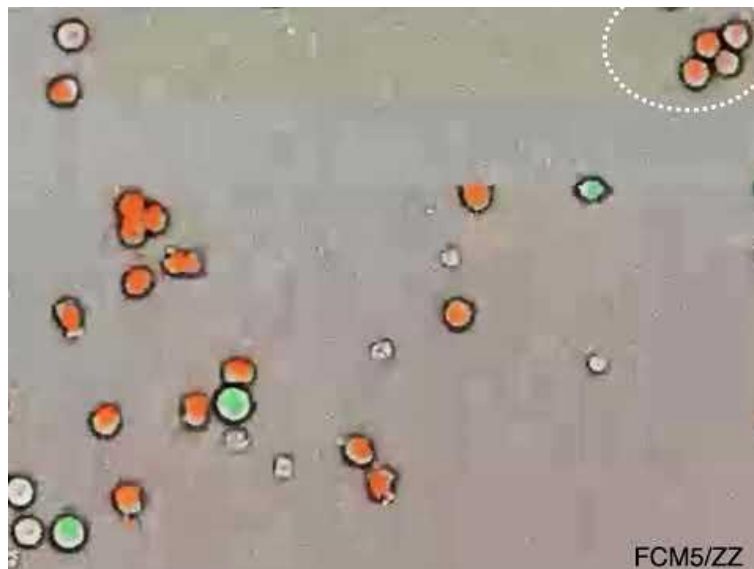
##### FCM5 PGC vonal



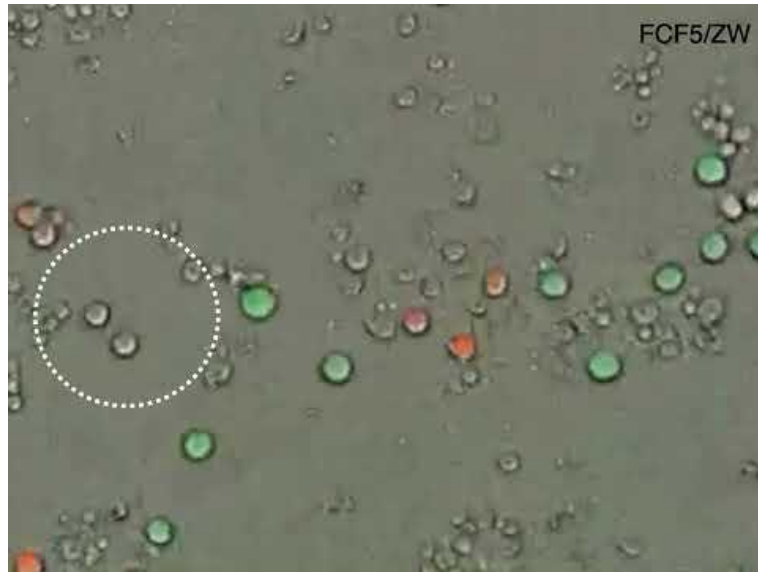
## FCF5 PGC vonal



### 5. M5 – Linkek a sejtvonalakról készült timelapse videókhoz



FCM5: <https://youtu.be/IZCo2GtR2WU>



FCF5: <https://www.youtube.com/watch?v=e1Y-gMNxZM8>

## X. FONTOSABB PUBLIKÁCIÓK

### Az értekezés témakörében megjelent impaktfaktoros szakcikkek:

- Bence Lázár, Nikolett Tokodyné Szabadi, Mahek Anand, Roland Tóth, **András Ecker**, Martin Urbán, Maria Teresa Salinas Aponte, Ganna Stepanova, Zoltán Hegyi, László Homolya, Eszter Patakiné Várkonyi, Bertrand Pain, Elen Gócza: Effect of miR-302b MicroRNA Inhibition on Chicken Primordial Germ Cell Proliferation and Apoptosis Rate. 2022, *GENES*, 13(1), 82, **IF: 3,5**, doi: 10.3390/genes13010082. **Q2**
- **András Ecker**, Bence Lázár, Roland Imre Tóth, Martin Urbán, Nikolett Tokodyné Szabadi, Maria Teresa Salinas Aponte, Mohd Adnan, Eszter Várkonyi, Elen Gócza: The Effects of Freezing Media on the Characteristics of Male and Female Chicken Primordial Germ Cell Lines. 2023, *LIFE*, 13, 867. **IF: 3,2**, doi: 10.3390/life13040867. **Q1**
- Pouneh Maraghechi, Maria Teresa Salinas Aponte, **András Ecker**, Bence Lázár, Roland Tóth, Nikolett Tokodyné Szabadi, Elen Gócza: Pluripotency-Associated microRNAs in Early Vertebrate Embryos and Stem Cells. 2023, *GENES*, 14(7), 1434. **IF: 3,5**, doi: 10.3390/genes14071434. **Q2**
- Tokodyné Szabadi Nikolett, Tóth Roland, Lázár Bence, **Ecker András**, Urbán Martin, Várkonyi Eszter, Liptói Krisztina, Gócza Elen: Hőkonkondicionálás hatására létrejövő molekuláris változások vizsgálata a házityúk agyszövetében. 2024, *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA*, 146. **IF: 0,1**, doi: 10.56385/magyallorv.2024.02.67-75. **Q4**
- **András Ecker**, Bence Lázár, Roland I. Tóth, Martin Urbán, Orsolya I. Hoffmann, Zsófia Fekete, Endre Barta, Ferenc Uher, Zsolt Matula, Eszter Várkonyi, Elen Gócza: Creating a novel method for chicken primordial germ cell health monitoring using the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator reporter system. 2024, *POULTRY SCIENCE*, 103:104144, **IF: 3,8**, doi: 10.1016/j.psj.2024.104144. **D1**

### Az értekezés témakörében megjelent nem impaktfaktoros tudományos cikkek:

- **Ecker András**, Lázár Bence, Tóth Roland, Várkonyi Eszter, Gócza Elen: Embrionális gonádból származó sejtszuspenziók beépülésének vizsgálata magyar parlagi gyöngytyúkban. 2022, *ANIMAL WELFARE, ETHOLOGY AND HOUSING SYSTEMS*, 19(1). doi: 10.17205/SZIE.AWETH.2023.1.018
- Lázár Bence, Tokodyné Szabadi Nikolett, Tóth Roland, **Ecker András**, Urbán Martin, Várkonyi Eszter, Liptói Krisztina, Gócza Elen: A napos kori hőkezelés

transzgenerációs hatásainak vizsgálata házityúkban. 2023, *ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS TAKARMÁNYOZÁS*, 72(3). 220-230.

**Az értekezés témakörében megjelent nem impaktfaktoros ismeretterjesztő cikkek:**

- **Ecker András**, Lázár Bence, Tóth Roland, Patakiné Várkonyi Eszter, Gócza Elen: A génmegőrzés jelentősége a baromfitenyésztésben. 2022, Magyar Mezőgazdaság, 6. szám, 2022.02.09.
- **Ecker András**, Lázár Bence, Várkonyi Eszter, Gócza Elen: Mi volt előbb: a tyúk vagy a CRISPR/Cas9? 2024, Baromfiágazat, 24. évfolyam, 2024/3.

## XI. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani konzulenseimnek, Dr. Gócza Elennek és Dr. Várkonyi Eszternek, amiért segítettek ezen dolgozat létrejöttét. Elen a szomszéd irodából mindig szemmel tartotta, egyengette munkámat a kiszámíthatatlan kísérletek és a száraz irodalmazás során egyaránt, valamint sose engedte, hogy túlzottan hátradőljek. Nagyrészt ennek köszönhető, hogy ez a dolgozat viszonylag gyorsan elkészült. Eszternek szintén köszönöm, hogy kicsit távolabbról ugyan, de rajtam tartotta a szemét, motivált, a sarkamra lépett, ha kellett (és néha kellett...), valamint mindig új ötletekkel állt elő és elsőként reagált az általam küldött aktuális munkákra. Azt is nagyon köszönöm neki, hogy szerteágazó feladataim között mindig segített fókuszálni a figyelmemet azokra a munkákra, amik a tanulmányaimhoz szükségesek voltak.

Szeretnék köszönetet mondani Dr. Uher Ferencnek és Dr. Matula Zsoltnak (Dél-Pesti Centrum Kórház, Kísérletes Sejterápiás Részleg), valamint Dr. Homolya Lászlónak (HUN-REN TTK, Molekuláris Sejtbiológiai Kutatócsoport) és Dr. Hegyi Zoltánnak (Bio-Science Kft.), amiért rendelkezésemre bocsájtották az ImageXpress gépeket és segítettek azok használatában. Köszönöm Dr. Nagy Andrásnak (Lunenfeld-Tanenbaum Research Institute), hogy megajándékozott a FUCCI transzgenéllal. Köszönöm továbbá Dr. Barta Endrének (Debreceni Egyetem, Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet) és Fekete Zsófiának (Department of Environmental and Biological Sciences, University of Eastern Finland) a DNS szekvenálásban és bioinformatikában nyújtott segítségüket, valamint Dr. Hoffmann Orsolyának (MATE, GBI) a transzgenézisnél szolgáltatott tanácsait.

Ezúton köszönöm a segítséget a MATE GBI és az NBGK HGI munkatársainak, kiemelve Dr. Lázár Bencét és Dr. Tóth Rolandot. Mindketten rendeteg energiát fektettek abba, hogy elsajátíthassam mindazt, amit ma már önállóan el tudok végezni a laborban és annak környékén, valamint tapasztalataikkal segítettek átvészelni a kutatói munka és adminisztráció nehezebb szakaszait. Bencének külön köszönet azért, hogy rendelkezésemre bocsájtotta a disszertációját, ami rengetegszer segített ihletet szerezni és túllendülni a holtponatokon. Köszönet csoportom további tagjainak, köztük Urbán Martinnak és Tóth Arnoldnak, akik velem párhuzamosan tapasztalták meg a doktorandusz lét szépségeit és árnyoldalait. Köszönet Egedi Sándornak a lebonyolított rendelésekért és a konferencia kiutazások megoldásáért.

Köszönöm az emberfeletti munkát az általam idézett szerzőknek.

Végül köszönöm a megelőlegezett bizalmat és támogatást családomnak és a rekreációban nyújtott segítséget barátaimnak. Külön köszönet Herczeg Alexandrának, Illés Róbertnek és Gyenizse Máténak, hogy meghallgatták minden lelkendezésemet és panaszomat az utóbbi hat évben, amióta a Jóisten a kutatói pályára irányított.