

**Szent István Egyetem**

**MADÁR ŐSIVARSEJTEK IZOLÁLÁSA ÉS  
FEJLŐDÉSI POTENCIÁLJÁNAK JELLEMZÉSE  
*IN VITRO* ÉS *IN VIVO***

DOI: 10.54598/000070

**Lázár Bence  
Gödöllő  
2020**

## **A doktori iskola**

**megnevezése:** Állattenyésztés-tudományi Doktori Iskola

**tudományága:** Mezőgazdasági Biotechnológia

**vezetője:** Dr. Mézes Miklós  
egyetemi tanár, MTA doktora  
SZIE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar  
Takarmányozástani Tanszék

**Témavezető:** Dr. Gócza Elen  
MTA doktora, tudományos tanácsadó  
NAIK, MBK, ÁBF, főosztályvezető

**Társ-témavezető:** Patakiné Dr. Várkonyi Eszter  
tudományos főmunkatárs  
Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ  
Haszonállat-génmegőrzési Intézet

.....  
Az iskolavezető jóváhagyása

.....  
Témavezető jóváhagyása  
Gócza Elen, MTA doktora

.....  
Társ-témavezető jóváhagyása  
Patakiné Várkonyi Eszter Ph.D.

# Tartalomjegyzék

<b>1. Jelölések és rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>5</b>
<b>2. Bevezetés és célkitűzések .....</b>	<b>9</b>
2.1. BEVEZETÉS .....	9
2.2. CÉLKITŰZÉSEK .....	10
<b>3. Irodalmi áttekintés .....</b>	<b>11</b>
3.1. A MADARAK SZAPORODÁSBIOLOGIAI SAJÁTOSÁGAI .....	11
3.1.1. <i>Hímivar</i> .....	11
3.1.2. <i>Nőivar</i> .....	12
3.1.3. <i>Megtermékenyítés</i> .....	13
3.2. A MADARAK EMBRIONÁLIS FEJLŐDÉSE .....	13
3.2.1. <i>Embrionális fejlődés szakaszai madarakban</i> .....	13
3.2.2. <i>Embrionális összejek madarakban</i> .....	18
3.3. ŐSIVARSEJTEK (PG SEJTEK) MADARAKBAN .....	19
3.3.1. <i>Az ősvarsejtek eredete és determinációja</i> .....	19
3.3.2. <i>Az ősvarsejtek azonosítása</i> .....	20
3.3.3. <i>Az ősvarsejtek vándorlása</i> .....	21
3.3.4. <i>Az ivarsejtek fejlődése</i> .....	23
3.4. A MADÁR, MINT MODELL RENDSZER JELENTŐSÉGE ÉS FELHASZNÁLÁSI TERÜLETEI .....	25
3.4.1. <i>Génszerkesztett madarak létrehozása</i> .....	25
3.4.2. <i>A tojás, mint bioreaktor</i> .....	27
3.4.3. <i>Madár modell az alap kutatásban</i> .....	28
3.5. GÉNMEGŐRZÉS MADÁR EMBRIONÁLIS SEJTEK FELHASZNÁLÁSÁVAL .....	29
3.5.1. <i>A madár embrionális összejek hosszútávú fenntartása</i> .....	30
3.5.2. <i>Kiméra egyedek előállítása madár embrionális összejek recipiens embrióba injektálásával</i> ...	33
3.5.3. <i>Kiméra előállítási hatékonyság növelésének lehetőségei</i> .....	36
<b>4. Anyag és módszer.....</b>	<b>39</b>
4.1. A VIZSGÁLATOKBAN RÉSZTVEVŐ ŐSHONOS TYÚKFAJTÁK JELLEMZÉSE .....	39
4.1.1. <i>Magyar tyúkfajták</i> .....	39
4.1.2. <i>Erdélyi kopasznyakú tyúkfajták</i> .....	42
4.2. KÍSÉRLETI ÁLLATOK, ÁLLATKÍSÉRLETEK.....	44
4.3. A KÍSÉRLETI ÁLLOMÁNY TARTÁSTECHNOLÓGIÁJA .....	44
4.4. ŐSIVARSEJTEK ISOLÁLÁSA AZ EMBRIÓBÓL.....	45
4.5. ŐSIVARSEJTVONALAK ALAPÍTÁSA ÉS FENNTARTÁSA – SEJT TENYÉSZTÉS.....	46
4.6. ŐSIVARSEJTVONALAK JELLEMZÉSE <i>IN VITRO</i> .....	48
4.6.1. <i>DNS izolálás és ivarmeghatározás</i> .....	48
4.6.2. <i>Immunohisztokémiai vizsgálatok</i> .....	49
4.6.3. <i>RNS izolálás, cDNS írás és kvantitatív real-time PCR</i> .....	50
4.6.4. <i>Proliferációs assay</i> .....	51
4.6.5. <i>Mikroszatellit markerek vizsgálata</i> .....	52
4.7. ŐSIVARSEJT VONALAK JELLEMZÉSE <i>IN VIVO</i> .....	54
4.7.1. <i>A mélyhűtött/felolvasztott sejtek fluoreszcens jelölése</i> .....	54
4.7.2. <i>A fluoreszcensen jelölt sejtek recipiens embrióba történő bejuttatása injektálással</i> .....	54
4.7.3. <i>Az injektált sejtek ivarszervbe történő integrációjának ellenőrzése</i> .....	55
4.8. ŐSIVARSEJT VONALAK MÉLYHÜTÉSE .....	55
4.9. ŐSIVARSEJT VONALAK FELOLVASZTÁSA .....	55
4.10. GÉNBANK LÉTREHOZÁSA ŐSIVARSEJTEK FELHASZNÁLÁSÁVAL .....	56
4.11. A DONOR FAJTA VISSZANYERÉSE ŐSIVARSEJTEK INJEKTÁLÁSÁVAL ÉS KERESZTEZÉSSSEL.....	56
4.11.1. <i>Donor eredetű ősvarsejtek injektálása recipiens embriókba</i> .....	57
4.11.2. <i>Recipiens embriók keltetése, az embrionális fejlődés ellenőrzése</i> .....	57

4.11.3. A kapott ivarszervi kiméra egyedek tesztkeresztése.....	57
4.11.4. Ondóvétel és mesterséges termékenyítés.....	58
4.12. STATISZTIKAI MÓDSZEREK.....	58
<b>5. Eredmények.....</b>	<b>59</b>
5.1. ŐSHONOS MAGYAR TYÚKFAJTÁK ŐSIVARSEJT VONALAINAK ALAPÍTÁSA .....	59
5.2. AZ ALAPÍTOTT ŐSIVARSEJT VONALAK <i>IN VITRO</i> JELLEMZÉSE .....	60
5.2.1. Ivar meghatározás .....	60
5.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálat .....	61
5.2.3. Génexpressziós vizsgálat .....	62
5.2.4. Sejtosztódás vizsgálata .....	63
5.2.5. Mikroszatellit markerek vizsgálata .....	66
5.3. AZ ALAPÍTOTT ŐSIVARSEJT VONALAK <i>IN VIVO</i> JELLEMZÉSE.....	67
5.3.1. Fluoreszcensen jelölt donor ősvarsejtek integrációjának vizsgálata a recipiens embrióban ...	67
5.4. GÉNBANK LÉTREHOZÁSA AZ ALAPÍTOTT ŐSIVARSEJT VONALAKBÓL .....	68
5.5. A DONOR FAJTA VISSZANYERÉSE ŐSIVARSEJTEK INJEKTÁLÁSÁVAL ÉS KERESZTEZÉSEL.....	69
5.5.1. Donor eredetű ősvarsejtek injektálása.....	69
5.5.2. Feltételezett ivarszervi kiméra egyedek tesztkeresztése .....	70
5.6. JAVASOLT PROTOKOLL HÁZITYÚK ŐSIVARSEJT VONALAK LÉTREHOZÁSÁHOZ ÉS TÁROLÁSÁHOZ GÉNBANKOK SZÁMÁRA .....	71
5.7. ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK .....	72
<b>6. Következtetések és javaslatok .....</b>	<b>73</b>
6.1. JAVASLATOK.....	77
<b>7. Összefoglalás.....</b>	<b>78</b>
<b>8. Summary .....</b>	<b>79</b>
<b>9. Mellékletek.....</b>	<b>80</b>
9.1. M1 – IRODALOMJEGYZÉK .....	80
9.2. M2 – AZ IVARMEGHATÁROZÁS, CDNS ÍRÁS, QPCR ÉS MIKROSZATELLIT MARKER VIZSGÁLAT SORÁN ALKALMAZOTT REAKCIÓK PARAMÉTEREI .....	96
9.3. M3 – AZ ALAPÍTOTT ŐSIVARSEJT VONALAK IMMUNHISZTOKÉMIAI FESTÉSE .....	97
9.4. M4 – ALLÉLGYAKORISÁGOK ÖSSZEHASONLÍTÁSA.....	98
9.5. M5 – FLUORESZCENSEN JELÖLT DONOR ŐSIVARSEJTEK VIZSGÁLATA A RECIPIENS EMBRIÓBAN .....	100
<b>10. fontosabb Tudományos publikációk.....</b>	<b>101</b>
<b>11. Köszönetnyilvánítás.....</b>	<b>103</b>

## 1. JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

<b>BC</b>	blasztodermális sejt (blastodermal cell)
<b>BRL</b>	Buffalo patkány máj sejtvonal (Buffalo rat liver cell line)
<b>BSA</b>	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
<b>CCK-8</b>	Sejt számláló Kit-8 (Cell Counting Kit-8)
<b>CEF</b>	házityúk embrionális fibroblaszt (chicken embryo fibroblast)
<b>cESC</b>	házityúk embrionális őssejt (chicken embryonic stem cell)
<b>CRISPR</b>	halmozottan előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
<b>CVH</b>	Házityúk <i>VASA</i> homológ (chicken <i>VASA</i> homologue, DEAD-box helicase 4)
<b>CXCR4</b>	fuzin, C-X-C motívum kemokin receptor 4 (C-X-C Motif Chemokine Receptor 4)
<b>CYP26B1</b>	retinsav hidroxiláz, citokróm P450-es szupercsalád 26-os család B-alcsalád 1-es (cytochrome P450 family 26 subfamily B member 1)
<b>DAZL</b>	deleted in azoospermia-like
<b>DMEM</b>	Dulbecco módosított Eagle tápoldata (Dulbecco's modified Eagle's medium)
<b>DMSO</b>	dimetil-szulfoxid (dimethyl sulfoxide)
<b>DND1</b>	DND microRNS-mediált gátló inhibitor 1 (DND microRNA-mediated repression inhibitor 1)
<b>DT</b>	duplikációs idő (doubling time)
<b>EGK</b>	Eyal-Giladi és Kochav féle embrionális fejlődési stádiumok
<b>EMA-1</b>	embrionális egér antigén-1 (embryonic mouse antigen-1)
<b>EpiSC</b>	epiblaszt őssejt (epiblast stem cell)
<b>FACS</b>	fluoreszcensen aktivált sejt szeparálás (fluorescence-activated cell sorting)
<b>FBS</b>	szarvasmarha magzati savó (fetal bovine serum)
<b>FGF2</b>	fibroblaszt növekedési factor 2 (fibroblast growth factor 2)
<b>gPGC/GGC</b>	ivarszervi PGC, ivarszervi csírasejt (gonadal PGC, gonadal germ cell)
<b>hEPO</b>	humán eritropoetin (human erythropoietin)

<b>HH</b>	Hamburger és Hamilton féle embrionális fejlődési stádiumok
<b>IGF1</b>	inzulinszerű növekedési faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
<b>iPSC</b>	indukált pluripotens őssejt (induced pluripotent stem cell)
<b>LIF</b>	leukémia inhibitor faktor (leukemia inhibitory factor, LIF interleukin 6 family cytokine)
<b>MACS</b>	mágnesesen aktivált sejt osztályozás (magnetic-activated cell sorting)
<b>mESC</b>	egér embrionális őssejt (murine embryonic stem cell)
<b>NS</b>	sejtmagfestés (nuclear staining)
<b>PAS</b>	perjódsav-Schiff-reakció (PAS reakció, PAS festés)
<b>PBS</b>	foszfát pufferes sóoldat (phosphate-buffered saline)
<b>PFA</b>	paraformaldehid (paraformaldehyde)
<b>PGC</b>	ösivarsejt, őscsírasejt, primordiális csírasejt, PG sejt (primordial germ cell)
<b>PMZ</b>	<i>posterior</i> marginális zóna, az <i>area opaca</i> része
<b>RA</b>	retinsav (retinoic acid)
<b>RALDH</b>	retinaldehid dehidrogenáz (retinaldehyde dehydrogenase)
<b>RAR</b>	retinsav receptor (retinoic acid receptor)
<b>RSV</b>	Rous szarkóma vírus (Rous sarcoma virus)
<b>RXR</b>	retinoid X receptor (retinoid X receptor)
<b>SDF1</b>	C-X-C motívum kemokin ligand 12 (C-X-C motif chemokine ligand 12, CXCL12)
<b>SSEA-1</b>	stádium-specifikus embrionális antigén-1 (stage-specific embryonic antigen-1)
<b>SST</b>	spermatároló tubulusok (sperm storage tubules)
<b>STAGE</b>	sperma transzfekció által asszisztált génszerkesztés (sperm transfection assisted gene editing)
<b>STO</b>	egér embrionális fibroblaszt sejtvonal (Sandos inbred mouse (SIM)-derived 6-thioguanine- and ouabain-resistant)
<b>STRA8</b>	stimulated by retinoic acid 8

<b>TALEN</b>	transzkripció aktivátor-szerű effektor-nukleáz (transcription activator-like effector nucleases)
<b><i>VASA</i></b>	DEAD-box helikáz 4 (DEAD-box helicase 4, DDX4)
<b>ZFN</b>	cink-ujj nukleáz (zink-finger nuclease)





## 2. BEVEZETÉS ÉS CÉLKITŰZÉSEK

### 2.1. Bevezetés

Az utóbbi évtizedben az Európai Unió komolyan támogatja a génbankok létrehozását és az ezekben tárolt minták tárolását és felhasználását. A Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK HGI) már a 1950-es évektől kezdve megtalálhatóak az őshonos magyar baromfi és víziszárnyas fajok és fajták (Biszkup and Beke, 1951; Báldy, 1954) mint élő génbanki állományok (*ex situ in vivo*). 2016-tól kutatócsoportunk részt vett egy Horizon 2020-as (n° 677353) pályázatban, amelynek célja az európai unión belüli génbankokban tárolt genetikai anyagok felhasználásának koordinálása és a szolgáltatások fejlesztése (*ex situ in vitro* módszerek) volt, majd 2017-től elkezdődött a VEKOP (VEKOP-2.3.2-16-2016-00012) „Kárpát-medencei őshonos haszonállatfajok, -fajták és -ökotípusok XXI. századi génbanki stratégiájának tudományos megalapozása és fejlesztése” című projekt, amelyben mind az NBGK HGI, mind Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ, Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (NAIK MBK) konzorciumi tagként vett részt. Így lehetőségem nyílt a már tárolt magyar őshonos baromfi spermaminták mellett létrehozni az ősivarsejt (PGC) génbanki mintákat is.

Madaraknál azért van nagy jelentősége az ősivarsejtek génbanki tárolásának, mert a nőivarban jelenlévő W ivari kromoszóma genetikai anyagát, valamint a mitokondriális DNS-t csak így lehet megőrizni. Madaraknál, ellentétben az emlősökkel, a hímivar rendelkezik a homogametikus ZZ ivari kromoszómapárral, míg a nőivar a heterogametikus ZW kromoszómákkal. Mivel a spermiumok esetében csak a haploid genetikai anyagot tudjuk megőrizni, ezért az eredeti genom rekonstruálásához 6-8-szoros visszakereszteezésekre van szükség (Blesbois, 2007).

Az ősivarsejtek jelentőségét madarakban az 1990-es években kezdték felfedezni (Tajima et al., 1993; Naito et al., 1994). Ahhoz, hogy igazán ki tudják használni a bennük rejlő lehetőségeket, ki kellett dolgozni a felszaporításuk és fenntartásuk módszerét sejtenyészetben. Erre 2006-ig kellett várni. Van de Lavoie és munkatársai (Van De Lavoie et al., 2006) dolgozták ki először az ősivarsejtek hosszútávú fenntartását, majd az ő módszereiket fejlesztették tovább más kutatócsoportok (Macdonald et al., 2010; Whyte et al., 2015; Oishi et al., 2016; Tonus et al., 2016). Napjainkban az ősivarsejtek könnyen kinyerhetők a madárembrió véreből, tenyészthetők,

mélyhűthetők, aztán visszainjektálhatók egy recipiens embrió keringésébe. Így mind a génmegőrzésben, mind a génmódosítást célzó kutatásokban nagyon jól felhasználhatók.

Mivel se a génbanki PGC minták előállításának, se a tesztelésének nincs meg a kialakult gyakorlata, a szakirodalmi forrásokat alapul véve (Pain et al., 1996; Macdonald et al., 2010; Kim et al., 2013; Whyte et al., 2015) kidolgoztam ennek a módszertanát, majd teszteltem is az általam eltárolt mintákat. A vizsgálatok során az eltárolt ősvarsejtekből sikerült visszanyernem az eredeti fajtát jó hatékonysággal. További fontos eredmény, hogy mind hímivarú, mind nőivarú ősvarsejteket sikerült sejtenyészetekben fenntartani, és mindkét nemből a visszainjektálás után utódot nyerni. Ezért a dolgozatban bemutatott protokollokat ajánlom madár *in vitro* génmegőrzéssel foglalkozó más intézményeknek/Génbankoknak is.

## 2.2. Célkitűzések

Munkám során célkitűzéseim a következők voltak:

- A madár ősvarsejtek izolálásának, homogén sejtpopulációk kialakításának, *in vitro* fenntartásának és mélyhűtésének adaptálása a magyar őshonos házityúk fajtákra.
- Ősvarsejt alapú génbank létrehozása, mely hat őshonos magyar házityúk fajta mintáit tartalmazza.
- A génbankban tárolt sejtvonalak minőségének és az alkalmazott módszerek hatékonyságának tesztelése: Fogolyszínű magyar házityúk fajta felolvasztott génbanki mintáival ivarszervi kimérák, majd donor eredetű utódok létrehozása.
- Egységesen javasolható protokoll kidolgozása házityúk ősvarsejtek génbanki mintáinak előállításához és eltárolásához.

### 3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

#### 3.1. A madarak szaporodásbiológiai sajátosságai

A madarak szaporodásbiológiai tulajdonságai sok tekintetben eltérnek az emlősökétől. A következő alfejezetekben összefoglalom a fontosabb különbségeket, melyek hozzájárulnak a dolgozatban tárgyalt módszerek és eredmények jobb megértéséhez.

##### 3.1.1. Hímivar

Az emlősökhöz képest madarakban különbség van a herék elhelyezkedésében és felépítésében: a herék a hasüregben helyezkednek el a vesék alatt, és képesek testhőmérsékleten (38-40°C) is optimálisan működni (Péczy, 2013). Állományukat a kanyarulat csatornácskák és az intersticiális kötőszövet alkotja. Az emlősökkel ellentétben nem tagozódnak lebenyekre, illetve a csatornácskák hálózatot alkotnak és nem vakon végződnek. Mivel a spermiumok érése és tárolása 90 %-ban az ondóvezetőben történik, így madarakban a mellékherék kevésbé fontos funkcióval bírnak (Péczy, 2013). Az érett ondósejtek tárolása általában rövidebb, például japán fürjnél 1-2 napra tehető, míg patkány esetében hozzávetőleg 9 nap (Clulow and Jones, 1982). A spermiogenezis szintén rövidebb idő alatt megy végbe, míg például kérődzők esetén 49 napig tart, házityúk faj esetében 12 nap is elegendő hozzá (Wolfné Táskai, 2000). A spermatogenezis folyamata az emlősökre jellemző 14 stádium helyett 10 stádium alatt megy végbe (Aire, 2011).

A spermiumok morfológiája madarakban rendkívül nagy változatosságot mutat, azonban általánosságban elmondható, hogy a nyaki rész kevésbé kifejezett, valamint a fej és a közepdarab kapcsolata kevésbé bonyolult, mint az emlősöknél (Péczy, 2013). Szintén az emlősöknél gyorsabb a kapacitáció és az akroszóma reakció folyamata. Madarak esetében a heréből közvetlenül izolált spermiumok is termékenyítőképesek (habár még nem motilisak) (Howarth, 1970), amiből arra következtethetünk, hogy nincs szükségük az emlősökhöz hasonló több órás érési folyamatra és kapacitációra (Olsen and Neher, 1948).

Jelentős különbség maga a párzószer is, madarakban a hím párzószer funkcióját a kloáka egyes részei látják el. A páros *ductuli efferentes* az *urodaeumba* csatlakozik be, míg maga a *phallus* a *proctodaeum* részét képezi. Madarakban megkülönböztetünk protrudens (kiölthető, pl. víziszárnyasok) és non-protrudens (nem kiölthető, pl. házityúk) phallust (Péczy, 2013).

### 3.1.2. Nőivar

Nőivar esetében az embrionális fejlődés kezdeti szakaszában két petefészek alakul ki, azonban később a jobb oldali fokozatosan visszafejlődik, így az ivarérett egyedekben már csak egy működő petefészeket és a hozzá tartozó petevezetőt találjuk meg. Ez alól kivételt képeznek egyes vágómadár- és sólyom-alakúak, illetve a kivi (Péczely, 2013).

További fontos különbség az emlősökhöz képest az ivarkészülék spermiumtárolási képességének fejlettsége. Ez a jelleg egy konvergens evolúciós folyamat eredménye és erősen konzervált. Egyes rovarok, kételtűek és hüllők akár évekig vagy élethosszig is képesek a sperma tárolására, míg emlősök esetében az *isthmus*ban található spermium rezervoárok általában csak pár napig képesek a spermiumok hatékony raktározására (Matsuzaki and Sasanami, 2017). (Kivételt képeznek egyes denevér csoportok, ahol a madarakhoz hasonló hosszú távú tárolást is megfigyeltek (Holt, 2011).) Madarakban a tárolás spermatároló tubulusokban (SST) történik, melyek az utero-vaginális szűkületben és az *infundibulum*ban találhatóak, és akár 10-40 napig is képesek a spermiumok termékenyítő képességét megőrizni. A tubulusok 10-20  $\mu\text{m}$  átmérőjűek, számuk és hosszuk fajoként változó, valamint genetikailag meghatározott. Házityúk fajban 2000-3000 darab SST található (Matsuzaki and Sasanami, 2017). A párzás során a nőivarú egyedbe jutó spermiumok átlagosan 1-2 %-a jut be valamelyik SST-be (Bakst et al., 1994). Ebből is látszik, hogy nagyon jelentős szelektáló szerepet tölt be a raktározás, mint funkció. Csak azok a spermiumok képesek termékenyíteni, amelyek előtte sikeresen tárolódtak valamelyik SST-ben. Jelentősége nem csak az egy híműl származó spermiumok szelektálásában, hanem a hímek közötti válogatásban is van. További előnyként megemlíthető, hogy nem kell szinkronizálni a kopulációt és az ovulációt, illetve a raktározott spermiumok védettek a napi ovulációs ciklus során. Az így raktározott spermiumok általában szakaszosan ürülnek, házityúk faj esetén naponta kb. 30% (Brillard, 1993). Szoros összefüggés mutatható ki a tubulusok száma és a fertilis periódus hossza között, a több tubulus hosszabb periódust eredményez. A nőivarú egyedek életkora szintén hatással van a fertilis periódus hosszára, mivel az életkor előrehaladtával gyorsul az ürülés az SST-ből, valamint csökken a tubulusok befogadóképessége, így rövidítve a periódus hosszát (Brillard, 1993).

### ***3.1.3. Megtermékenyítés***

A megtermékenyítés folyamatában megfigyelhető lényeges különbség az emlősökhöz képest, hogy a madarak polispermiásak, tehát több spermium egy időben hatol be egyetlen petesejtbe, azonban csak egy (a csírákorong közepéhez érkező) spermium fuzionál a petesejttel (Péczely, 2013). Ez a jelleg megfigyelhető még egyes kétélűekben, hüllőkben és halakban is (emlősök esetében csak a kacsacsőrű emlősnél). A normális embriófejlődéshez szükséges egy optimális spermiumszám; kutatások szerint a túl sok (Bobr et al., 1964) és a túl kevés (Christensen et al., 2005) spermium is korai embrióelhaláshoz vezethet. Házityúknál a penetrációs nyílások optimális száma 6-60 darab közé tehető. Madarak esetén a spermium-pete interakció aktivációs szignálja lassú, így több lehetőség is van a penetrációra, mielőtt a petesejt membránja áthatolhatatlanná válna. A legelfogadottabb hipotézis szerint a polispermia legfőbb funkciója, hogy a madarak rendkívül nagyméretű petesejtjén hatékonyabban tudjon az aktivációs hullám végigfutni, így nagyobb eséllyel történjen termékenyülés. Ezt támasztják alá egy 27 fajon végzett vizsgálat eredményei is, melyben pozitív korrelációt mutattak ki a penetrációs nyílások száma és a petesejt átmérője között (Mizushima, 2017).

## **3.2. A madarak embrionális fejlődése**

### ***3.2.1. Embrionális fejlődés szakaszai madarakban***

A madarak embrionális fejlődésének leírása főleg házityúkon végzett kísérletek eredményein alapul, így a továbbiakban ez a fejezet is a házityúkban elért eredményekre koncentrálva mutatja be a madarakra jellemző folyamatokat.

Az embrionális fejlődést - az emlősökhöz hasonlóan – madarak esetében is három nagy folyamatra oszthatjuk: barázdálódás, gasztruláció és organogenezis. A barázdálódás és a korai gasztruláció a nőivarú madárban zajlik le, míg a gasztruláció második fele és az organogenezis már a tojásrakás után a tojó szervezetén kívül (Péczely et al., 2007). Madarakban az embrionális fejlődés folyamatát kétféle nevezéktannal írhatjuk le. Az első a megtermékenyítéstől a primitív csík (a gasztruláció során kialakuló nevezetes képlet madarakban, kialakulását lentebb részletezem) kialakulásáig követi a fejlődést. Ennek a fejlődési szakasznak a leírása Eyal-Giladi és Kochav (Kochav et al., 1980) nevéhez fűződik (EGK stádiumok, római számok I-XIV-ig). A

primitív csík kialakulásától a kikelésig arab számokat használunk 2 és 46 között, ezen stádiumok leírása pedig Hamburger és Hamilton munkája (HH stádiumok) (Hamburger and Hamilton, 1992). Vizsgálataim során mindkét nevezéktant használom. A tojásrakás pillanatában az embrió a EGK X-es stádiumban van és a barázdálódás már befejezettnek tekinthető.

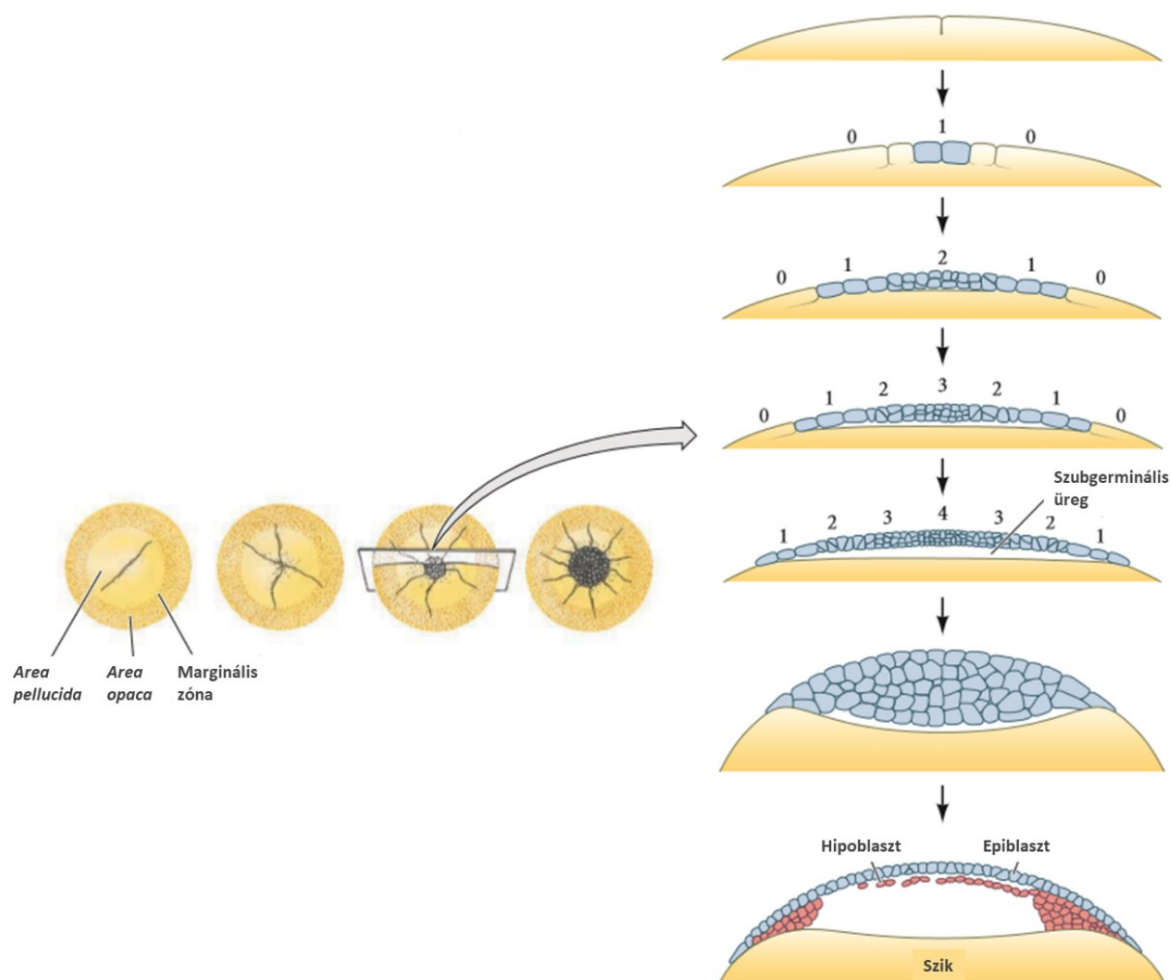
A fejlődés a megtermékenyítéssel indul, mely a petevezető kezdeti szakaszában megy végbe. Házityúk esetében a petesejt 15 perc alatt halad át az infundibulumon, közben megtörténik a megtermékenyítés. Ezt követően a magnumban a hossz tengelye körül lassan forgó petesejtre fehérje rétegek szintetizálódnak, ez 3 órát vesz igénybe. Az isthmusban 1,5 óra alatt szintetizálódnak a héjhártyák és a jégzsinór, majd az uterusban 19-20 órára van szükség a meszes héj kialakításához (közben a tojás fehérjerétege jelentős mennyiségű vizet veszít). A tojás képződése az ovulációtól számítva összesen 24 órát vesz igénybe (Péczy et al., 2007).

A barázdálódás az első sejtosztódási periódus a megtermékenyítést követően; és madarakban a fehérje és héjszekréció előtt megy végbe. A zigóta mitotikus sejtosztódások sorozatával egyre kisebb sejtekre (blasztomérákra) tagolódik. Madarakban ez a zigóta egy részét érinti (parciális), így meroblasztikus barázdálódásról beszélhetünk. Ezen belül telolecithális, vagyis a nagy mennyiségű szikanyag a pete vegetatív pólusán található, illetve diszkoidális, mely jelentése, hogy az embrió egy korongot (blasztodiszk/embriódiszk) formál az animális póluson (Gilbert and Barresi, 2017). A barázdálódás során az első osztódás a blasztodiszk centrális részén megy végbe, ezt további osztódások követik, így kialakul egy egysoros sejtréteg melyet szorosan egymás mellett elhelyezkedő, és a szikanyaggal bazálisan kapcsolódó sejtek alkotnak (1. ábra). Később további vertikális és horizontális osztódások által kialakul egy 5-6 sejtréteg vastagságú szövet. Ebben az időszakban a blasztodiszk központi részét képező vékonyabb, áttetsző mezőt, melyből később az embrionális szövetek is kialakulnak *area pellucida*-nak, a külső, sziken nyugvó, vastagabb, átlátszatlan gyűrűt pedig *area opaca*-nak nevezzük. Az *area pellucida* sejtei vizet vonnak el a fehérjerétegből, majd a szik felőli oldalon ezt kiválasztják, így hozva létre egy üreget a blasztodiszk ventrális oldalán, melyet szubgerminális üregnek nevezünk. Ezt az állapotot tekinthetjük a blasztula állapotnak (Gilbert and Barresi, 2017).

A következő fejlődési fázis a gasztruláció, vagyis a csíralemezek kialakulása, ez madarakban az *area pellucida* egyes sejteinek ventrális irányba történő vándorlásával kezdődik (2. ábra). Ezeket a sejtcsoportokat hipoblaszt szigeteknek nevezzük és összeolvadásukkal jön létre egy új sejtréteg a szubgerminális üregben, az elsődleges hipoblaszt. Az embriódiszk *posterior* felén található egy kitüntetett terület, a Koller sarló, mely kiindulási pontja egy újabb sejtvándorlási hullámnak. Ennek során az úgynevezett *posterior* marginális zónából (PMZ, *area opaca* része) a sejtek *anterior* irányba indulnak meg és kialakítják a másodlagos hipoblasztot. Ezzel a hipoblaszt

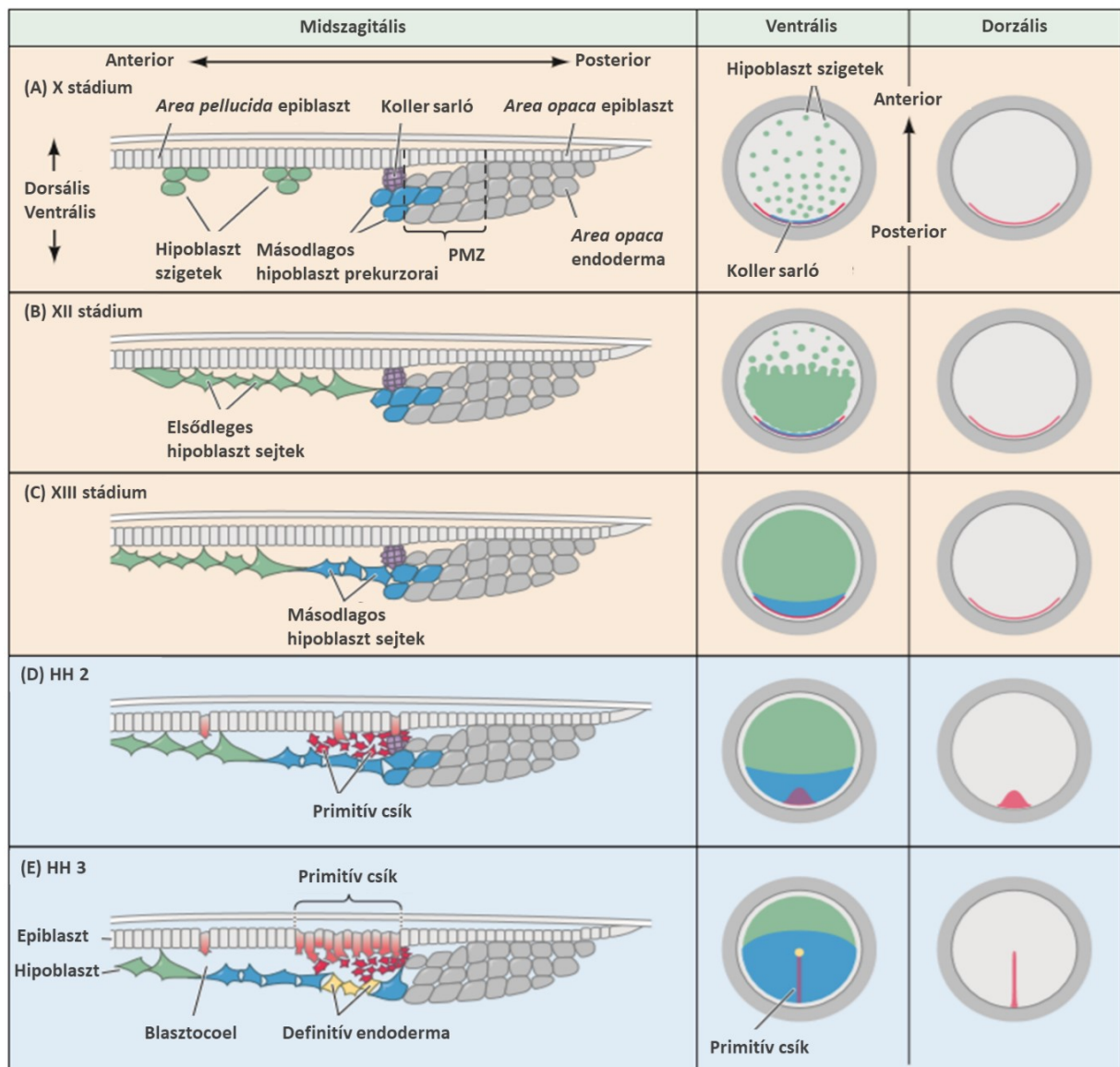
réteg teljesnek tekinthető, illetve ettől a stádiumtól az *area pellucida* sejtjeit, vagyis a diszk *dorsalis* sejtrétegét epiblasztnak nevezzük. A folyamat közben kialakult egy új üreg a hipoblaszt és az epiblaszt között, melyet *blastocoel*-nek nevezünk. A gasztruláció második felében megindul egy újabb sejtvándorlási hullám, melynek nyomán kialakul a három csíralemez. Ennek kiindulási pontja szintén PMZ területe, de az epiblaszt sejtjei indulnak meg ventrális irányban a *blastocoel*-be. A vándorlás egy jellemző mintázatot követ: az embriódiszk közepén halad a PMZ-től *anterior* irányba és egy jól elkülöníthető csíkra korlátozódik. Ezt a képletet primitív csíknak nevezzük, az *anterior* végpontját pedig Hensen csomónak. Az ebben a vándorlási zónában a *blastocoel*-be jutó sejtek alakítják ki a mezoderma sejtjeit, míg az epiblasztban maradó sejtek rétege felel meg az ektodermának. A vándorlás során az epiblaszt egyes sejtjei nem állnak meg a *blastocoel*-ben, hanem bejutnak a hipoblaszt rétegbe. Az így kialakult vegyes eredetű ventrális réteg alkotja az endodermát. Ezzel mindhárom, az embrió szöveteit és szerveit kialakító csíralemez létrejött (Gilbert and Barresi, 2017).

Ezt követően megindul a primitív csík regressziója *anterior-posterior* irányban. A visszahúzódás nyomán megindul az organogenezis az embrió feji végénél és a kikelésig kialakul minden szerv és szervrendszer. Ezek bemutatása meghaladja jelen dolgozat kereteit és nem járul hozzá érdemben az eredmények megértéséhez, így eltekintek tőle.



**1. ábra. A barázdálódás folyamatának bemutatása madarakban.** A barázdálódás során az első osztódás a blasztodiszka centrális részén megy végbe, ezt további osztódások követik, így kialakul egy egysoros sejtréteg melyet szorosan egymás mellett elhelyezkedő, és a szikanyaggal bazálisan kapcsolódó sejtek alkotnak. Később további vertikális és horizontális osztódások által kialakul egy 5-6 sejtréteg vastagságú szövet. Ebben az időszakban a blasztodiszka központi részét képező vékonyabb, áttetsző mezőt, melyből később az embrionális szövetek is kialakulnak *area pellucida*-nak, a külső, sziken nyugvó, vastagabb, átlátszatlan gyűrűt pedig *area opaca*-nak nevezzük. Az *area pellucida* sejtei vizet vonnak el a fehérjeterétegből, majd a szik felőli oldalon ezt kiválasztják, így hozva létre egy üreget a blasztodiszka ventrális oldalán, melyet szubgerminális üregnek nevezünk. Az ábrán látható számok az adott területre jellemző sejtrétegek számát adják meg. (Módosítva Bellairs, 1979; Nagai et al., 2015; Gilbert and Barresi, 2017 nyomán.)





**2. ábra. A csíralemezek folyamatának (gasztruláció) bemutatása madarakban.** A gasztruláció madarakban az *area pellucida* egyes sejteinek ventrális irányba történő vándorlásával kezdődik (A). Ezeket a sejtszortokat hipoblaszt szigeteknek nevezzük és összeolvadásukkal jön létre egy új sejtréteg a szubgerminális üregben, az elsődleges hipoblaszt (B). Az embriódiszk *posterior* felén található egy kitüntetett terület, a Koller sarló, mely kiindulási pontja egy újabb sejtvándorlási hullámnak. Ennek során az úgynevezett *posterior* marginális zónából (PMZ, *area opaca* része) a sejtek *anterior* irányba indulnak meg és kialakítják a másodlagos hipoblasztot (C). Ezzel a hipoblaszt réteg teljesnek tekinthető, illetve ettől a stádiumtól az *area pellucida* sejteit, vagyis a diszk *dorsalis* sejtrétegét epiblasztnak nevezzük. A folyamat közben kialakult egy új üreg a hipoblaszt és az epiblaszt között, melyet *blastocoel*-nek nevezünk. A gasztruláció második felében megindul egy újabb sejtvándorlási hullám, melynek nyomán kialakul a három csíralemez (D). Ennek kiindulási pontja szintén PMZ területe, de az epiblaszt sejteit indulnak meg ventrális irányban a *blastocoel*-be. A vándorlás jellemző mintázatot követ: az embriódiszk közepén halad a PMZ-től *anterior* irányba és egy jól elkülöníthető csíkra korlátozódik. Ezt a képletet primitív csíknak nevezzük, az *anterior* végpontját pedig Hensen csomónak (E). Az ebben a vándorlási zónában a *blastocoel*-be jutó sejtek alakítják ki a mezoderma sejteit, míg az epiblasztban maradó sejtek rétege felel meg az ektodermának. A vándorlás során az epiblaszt egyes sejteit nem állnak meg a *blastocoel*-ben, hanem bejutnak a hipoblaszt rétegbe. Az így kialakult vegyes eredetű ventrális réteg alkotja az endodermát. (Módosítva Gilbert and Barresi, 2017 nyomán.)

### 3.2.2. *Embrionális őssejtek madarakban*

Az első pluripotens embrionális eredetű őssejteket 3,5 napos egér blasztociszták embriócsomójából izolálták 1981-ben (mouse embryonic stem cell, mESC) (Evans and Kaufman, 1981; Evans, 2011). Közel 40 évvel később, napjainkban, az mESC vonalakat rutinszerűen tartják fent *in vitro* körülmények között a legkülönbözőbb kutatási célokra a világ számos laboratóriumában (Niwa, 2010).

Madarak esetében az első embrionális őssejtek leírása csak 1990-ben történt meg Petite és munkatársai által (Petitte et al., 1990). Ebben a kísérletben az EGK X-es stádiumú házityúk embrió sejtjeit, a blasztodermális sejteket (blastodermal cell, BC) gyűjtötték össze és injektálták be szintén EGK X-es stádiumú recipiens embriók blasztodermális üregébe. Azt tapasztalták, hogy a blasztodermális sejtek képesek voltak bevándorolni, és működőképes sejtekké fejlődni különböző szövetekben (szomatikus kimérákat létrehozva), sőt az ivarszervekbe vándorolva ősvarsejteket is ki tudtak alakítani (ivarszerv kimérák). Így bebizonyosodott, hogy az EGK X-es stádiumú embrió sejtjei még pluripotensek (Petitte et al., 1990). Házityúkban elnevezésük cESC (chicken embryonic stem cell). Jóval később kiderült, hogy az emlősökhöz hasonlóan madarakban is beszélhetünk egy „késői” epiblaszt eredetű sejttypusról, az EpiSC-ről (epiblast stem cell, EpiSC), mely szintén fenntartható *in vitro* tenyészetekben (Alev et al., 2013). Az embrionális fejlődés szakaszai szerint haladva a következő őssejt típus az ősvarsejt (primordial germ cell, PG sejt, PGC). Ezeket a sejteket leggyakrabban HH 13-17-es stádiumú embriók vérkeringéséből izolálják, és a leírt embrionális őssejttypusok közül a legfontosabbnak bizonyultak mind az alap-, mind az alkalmazott kutatás számára (génmegőrzés, genom editálás, hatóanyag termeltetés) (Lavial and Pain, 2010).

Jelen dolgozat következő fejezete hivatott részletesen bemutatni eredetüket és tulajdonságaikat. Az embrionális fejlődés következő szakasza során már ivarszervi csírasejtekről vagy más néven ivarszervi PGC-kről (GGC, gonadal germ cell; gPGC, gonadal PGC) beszélhetünk. Ezek a sejtek az ivarszervekbe már bevándorolt ősvarsejtek utódsejtjeiként foghatóak fel, és általában 6 napos házityúk embriók ivarszervéből izolálhatóak (Park and Han, 2000).

Nem embrionális sejttypus, mégis helye van ebben az áttekintésben a házityúk indukált pluripotens sejteknek (induced pluripotent stem cell, iPSC) is. Az iPSC kutatásoknak köszönhetően vált ugyanis még jobban érthetővé, hogy a madarakban milyen molekuláris mechanizmusok és jelátviteli útvonalak működése szükséges a pluripotencia fenntartásához.

Elsőként Lu és munkatársai hoztak létre nem emlős eredetű, fűrj iPSC vonalakat. Humán faktorok segítségével sikerült a visszaprogramozás, melyből következik, hogy ezek a folyamatok evolúciós szempontból konzerváltak. Az így létrehozott sejtvonalakkal sikerült szomatikus kiméra egyedeket is létrehozniuk (Lu et al., 2012).

### 3.3. Ősivarsejtek (PG sejtek) madarakban

#### 3.3.1. Az ősivarsejtek eredete és determinációja

Az ivarsejt az egyetlen olyan sejtípus a szervezetben, mely képes a genetikai információ átadására a következő generációnak. Az embrionális fejlődés során az ivarsejtek nem az ivarszervek területén jelennek meg először, oda csak később vándorolnak be. Ezeket a korai ivarsejt progenitor sejtpopulációkat az embrióban ősivarsejteknek, vagy más néven PG sejteknek (primordial germ cell, PGC) nevezzük. A madár ősivarsejteket az 1870-es években írták le először (Waldeyer, 1870). Jól azonosíthatók nagy méretük (10-20  $\mu\text{m}$ ), kerek alakjuk, nagy kerek sejtmagjuk, elkülönülő centriólumaik és a citoplazmában található refraktív lipid cseppek alapján. A madarak osztályán belül az ősivarsejtek morfológiája nagy mértékben konzerváltnak mondható. (Waldeyer, 1870; Swift, 1914; Fujimoto et al., 1976).

Általánosságban az ivarsejtek kétféle módon tehetnek szert az őket meghatározó speciális tulajdonságokra: autonóm módon, ez az úgynevezett preformációs modell; vagy a sejtkörnyezet indukciója által, ez az epigenezis modell.

A preformációs modell szerint a megtermékenyítést megelőzően, vagy közvetlenül utána, a petesejt citoplazmájának egy meghatározott részében (germinális plazma) jelen lévő anyai eredetű faktorok felelősek az ősivarsejtek meghatározódásáért. Ezt a modellt igazolták többek között ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*), fonálféregben (*Caenorhabditis elegans*), zebrafishban (*Danio rerio*) és karmosbékában (*Xenopus laevis*) (Eddy, 1976; Illmensee and Mahowald, 1976; Olsen et al., 1997; Venkatarama et al., 2010) is. Ezzel ellentétben az epigenezis modell alapján a környező sejtek különböző szignáljai indukálják az ősivarsejtté válás folyamatát. Egér esetében a téma jól kutatott és az eredmények az utóbbi modellt támogatják (Tam and Zhou, 1996; Saitou et al., 2002). Madarak esetében kezdetben az epigenezis modellt tartották valószínűbbnek, és egy, a blasztoderma kialakulásának időszakában fokozatosan felépülő epigenetikus hatásnak gondolták (Karagenç et al., 1996). Később azonosították az ecetmuslica *VASA* génjének homológját házityúkban. Laval és munkatársai bizonyították, hogy a *VASA*

gének kulcsszerepe van a megfelelő ivarsejt fejlődés és differenciálódás során (Lavial et al., 2009). Az oocytában a mitokondriális felhők környezetében bizonyították a géntermék jelenlétét, továbbá a barázdálódás folyamán a barázdálódási árok alapi részénél (Tsunekawa et al., 2000). Ezek az eredmények arra engednek következtetni, hogy a madarak esetében mégis a preformációs modell érvényesül az ősvarsejtek elköteleződése során, azonban ennek egyértelmű eldöntéséhez további funkcionális vizsgálatok szükségesek.

### 3.3.2. Az ősvarsejtek azonosítása

Az ősvarsejtek nagy mennyiségű glikogént tartalmaznak a citoplazmában, így először a glikogén jelölésen alapuló perjódsv-Schiff-reakció (PAS reakció, PAS festés) segítségével sikerült megkülönböztetni őket a szomatikus sejtektől. Ez a módszer házityúk esetében hatékony, azonban pl. japán fürjnél (*Coturnix coturnix japonica*) a citoplazma alacsony glikogén tartalma miatt nem használható. További probléma, hogy a PAS festés csak a X-es stádium után fest, így nem alkalmazható az embrionális fejlődés korai szakaszában (3. ábra).

Később megjelentek immunhisztokémiai módszerek is, melyek sejtfelületi antigének jelölésén alapulnak; pl. az SSEA-1 (Stage Specific Embryonic Antigen 1), valamint az EMA-1 (Embryonic Mouse Antigen 1) (Meyer, 1960; Fujimoto et al., 1976; Karagenç et al., 1996; Tsunekawa et al., 2000). Ugyan ezeknek a módszereknek a kezdeti azonosításban nagy szerepük volt, mégsem elég specifikusak ahhoz, hogy a csíravonal sejteit végig követhessük differenciációjuk során, hiszen az EMA-1 és az SSEA-1 a fejlődés korai szakaszában nem expresszálódik az ősvarsejtek teljes populációján (3. ábra) (De Melo Bernardo et al., 2012; Hen et al., 2014), továbbá a pluripotens őssejtek is expresszálják azokat (Pain et al., 1996).

Az említett sejtfelületi markerek (a fent említett limitációkkal) alkalmasak az ősvarsejtek specifikus antigén-antitest reakción alapuló tisztítására is, pl. vérből vagy sejtszuspenzióból. Mára a kereskedelmi forgalomban is kaphatók mágneses (MACS: magnetic-activated cell sorting), illetve fluoreszcens (FACS: fluorescence-activated cell sorting) alapon működő tisztító kit-ek (Ono and Machida, 1999; Mozdziak et al., 2005).

Az igazán hatékony, a fejlődés teljes hosszában jól használható ősvarsejt azonosítást a *VASA* gén (DEAD-box helikáz 4, DDX4) felfedezése jelentette. Ezt a gént *Drosophila*-ban mutatták ki először (Lasko and Ashburner, 1988), azonban homológjait azóta számos rendszertani kategóriában igazolták (pl.: fonálféreg, karmosbéka, egér, zebradánio, pisztráng és ember) (Roussell and Bennett, 1993; Fujiwara et al., 1994; Yoon et al., 1997; Olsen et al., 1997; Yoshizaki

et al., 2000; Castrillon et al., 2000). Házityúkban először Tsunekawa és munkatársai azonosították 2000-ben (*CVH*: chicken *VASA* homologue). Expressziója ivarsejt specifikus és a csírvonal fejlődésének teljes hosszában érvényesül (Tsunekawa et al., 2000). Génterméke a *VASA* protein jelen van a sejtek citoplazmájában mindkét ivar esetében. Laval és munkatársai bizonyították, hogy a *VASA* génnek kulcsszerepe van a megfelelő ivarsejt fejlődés és differenciálódás során (Laval et al., 2009). Ennek köszönhető, hogy napjainkban a madár ősvarsejtek azonosítását alkalmazó kutatások túlnyomó többsége a *VASA* gén vagy génterméke molekuláris és/vagy immunhisztokémiai módszerekkel való kimutatásán alapul (3. ábra). A *VASA* mellett léteznek további ivarsejt specifikus molekuláris markerek, ilyen a dead-end RNS kötő fehérje házityúk homológja (*DND1*) (Aramaki et al., 2007) és a *DAZL* (Deleted in Azoospermia-Like) (Kito et al., 2010) fehérje is. Fontos szerepet játszanak a csírvonal sejtjeinek fejlődésében, így ezek is alkalmazhatóak az ősvarsejtek azonosítására. A *DND1* a sejtmagban fejeződik ki, míg a *DAZL* a citoplazmában van jelen.

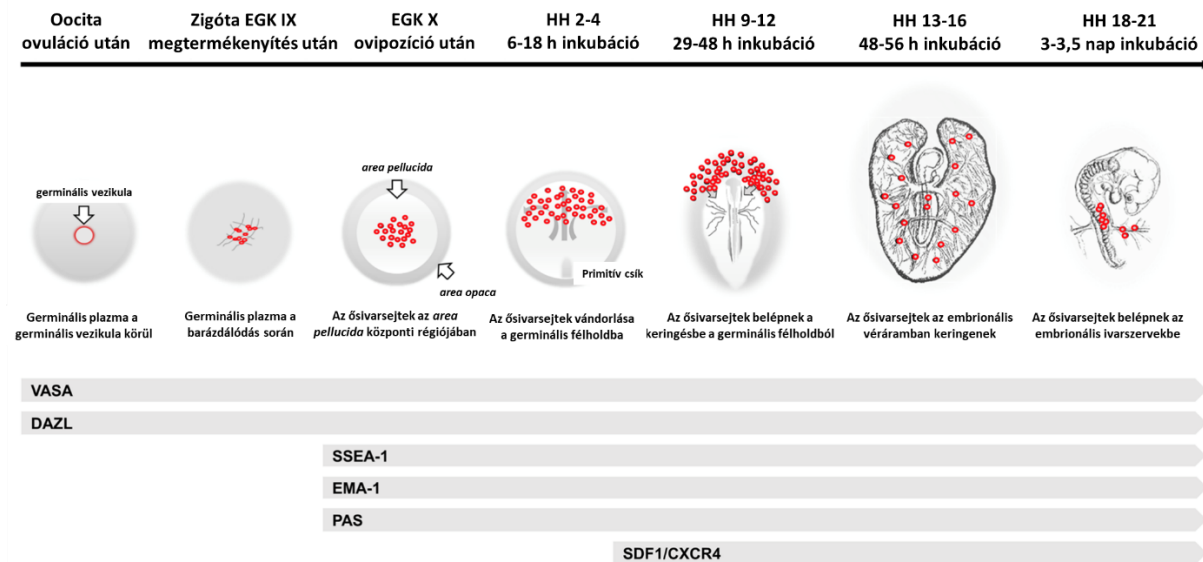
### **3.3.3. Az ősvarsejtek vándorlása**

Az azonosítást lehetővé tévő hatékony módszerek megjelenése utat nyitott az ősvarsejtek vizsgálatára az embrionális fejlődés különböző szakaszaiban (3. ábra). Így azonosítani tudták pontos eredetüket, illetve vándorlásukat az embrióban. A mitokondriális felhők környezetében már a korai oocytában is kimutatható a *VASA* fehérje anti-*CVH* immunhisztokémia segítségével (Tsunekawa et al., 2000).

Az Eyal-Giladi és Kochav féle nevezéktan IV-es stádiumában átlagosan 6-8 ősvarsejtet találunk (Yoon et al., 1997; Tsunekawa et al., 2000), később az EGK X-es stádiumban számuk 30-130 db-ra tehető (Kochav et al., 1980; Tsunekawa et al., 2000). Ez a 30-130 ősvarsejt a frissen lerakott tojásban az *area pellicuda* központi régiójában, az epiblaszt sejtréteg ventrális oldalán helyezkedik el (Kochav et al., 1980; Ginsburg, 1994). Ezt követően indul az ősvarsejtek első vándorlása, mely során az epiblasztból kilépve a hipoblaszt egy extra-embrionális területére lépnek be az embrió *anterior* felén; ezt a régiót germinális félholdnak nevezzük. Ez az első vándorlás passzív módon megy végbe (Karagenç et al., 1996). A germinális félholdban történik a sejtek első jelentős sejtosztódási periódusa is, az EGK X-es és HH 9-es stádium között számuk megháromszorozódik. Később a HH 10-es stádiumtól kezdődően belépnek a germinális félhold területén formálódó erekbe és megkezdik vándorlásukat a fejlődő ivarlécek felé (Kuwana and Fujimoto, 1984). Az ősvarsejtek keringésben történő vándorlása a madarak és egyes hüllők

sajátossága. A keringésben jelen lévő ősvasejtekre gyakran utalnak cPGC-ként (circulating PGCs). Az ősvasejtek koncentrációja a keringésben a HH 14-es stádiumban éri el a csúcát (házityútkban 50-53 órával a tojásrakást követően) (Tajima et al., 1999). A vándorló ősvasejtek az intermedier mezoderma területén lépnek ki a keringésből, és kezdenek koncentrálni a HH 15 – HH 17 stádiumtól kezdődően (házityútkban 52-64 órával a tojásrakást követően) (Nakamura et al., 2007). A keringésből kilépő ősvasejtek a *dorsalis mesenterium* mentén vándorolnak tovább, majd belépnek a fejlődő ivarlécekbe és azokat kolonizálják (Fujimoto et al., 1976).

A sejtek mozgása madarakban még nem teljesen tisztázott. Amit tudunk, hogy számos extracelluláris mátrix molekula (laminin, fibronectin, kondroitin szulfát és kollagén IV) az ősvasejtek vándorlásával térben és időben pozitívan korreláló módon van jelen az embrióban (Urven et al., 1989). Azonban ezek a molekulák önmagukban nem képesek az ősvasejteket az ivarlécekhez „elvezetni”. Zebradánióban és egérben kimutatták, hogy a korai embrionális fejlődés során a későbbi ivarszervek területén képződő SDF1 (stromal cell-derived factor 1) kemokin fontos szerepet játszik a sejtek kemotaxisában (Doitsidou et al., 2002; Ara et al., 2003). Azt is bizonyították, hogy az ősvasejtek által expresszált CXCR4 receptor köti a kemokint (Knaut et al., 2003; Molyneaux et al., 2003). Madarak esetében leírták, hogy az SDF1-nek szerepe van a vándorlás második fázisában, vagyis a sejtek erekből való kilépésében és az ivarszervek megtalálásában (3. ábra). Stebler és munkatársai leírták, hogy az *intermedier mesoderma* területén található sejtek gyakran rendelkeznek megnyúlt állabakkal, melyek tipikus sejtalkotók aktív helyváltoztatásra képes sejtek esetében (Stebler et al., 2004).

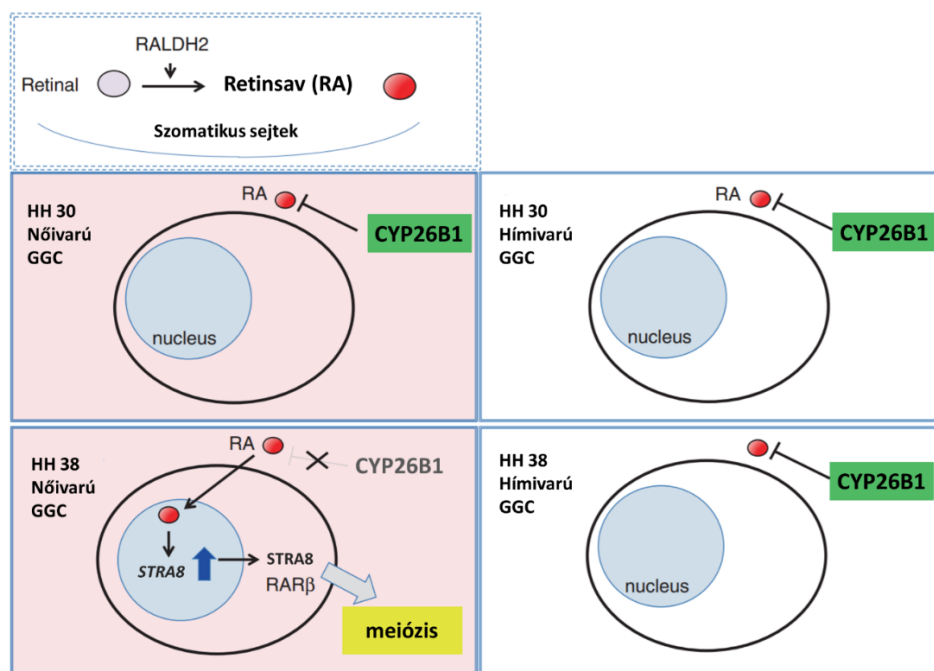


**3. ábra. Az ősvarsejtek lokalizációja és a jellemző markerek megjelenése az embrionális fejlődés során.** Az ősvarsejtek (az ábrán pirossal jelölve) először a X-es stádiumú embrióban azonosíthatók, ekkor az *area pellucida* központi régiójában találhatók. Később a HH 2-4-es stádiumban belépnek a germinális félhold területére, amit a HH 9-12-es stádiumban kezdenek elhagyni, hogy vándorlásukat a keringésben folytassák. A HH 13-16-os stádiumok között az erekben találhatók (ez a madarakra és hüllőkre jellemző tulajdonság számos módszer alapjául szolgál). A keringésből a HH 18-21-es stádiumok között lépnek ki, majd utolsó állomásként a fejlődő ivarszervekbe lépnek be, ahol később érett ivarsejtekké fejlődnek. A VASA és DAZL a fejlődés kezdetétől jelen vannak és mára a legelterjedtebb eszközei az ősvarsejtek azonosításának. Az SSEA-1, EMA-1 és PAS csak a X-es stádium után alkalmazható megbízhatóan. Az SDF1-nek szerepe van a vándorlás második fázisában, vagyis a sejtek erekből való kilépésében és az ivarszervek megtalálásában, így ez a vándorlás végső szakasza során bizonyult hasznosnak. (Módosítva Kim and Han, 2018 nyomán.)

### 3.3.4. Az ivarsejtek fejlődése

Az embrionális gonád fejlődésével a korábban bevándorolt ősvarsejtek is megkezdik az osztódást. Az ivarszervben található ősvarsejteket gyakran gPGC (gonadal PGC) vagy GGC (gonadal germ cell) néven is említik. A HH 29-es stádiumot (tojásrakás utáni 6. nap házityúkban) követően megindul a gonádok ivarspecifikus fejlődése, mely során a hímekben két egyenrangú here fejlődése veszi kezdetét, míg tojókban a jobb ivarszerv fokozatosan visszafejlődik és csak a bal fejlődik működő petefészekké. Ettől a stádiumtól kezdve a hím ősvarsejtek osztódása szünetel (Méndez et al., 2005) és csak a bal oldali nőivarú ivarszervben figyelhetünk meg ivarsejt osztódást. Becslések szerint a HH 35 és 43 (tojásrakás utáni 9-17. nap házityúkban) stádiumok között az ősvarsejtek száma huszonötszörösére nő a bal petefészekben (Hughes, 1963). A jobboldali petefészekbe bevándorolt ősvarsejtek apoptózis által eliminálódnak a kikelésig. A tojókban az ősvarsejtek meiózisa a HH 41-es stádium (tojásrakás utáni 15. nap házityúkban) körül aktiválódik. Sok más élőlényhez hasonlóan madarakban is a retinsavnak (RA) van nagy szerepe az iniciálásban. A retinsav szintézise precízen szabályozott a szövetspecifikus retinaldehid dehidrogenáz

(RALDH) enzimes család által, melynek tagjai a RALDH1, RALDH2 és RALDH3 enzimek (Smith et al., 2008). Házityúk embriókban a RALDH2-nek van a legnagyobb szerepe az RA szintézisében (4. ábra). Az embrionális ivarszervekben a HH 30 stádiumot (tojásrakás utáni 6,5. nap házityúkban) követően a RALDH2 expresszió erőteljes növekedést mutat mindkét ivarban és meg is marad a fejlődés során (Smith et al., 2008). Az RA mennyisége a RALDH2 mellett egy RA-bontó enzim a CYP26B1 (citokróm P450, 26-os család, B alcsoport, 1-es) által szabályozott. CYP26B1 jelenlétében a RALDH2 nem képes RA-t felhalmozni az ősvarsejtek környezetében, így abból nem jut be elég a sejtekbe, megakadályozva ezzel meiózis aktivációját (Smith et al., 2008). Ez történik a hímekben, ahol a CYP26B1 expresszió folyamatos az embrionális ivarszervekben. Tojókban a HH 38-as stádiumig van expresszió, azonban ezután fokozatosan csökken, majd eltűnik. Így ezt követően megindulhat a meiózis. A retinsav jelátvitelében két receptor család is szerepet játszik: RAR (RA receptor) és RXR (retinoid X receptor). Házityúkban a RAR három változatát is azonosították ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ), melyek közül a RAR $\beta$  van jelen mindkét ivar ősvarsejtjeiben a HH 30-as stádiumot követően. Az RA a RAR $\beta$  receptoron keresztül indukálja a *STR48* (Stimulated by retinoic acid 8) expressziót az ősvarsejtekben a HH 38-as stádiumtól, mely eredményeként tojókban megindul a meiózis (Smith et al., 2008).



**4. ábra. A retinsav (RA) és retinaldehid dehidrogenáz (RALDH) szerepe az ivarsejtek fejlődésében.** A madarakban a retinsav (RA) kulcsszerepet játszik a meiózis inicializálásában. A retinsav szintézise precízen szabályozott a szövetspecifikus retinaldehid dehidrogenáz (RALDH) enzimes család által. Az embrionális ivarszervekben a HH 30 stádiumot követően a RALDH2 expresszió erőteljes növekedést mutat mindkét ivarban és meg is marad a fejlődés során. Az RA mennyisége a RALDH2 mellett egy RA-bontó enzim a CYP26B1 (citokróm P450, 26-os család, B alcsoport, 1-es) által is szabályozott. CYP26B1 jelenlétében a RALDH2 nem képes RA-t felhalmozni az ősvarsejtek környezetében, így abból nem jut be elég a sejtekbe, megakadályozva ezzel meiózis aktivációját. Ez történik a hímekben, ahol a CYP26B1 expresszió folyamatos az embrionális ivarszervekben. Tojókban a HH 38-as stádiumig van expresszió, azonban ezután fokozatosan csökken, majd eltűnik. Így ezt követően megindulhat a meiózis. (Módosítva Tagami et al., 2017 nyomán.)



### **3.4. A madár, mint modell rendszer jelentősége és felhasználási területei**

Napjainkban az egér modell számít a legelterjedtebbnek az állatmodellek közül, azonban sok esetben rendelkezésre áll a kérdésfelvetéshez jobban illeszkedő faj. Humán szív- és keringési betegségek modellezésére például sok esetben nyulat használnak (Major et al., 2016).

Az utóbbi években egyre nagyobb teret nyertek a madár modellek is az alap- és alkalmazott kutatási projektekben. A madár embrió használatának nagy hagyománya van a fejlődésbiológiai vizsgálatokban, de számos új felfedezés született az immunológia, genetika, virológia, rákkutatás és a sejtbiológia területén is. Ennek legfőbb oka, hogy az embrionális fejlődés nagy része a tojó testén kívül zajlik, így a szervek és szövetek könnyen hozzáférhetők, ezáltal könnyen megismerhetők az embriók fejlődését irányító genetikai szabályozási mechanizmusok. Ezen vizsgálatok eredményeként lehetővé vált a humán betegségeket kialakító rendellenességek okainak azonosítása, vagy a szív és érrendszeri betegségek, illetve a sejtek pusztulását előidéző genetikai háttér megismerése. Ezen felül egyre több példát láthatunk genom szerkesztett házityúk vonalak kialakítására is. A genom editált tyúk vonalnak egyrészt nagy jelentősége lehet a biztonságos élelmiszerek előállításában (természetesen a megfelelő körülmények és szabályozás mellett), másrészt lehetőséget kínálnak számos új betegségmodell létrehozására, vagy a tojásban történő hatóanyag előállítására, bioreaktorként alkalmazva azt. Egyre nagyobb a jelentősége a gazdaságilag fontos, veszélyeztetett vagy őshonos fajok, fajták génmegőrzésének, melyhez a terület biotechnológiai módszereinek folyamatos fejlesztése is szükséges.

#### ***3.4.1. Génszerkesztett madarak létrehozása***

A genom szerkesztés lehetőségével új korszak nyílt az élőlények genotípusának (és ezen keresztül fenotípusának és tulajdonságainak) megváltoztatására. Ezt megelőzően a tenyésztők hagyományos módszerekkel igyekeztek elérni minél jobb minőséget és termelékenységet (Andersson and Georges, 2004). Ha a hagyományos módszerrel, illetve a genom editálással létrehozott transzgenezist összehasonlítjuk, akkor azt láthatjuk, hogy a két módszer ugyanarra az eredményre vezet, különbség a hatékonyságban és a gyorsaságban tapasztalható. Ahhoz, hogy bármilyen állatban célzott genetikai módosításokat végezhesünk, szükséges a csíravonal sejtjeinek (ősivarsejtek és ivarsejtek) megváltoztatása, hiszen ezeken a sejteken keresztül érhetünk el generációkon átívelő hatást (Lee et al., 2015). Madarak esetében a fejlődés jellege (tojásrakás, nagy mennyiségű szik, diszkoidális meroblasztikus barázdálódás) az emlősökétől jelentősen eltérő

genom editálási stratégia kifejlesztését igényelte (Han, 2009). A zigóta és a korai embrionális stádiumok nagyon nehezen hozzáférhetők, így a tojásrakás utáni stádiumokra (EGK X-es és idősebb) kellett fókuszálni. Az EGK X-es stádiumtól kezdődően az embrió már a gasztruláció folyamatán megy keresztül (30.000-50.000 sejt), tehát nincs lehetőség az embrió összes sejtjét egy lépésben módosítani, mint az emlős rendszerekben.

Az első transzgenikus házityúk létrehozásához egy retrovírus alapú vektort mikroinjektáltak EGK X-es embriók szubgerminális üregébe (Salter et al., 1986). Más vírus alapú konstrukciókkal is próbálkoztak, amiket EGK X-es embriókba (Bosselman et al., 1989; Thoraval et al., 1995; Sherman et al., 1998), vagy megtermékenyített tojásokba (Love et al., 1994; Sherman et al., 1998), illetve blasztodermális sejtekbe mikroinjektáltak (Zhu et al., 2005). Általánosságban elmondható, hogy ezen módszerek alkalmazása nem volt hatékony, így egyik sem terjedt el széles körben.

Az áttörést az ősvarsejtek hatékony izolálásának és hosszú távú *in vitro* tenyésztésének kidolgozása jelentette. Házityúkban az első ősvarsejt alapú transzgenezist retrovírus vektorokat alkalmazva hozták létre (Vick et al., 1993). PiggyBac, vagy Tol2 transzpozon vektorok ősvarsejtekbe történő juttatásával is sikerült transzgenikus tyúkokat létrehozni (Macdonald et al., 2012; Park and Han, 2012). A vektorokat lipofektaminos transzfekcióval vagy elektroporálással juttatták be a sejtekbe.

Azoknál a fajoknál, ahol az ősvarsejtek sejtenyészetekben történő fenntartása még nem megoldott, megjelentek alternatív módszerek is. Ilyen például, amikor a vírus vektort tartalmazó transzfekciós oldatot közvetlenül a HH 14-16-os stádiumú embriók vérkeringésébe injektálják (Zhang et al., 2012; Tyack et al., 2013).

A közelmúltban, a precíziós genomszerkesztés megjelenésével lehetővé vált célzott genetikai módosítások létrehozása is. Ezeket a technikákat három nagy csoportba sorolhatjuk: a cink-ujj nukleázok (ZFN, zink-finger nucleases), a TALEN (transcription activator-like effector nucleases), valamint a CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats) genomeditálási módszereket. A „hagyományos” génmódosítási eljárásokat összehasonlítva ezekkel a technikákkal jóval hatékonyabb homológ rekombináció érhető el, és pontosan tervezhető a szerkesztés helye. Madarakban a ZFN alkalmazásáról még nem számoltak be, azonban TALEN és CRISPR technika segítségével számos génszerkesztett madarat hoztak létre. 2014-ben írták le az első TALEN módszerrel létrehozott génkiütött (knock-out) házityúkokat. Ebben a vizsgálatban az ovalbumin gént ütötték ki célzott módosítással *in vitro* tenyésztett ősvarsejtekben, majd ezekből hoztak létre ivarszervi kimérákat, végül pedig génszerkesztett állatokat (Park et al., 2014). Nem sokkal később az első CRISPR knock-out házityúk is kikelt, ezt Oishi és kollégái publikáltak.

Kísérletükben az ovalbumin és ovomucoid géneket is sikeresen kiütötték, szintén sejtenyészetben fenntartott ősvarsejtek módosításán keresztül (Oishi et al., 2016). A genom editálási folyamat meggyorsítására is találhatunk példát: Cooper és munkatársai a spermiumok közvetlen transzfekcióját (STAGE, sperm transfection assisted gene editing) végezték el CRISPR-Cas9 segítségével. A módszer előnye, hogy a módosított spermiumokkal mesterségesen termékenyítve már az első generációban heterozigóta génszerkesztett állatokat kaphatunk, továbbá előnyös lehet azoknál a fajoknál, ahol nem lehetséges ősvarsejtek *in vitro* létrehozása (Cooper et al., 2017).

A génszerkesztett madarak létrehozása nagy jelentőséggel bír és hatalmas potenciált hordoz számos tudományterületen, azonban fontos megjegyezni, hogy az Európai Unió jelenlegi szabályozása mellett ezeknek a módszereknek a széleskörű gyakorlati alkalmazása jelenleg nem lehetséges.

### **3.4.2. A tojás, mint bioreaktor**

2015 és 2017 között az USA-ban több mint 100 új gyógyszer hatóanyagot engedélyeztek, melynek nagy hányada fehérje alapú. Továbbá klinikai fázisban van hasonló számú rekombináns protein (Pham, 2018) alkalmazása is.

Jelenleg a hatóanyag termelés egy része prokarióta sejt kultúrákban zajlik, azonban a humán gyógyszernek szánt anyagok esetében az engedélyezett fehérjék döntő többségét emlős eredetű sejtekben termeltetik (Sanchez-Garcia et al., 2016). A sejt alapú rendszerek bizonyították hasznosságukat, de vannak korlátaik. A prokarióta sejtek glikozilációja, illetve a prokarióta sejtek és élesztőgombák poszt-transzlációs módosításai például különböznek az eukariótákban leírtaktól, így humán célra kevésbé alkalmasak (Cain et al., 2014). Az emlőssejt alapú rendszerek hátránya pedig a magas előállítási és fenntartási költség. Ennek köszönhetően a kutatók alternatív (nem sejt kultúra alapú) megoldások felé nyitottak, például a madarak és tojásaik felhasználása a termeltetésre. A házityúk és tojása több szempontból is alkalmas erre, így napjainkban egyre inkább előtérbe kerül, ha bioreaktor rendszerek kialakítása a cél humán terápiás anyagok előállítására. A tojás protein tartalma magas és egy átlagos tyúk több mint évi 300 tojást is rakhat, így nagy mennyiségben állíthatjuk elő a kívánt anyagot. Generációs idejük a haszonállatok között viszonylag rövid, továbbá gyorsan létrehozható termelő állomány az alapító egyedekből. Az első bioreaktor célú génmódosított madarat 2002-ben hozták létre. Ebben az időszakban még nem ismertek szövetspecifikus promótereket, így az állat egész testében (és a tojás fehérjében is) termeltették a  $\beta$ -laktamázt (Harvey et al., 2002). Ezt követte az első biológiaiailag aktív humán

fehérje; az interferon  $\alpha$ -2b tojásfehérjében történő produkciója (Rapp et al., 2003). Ezután számos publikáció született a témában, melyek a hatékonyság növelését, vagy egy új fehérje termelését tűzték ki célul. Az indukálható promóterek használata például nagy előrelépés volt, hiszen segítségükkel a termeltetett fehérje citotoxicitásának hatására létrejött fejlődési rendellenességek száma csökkent (Koo et al., 2010; Kwon et al., 2011). A következő fejlesztés ezen a területen a szövetspecifikus promóterek használata volt, ilyen például az ovalbumin promóter. A tojásfehérje protein tartalmának 56%-a ovalbumin, mely a tojás formáció során a magnum mirigyeiben termelődik, tehát a promótere magnum-specifikus, ezáltal lehetségessé válik, hogy a tojásfehérjébe termeltessünk egy transzgent. Az első ilyen sikeres kísérlet során, egy monoklonális antitestet termeltettek a tojásokban (Zhu et al., 2005). A rendszer működött, de kis mennyiségű expressziót a magnumon kívül is tapasztaltak (például a szérumban), illetve az átörököthetőség is alacsony volt. További vizsgálatok következtek, melyek új ovalbumin promóter variációkat is teszteltek, majd 2018-ban Kwon és munkatársai közölték, hogy sikerült olyan transzgenikus házityúk vonalat előállítani, mely stabilan expresszálja a humán eritropoetint (hEPO) a tojásban és a fehérje biológiai aktivitása megegyezik az emlős rendszerben termeltetettel. Az állat szervezetében a magnumon kívül nem találtak expressziót (Kwon et al., 2018). A jövőben számíthatunk rá, hogy a magnum-specifikus gének és promótereik kutatása tovább folytatódik, és bővül a felhasználható promóterek köre.

### **3.4.3. Madár modell az alap kutatásban**

A madár, legfőképpen a házityúk embriókon végzett vizsgálatok számos fejlődésbiológiai felfedezés alapjául szolgáltak. Házityúk embrióban írták le például az artériák és vénák funkcióját, továbbá feltételezték a kapillárisok összekötő szerepét (Harvey and Sigerist, 1628). Hozzájárultak a három csíralemez és a ganglionléc felfedezéséhez (Pander, 1817). Madár modellben fedezték fel a vírusok és a rák kialakulása közötti első kapcsolatot, melyért Rous 1966-ban Nobel-díjat is kapott (Rous Sarcoma Virus, RSV) (Rous, 1911). Waddington az 1930-as években számos fontos folyamatot írt le, pl.: az extraembrionális endoderma (hipoblaszt) szabályozó szerepét az embrió polaritásában és primitív csík kialakulásában (Stern, 2000). Madarakban írták le a T- és B-limfociták jelenlétét (utóbbit a *Bursa Fabricii*-ből, mely madár specifikus szerv), mely napjainkban is meghatározó jelentőségű (Miller, 2004). 1975-ben Nobel-díjjal jutalmazták a reverz transzkriptáz felfedezését és az RNS vírusok gazda sejtbe történő bejutásának leírását, melyhez a modell szervezet szintén a házityúk volt (Perevozchikov et al., 1973). Madarakban írták le azon gének első csoportját, melyek a bal-jobb aszimmetria kialakításában játszanak szerepet,

továbbá azokat a molekulákat, amelyek a végtagbimbó megjelenéséért felelősek (Raya and Izpisua Belmonte, 2004; Tickle, 2004).

Érdemes még megemlíteni, hogy a házityúk több ezer éves háziasítása folyamán számos fajta és változat alakult ki. Ezek között számos olyan vonal van, mely genetikai szempontból értékes mutációkat hordoz, fontos alapanyagként szolgálhatnak genetikai vizsgálatokhoz, esetleg új géneket sikerülhet azonosítani általuk.

### **3.5. Génmegőrzés madár embrionális sejtek felhasználásával**

A genetikai információ mélyhűtés általi megőrzése gazdaságos módja a mezőgazdaságban, iparban és kutatásban használt fajok és fajták fenntartásának. Emlősök esetében a rendelkezésre álló eszközök tárháza jóval szélesebb, számos gazdaságilag fontos fajnál rutin eljárásnak számít a spermiumok, petesejtek és embriók mélyhűtése, az *in vitro* fertilizáció, illetve a szomatikus sejtmag vagy embrió átültetés. Az említett technikák fejlettsége elérte azt a technikai színvonalat és biztonsági szintet, ami lehetővé tette, hogy a humán orvoslás is átvegye és alkalmazza azokat fertilitási problémák kezelésére (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

Minden tojással szaporodó szervezet esetében, így a madarak esetében is, az intakt embriók krioprezervációja lenne a legkézenfekvőbb megoldás az *ex situ in vitro* megőrzésre, azonban a tojásban található nagy mennyiségű szikanyag miatt ez jelenleg nem lehetséges. A spermiumok mélyhűtése madarak esetében számos fajnál (pl.: házityúk, lúd, kacs, pulyka, gyöngyös) kidolgozott (Lake and Stewart, 1978; Hammerstedt and Graham, 1992; Váradi et al., 2013), de hatékonysága nagy változatosságot mutat fajok, fajták, vonalak, de akár egyedek között is (Tajima et al., 1990; Chalah et al., 1999). További limitáló tényező, hogy madarak esetében a tojó a heterogametikus ivar (ZW ivari kromoszómákkal), így a spermium mélyhűtésén alapuló módszerek önmagukban nem képesek a W ivari kromoszómában, illetve a mitokondriális DNS-ben raktározott információk megőrzésére. Habár házityúkban a sperma mélyhűtése megvalósítható, ennek ellenére a génmegőrzés elsősorban élő populációk fenntartásában jelenik meg az állományok döntő többségénél. Az *in situ* megőrzés azonban számos veszélyt rejt, drasztikus következményei lehetnek egy esetleges fertőzésnek (pl. madárinfluenza), vagy környezeti katasztrófának, kockáztatva ezzel az állományokban rejlő genetikai változatosságot. További hátránya az *in situ* stratégiának, hogy a telepek és az állatházak fenntartása, a munkaerő bére, valamint a folyamatos takarmány és állatorvosi kiadások miatt rendkívül költséges (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

A genetikai anyag megőrzésének másik módja madarak esetében az embrionális sejtek mélyhűtése, majd szükség esetén, a felolvasztást követően azok recipiens embrióba való visszaültetése (Tajima, 2002; Naito, 2003), mellyel a teljes genetikai anyag (tehát a nőivar is) megőrizhető. Jelenleg az embrionális eredetű sejtek felhasználásával történő génmegőrzésnek három módszere ismert, függően a sejt típusától, illetve a korától; blasztodermális (BC) sejtekkel, cirkuláló (cPGC), illetve a gonádból származó primordiális ősvarsejtekkel (gPGC, illetve GGC) (Patakiné Várkonyi et al., 2017). Napjainkra számos házityúk fajtaból – köztük őshonos vonalakból is - sikerült ősvarsejt tenyészeteket alapítani (Van De Lavoie et al., 2006; Macdonald et al., 2010; Miyahara et al., 2014; Tonus et al., 2016). A folyamat szempontjából ennek legnagyobb előnye, hogy egyedi embriókból is lehetséges a mélyhűtéshez és injektáláshoz elegendő számú PG sejtet előállítani, így elősegítve a minél szélesebb alapokon nyugvó genetikai információ tárolását. Ugyan a PG sejtek izolálásához, *in vitro* tenyésztéséhez és mélyhűtéséhez szükséges infrastruktúra és vegyszer költséges, mégis jóval elmarad egy *ex situ* állomány folyamatos fenntartásával járó kiadásokhoz képest, ráadásul az így tárolt sejtek védettek a fertőzésekkel, szaporodásbiológiai problémákkal és egyes környezeti károsításokkal szemben (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

### **3.5.1. A madár embrionális őssejtek hosszútávú fenntartása**

#### **3.5.1.1. Hosszútávú fenntartás sejttenyésztésben**

##### **3.5.1.1.1. Blasztodermális sejt – fenntartás sejttenyésztésben**

Madarak esetében tehát a petesejt, illetve korai embriók mélyhűtése nem megoldott, így az embrionális sejtek mélyhűtése, majd felolvasztás után ezek recipiens embrióba történő visszainjektálása szükséges. A megtojás pillanatában a házityúk embrió kb. 50000 - 60000 sejtet tartalmaz (Yan et al., 2014). Ezek a blasztodermális sejtek (BC), pluripotensek, aktívan osztódnak, nem specializálódtak, széles körű differenciálódási képességgel rendelkeznek. Az őssejtek genomja a teljes genetikai programot tartalmazza, így felépülhet belőlük az adott egyed egész szervezete, az ivarsejteket is beleértve. Az *in vitro* génmegőrzés egyik lehetséges útja madarakban éppen ezeknek a csírákorongból kinyerhető pluripotens embrionális sejteknek a hosszútávú történő tárolása. Madaraknál elsőként Pain és munkatársai (Pain et al., 1996) állítottak elő pluripotens embrionális eredetű sejtvonalat (cESC, chicken embryonic stem cell) házityúk és fűrj

embrióból. A tenyésztéshez egy speciális egér embrionális fibroblaszt sejtvonalat (STO) használtak táplálósejt-réteggént. Megállapították, hogy ezen sejtek hosszú távú fenntartása csak leukémia inhibíciós faktort (LIF-et) tartalmazó tápoldatban lehetséges, mert e nélkül, a legkülönbözőbb fejlődési irányokba differenciálódnak, ektoderma, mezoderma, illetve endoderma szerű sejtekké. A cESC-t felhasználva sikeresen állítottak elő baromfi kimérákat. Később a STO sejteket házityúk embrionális fibroblaszt sejtvonalra (CEF) cserélték és az egér eredetű LIF helyett (mLIF) házityúk LIF (cLIF) került a tápoldatba. További fejlesztés volt, hogy nem az egész embriódiszket használták fel a sejtvonal alapításhoz (ahogy a korábbi vizsgálatokban tették), hanem csak az *area pellucida* sejtjeit (Intarapat and Stern, 2013).

Ezek a módosítások mind hozzájárultak a tenyésztési körülmények javításához, azonban a hosszútávú fenntartás során a sejtek mégis elvesztették azon képességüket, hogy a recipiens embriókba való visszajuttatást követően ivarsejtekké differenciálódjanak. Az első magyarázat szerint maguk az ES sejtek veszítik el képességüket a csíravonal irányú differenciálódásra. Egy későbbi hipotézis szerint viszont a X-es stádiumban az ősvarsejtek (PGC-k) még az epiblasztban találhatóak, ezért lehetséges ivarszervi kimérákat létrehozni, ha a blasztodiszkból frissen izolált sejtuszupenziót injektálunk recipiens embriókba (Lavial and Pain, 2010). Feltehetően az ES sejtek számára kifejlesztett médium nem támogatja a PGC-k osztódását, így a hosszú távon tenyésztett sejtek között már csak a BC eredetű őssejteket találunk (ESC-k), melyek eredendően nem képesek részt venni a csíravonal kialakításában (Lavial and Pain, 2010). Ezért a blasztodiszk-ben levő sejteket a tenyésztés korai fázisában le kell fagyasztani, vagyis ez a módszer csak mélyhűtéssel kombinálva alkalmas a baromfifajok genetikai anyagának megőrzésére (Whyte et al., 2015; Patakiné Várkonyi et al., 2017).

#### 3.5.1.1.2.      Ősvarsejt – fenntartás sejtenyésztésben

A házityúk embriókból származó ősvarsejtek felszaporítása, a mélyhűtés, illetve a recipiens embriókba való visszaültetés előtt a kezdetektől stratégiai jelentőséggel bírt. A modern génmegőrzési módszerekhez elengedhetetlen, hogy az egyedi embriókból származó genetikai információ álljon rendelkezésünkre. Azonban az ehhez szükséges módszerek csak hosszas tápoldat fejlesztési kutatások eredményeként álltak elő (Patakiné Várkonyi et al., 2017). Először megfelelő tenyésztő médium hiányában több embrióból származó sejtek gyűjtésével és keverésével emelték a kísérletekhez szükséges sejtek számát, azonban egyes eljárásokhoz még ez is kevés volt. Az első sikeres *in vitro* tenyésztés során ivarszervi stróma sejtekből álló táplálósejt

réteget használtak. Ezt 5 napos embriók ivarlécéből állították elő, és segítségükkel 4 napon keresztül tudták fenntartani az ősvarsejteket (Chang et al., 1995). Az alkalmazott médium tartalmazott növekedési faktorokat (IGF1 – insulin-like growth factor-1, FGF2 – fibroblast growth factor-2, LIF) és szérumot. A tápoldat ugyan alkalmas volt az ősvarsejtek csíravonal specifikusságának fenntartásra, azonban a sejtosztódás túl lassú volt, így használata nem terjedt el. Az első eljárás és tenyésztő médium, amellyel hosszú távon fenntarthatóvá váltak az egyedi embrióból izolált sejtek, rendkívül nagy jelentőségű áttörés volt 2006-ban (Van De Lavoie et al., 2006). A médium alkalmas volt a hím ősvarsejtek akár 100 napnál hosszabb tenyésztésére, azonban a tojó eredetű sejtek 77 nap tenyésztés után már nem voltak alkalmasak ivarsejtek kialakítására. Buffalo rat liver (BRL) sejteket használtak táplálóséjtnak, és a médium szarvasmarha magzati savót (fetal bovine serum, FBS), tyúk szérumot és humán FGF2-t tartalmazott. Ezt követően számos fejlesztés jelent meg különböző kutatócsoportok munkájának köszönhetően. Kezdetben táplálósajt réteget is alkalmaztak, majd egyre több, a molekuláris jelátviteli út feltérképezésén keresztül, a PG sejtek igényeinek jobban megfelelő táplálósajt mentes rendszert fejlesztettek ki (Choi et al., 2010; Macdonald et al., 2010; Miyahara et al., 2014, 2016). McGrew és munkatársai 2015-ben közzölték új tápoldatukat, melynek létrehozásakor felhasználták a legfrissebb molekuláris biológiai és jelátviteli információkat (Whyte et al., 2015). Ez a táplálósajt és szérum mentes médium már alkalmas volt mindkét ivarból származó sejtenyészetek létrehozására, és még hosszú távú fenntartást követően is, működő ivarsejtek képződtek belőlük a recipiens embriók ivarszervében. Újdonság volt a médium alacsony osmolaritása (250 osmol/kg) és alacsony kalcium koncentrációja (0,15 mM). Így, ez a tápoldat alkalmas volt arra, hogy mindkét ivarból származó ősvarsejtek nagy hatékonysággal fenntarthatók és felsokszorozhatók legyenek a mélyhűtés (Nandi et al., 2016) és a recipiensbe való injektálás előtt (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

### *3.5.1.2. Hosszútávú fenntartás mélyhűtéssel*

#### **3.5.1.2.1. Blasztodermás sejt – fenntartás mélyhűtéssel**

A napjainkig leginkább alkalmazott madár embrionális őssejt mélyhűtési protokoll a sejtek lassú mélyhűtésén alapul. Az eljárás szérum tartalmú médiumot használ, mely krioprotektánsként 10%-ban dimetil-szulfoxidot (DMSO) tartalmaz és 1°C / perc hűtési sebességet alkalmaz (Patakiné Várkonyi et al., 2017). Madár embrionális sejtek mélyhűtéséről először Naito és



munkatársai (Naito et al., 1992) számoltak be fűrjénél. Az embrionális sejtszuspenziót több blasztodiszki tripszin/EDTA oldatban történő diszaggregáltatásával nyerték. Reedy és munkatársai (Reedy et al., 1995) sikeres embrionális blasztoderma sejt mélyhűtésről számolnak be házityúknál. A mélyhűtő oldat védőanyagként 1,5 M-os DMSO-t és 15% szarvasmarha magzati savót (FBS) tartalmazott. A mintákat ezután folyékony nitrogénben tárolták. Az így kezelt sejtek mikroinjektálása után az embriók 12,3%-a kelt ki, és ezekből 22,4% bizonyult kimérának a tollszín alapján. Kino és munkatársai 1997-ben végeztek fagyasztott-felolvasztott blasztodermális sejtekkel injektálást, mely során nem csak szomatikus, de ivarszervi kimérákat is kaptak. A fagyasztáshoz 10% DMSO-t és 20% FBS-t tartalmazó médiumot használtak és 1°C / perc hűtési sebességet (Kino et al., 1997).

#### 3.5.1.2.2. Ősivarsejt – fenntartás mélyhűtéssel

Napjainkban a madár génbanki alkalmazások körében leginkább használt embrionális sejtek az ősivarsejtek (PGC-k). A közelmúltban számos összehasonlító vizsgálatot végeztek, melyekben tesztelték a különböző krioprotektánsokat és azok koncentrációját, valamint a hűtési sebesség hatását is (Moore et al., 2006; Setioko et al., 2007; Sawicka et al., 2015; Tonus et al., 2016). A kutatások eredményeit összefoglalva elmondható, hogy az ősivarsejtek legeredményesebben 10% feletti szérum tartalmú, illetve 5-10% közötti DMSO-t vagy 10% etilén glikolt tartalmazó médiumban 2°C / perc sebesség mellett mélyhűthetők (Patakiné Várkonyi et al., 2017). Léteznek kereskedelmi forgalomban is kapható mélyhűtő médiumok, ilyen például a CELLBANKER 1 (Nippon Zenyaku Kogyo, Japan), melyeket egyszerű használatuknak és nagy hatékonyságuknak köszönhetően gyakran használnak faj és fajta génmegőrzési célokra (Nakamura et al., 2010a, 2011, 2013). Ugyan pillanatnyilag a vitrifikációs módszerek még nem érték el a lassú-mélyhűtés hatékonyságát ősivarsejtek esetében, azonban várható, hogy a jövőben a protokollok fejlesztésével akár meg is haladhatják azt (Kohara et al., 2008; Patakiné Várkonyi et al., 2017; Tonus et al., 2017).

#### ***3.5.2. Kiméra egyedek előállítása madár embrionális őssejtek recipiens embrióba injektálásával***

Ha az embrionális eredetű őssejteket gazdaembrióba injektáljuk (madarak esetében), vagy nyolc sejt embrióval aggregáltatjuk (egér esetében), azok képesek beépülni a gazdaembrióba.

Az így létrejött kiméra embrió, illetve a megszülető kiméra utód legkülönbözőbb szöveteiben, szerveiben megtalálhatók lesznek az őssejtekből létrejött utódsejtek (Petitte et al., 1990; Thoraval et al., 1995). Az így létrehozott kimérák két eltérő genotípusú (donor/recipiens) sejtvonalat tartalmaznak (Munro, 1977; Nilsson and Cloud, 1992). A donor sejtek elhelyezkedése szerint szomatikus vagy ivarszervi kimérákat különböztethetünk meg. Szomatikus kiméráról akkor beszélünk, ha a donor embrióból származó utódsejtek csak a testi sejtek között találhatóak meg, vagyis az eltérő genotípusú sejtek keveredése csak a szomatikus szövetekben történik meg. Ivarszervi kiméráról pedig akkor van szó, ha a donor sejtvonalból származó sejtek az ivarszervekbe is beépülnek, és ott ivarsejtekké is képesek differenciálódni (Patakiné Várkonyi et al., 2017). Ebben az esetben a kimérák ivarszervében donor és recipiens embrió eredetű, két eltérő genotípusú ivarsejt termelődik (Héjja et al., 2006). Tehát az embrionális sejtek mélyhűtésének és visszaültetésének a végső célja olyan ivarszervi kimérák előállítása, amelyek ivarszervei csak a megőrzendő fajta genomját tartalmazzák. Ily módon az első generációban visszanyerhető a kívánt genotípus. Jelenleg az embrionális eredetű sejtek átvitelével történő kiméra előállításnak két megközelítése ismert madarak esetében. Az egyik a pluripotens embrionális blasztoderma sejtek (BC) mikroinjektálásán alapul, a másik középpontjában az ősi ivarsejtek (PGC) alkalmazása áll (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

#### *3.5.2.1. Blasztodermális sejt*

Blasztodermális sejtek injektálásával sikeresen állítottak elő házityúk kimérát Pettite és munkatársai, Carsience és munkatársai, Etches és munkatársai, valamint Thoraval és munkatársai (Petitte et al., 1990; Carsience et al., 1993; Etches et al., 1993; Thoraval et al., 1994). Fajok közötti kimérákat állítottak elő fűj blasztodermális sejtek injektálásával házityúk embriókba Naito és munkatársai (Naito et al., 1991). A tollszín alapján a kikelt csibék 8,1 %-a bizonyult kimérának. Az embriókat recipiens pulykatojásban inkubálták a kelésig. Li és munkatársai kacsá blasztodermális sejteket injektáltak fehér leghorn X-es stádiumú recipiens tyúktojásba (Li et al., 2002). A 233 darab injektált tojásból 11 darab fenotípusos kiméra kelt ki, majd a visszakeresztezés után ebből 1 darab ivarszervi kimérának bizonyult. Bebizonyosodott, hogy szükség esetén egy másik fajta is alkalmas lehet a megőrzendő fajta ivarsejtjeinek termelésére recipiensként. Kagami és munkatársai a madarak ivari differenciálódását tanulmányozták házityúk kimérákon (Kagami et al., 1995). Az így kapott kimérák között fenotípusosan hím- és nőivarú körülbelül egyforma arányban fordult elő. Ezek a kimérák azonban genotípusosan ZZ/ZW kromoszóma készlettel rendelkeztek. Ezzel szemben, amikor nőivarú donor sejteket (ZW) injektáltak hím recipiens

embrióba (ZZ), csak fenotípusosan hímnemű kimérákat kaptak ZW/ZZ kromoszóma készlettel. Ezek az adatok arra engednek következtetni, hogy a hím donor sejtek képesek maszkulinizálni a nőivarú recipienst, de a nőivarú donor sejtek nem képesek feminizálni a hímivarú recipienst (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

#### 3.5.2.2. *Ősivarsejt*

Ahogy a bevezetőben említettem az ősivarsejt alapú génmegőrzésnek két módszerét különböztetjük meg tekintettel az ősivarsejt izolálás időpontjára. A gonád eredetű PG sejtek (gPGC) használata egyszerű és nagy mennyiségű tiszta sejtállományt eredményez, azonban elkerülhetetlen a donor embriók pusztulása, így olyan esetekben nem alkalmazható, amikor a feláldozható embriók száma limitált, vagy az embriók feláldozása egyáltalán nem lehetséges (ritka fajták, veszélyeztetett fajok).

Ezekben az esetekben a keringésben vándorló ősivarsejtek (cPGC) izolálása a megfelelő megközelítés, hiszen így egyszerre kapunk a vérvételen keresztül mintát a PG sejt felszaporításhoz és a keltetőbe visszahelyezett donor embrió is tovább fejlődhet, végül kikelhet (Nakamura et al., 2010b). További fontos gyakorlati aspektus, hogy például halakkal ellentétben, ahol az ellenkező nembe injektált fejlődő ivarsejtek nagy arányban képesek funkcionáló érett ivarsejtekké alakulni (Okutsu et al., 2007; Yoshizaki et al., 2010), madarak esetében a hatékonyság sokkal rosszabb, sőt, inkább csak ritka kivételként tekinthetünk erre a folyamatra (Naito et al., 1999; Liu et al., 2017). Ezért, ha a cél egy génmegőrzési program, csak ivar-azonos embriókba érdemes donor eredetű sejteket injektálni (Naito et al., 1999; Tagami et al., 2007).

Minden esetben fontos, és sok esetben nehéz kérdés, hogy mi a megfelelő recipiens vonal, fajta vagy faj. Egy őshonos fajta esetében egy rokon fajta kézenfekvő választás lehet, azonban veszélyeztetett fajok esetében a megoldás koránt sem ilyen egyszerű. Erre lehet a jövőben megoldás a xenotranszplantáció. A közelmúltban már végeztek kísérleteket egymástól távolabb eső filogenetikai csoportok között is (fácán, kacsa és galléros tuzok sejtek házityúkban), de egyelőre csak a hím PG sejtekkel értek el sikereket (Li et al., 2002; Seok et al., 2008; Wernery et al., 2010; Liu et al., 2012; Van De Lavoie et al., 2012). A jövőben további szövettani vizsgálatok szükségesek ahhoz, hogy kiderüljön hogyan lehetséges a nőivar sejtjeinek fejlődése az idegen recipiensben.

A genetikai információ ősivarsejtek formájában való tárolásának a biztonságon kívül van egy további előnye: jóval olcsóbban és hatékonyabban szállíthatók. Az első mélyhűtve szállítást

célzó kísérletek sikerrel zárultak (Nakamura, 2016). A jövőben ennek a ténynek jelentősége lehet egy PG sejt alapú tároló és elosztó hálózat kiépítésénél is. Az itt leírt módszerek már jelenleg is alkalmasak a fejlett génbanki megőrzés igényeinek kiszolgálására. Jó példa erre Japán, ahol már 15 őshonos házityúk és 2 gyöngytyúk fajta krioprezervációja ősvarsejtekkel is támogatott.

Reményeink szerint hazánkban is egyre jobban elterjedhet ez a rendszer és eredményesen egészítheti ki a már létező, főként sperma fagyasztáson alapuló *in vitro* stratégiákat (Patakiné Várkonyi et al., 2017).

### **3.5.3. Kiméra előállítási hatékonyság növelésének lehetőségei**

A génbankban tárolt embrionális sejtek genomjának visszanyeréséhez kiméra egyedek előállítása szükséges. A donor sejtek a recipiens embrióba való juttatásuk után beépülnek a recipiens embriók szövetei közé. A recipiens embriók ivarszervébe integrálódott donor eredetű sejtek biztosítják azt, hogy a létrejövő ivarszervi kiméra ivarsejtjeinek egy része donor eredetű legyen.

A kimérák előállítása során fontos szempont, hogy a donor sejteknek minél nagyobb hányada vegyen részt a kiméra felépítésében. A recipiens embrió eredetű sejtek részvételi arányának csökkentésére eltérő megoldások születtek madarak esetében. UV sugárzást (Aige-Gil and Simkiss, 1991) és  $\chi$ -sugárzást (Carsience et al., 1993; Etches et al., 1993; Thoraval et al., 1994) használtak több sikeres kísérletnél. Megállapították, hogy a recipiens embrió besugárzása növeli a donor sejtek integrálódásának hatékonyságát, de az embrió fejlődése lelassul és körülbelül 24 órával elmarad a kontrolltól (Carsience et al., 1993). Ezek a módszerek tehát ugyan működnek, mégsem elég megbízhatóak és hatékonyak a nagyobb léptékű felhasználáshoz, így a terület szakértői újabb megoldások felé fordultak. A buszulfán (1,4-butanediol dimethane sulfonate) egy emlősökben korábban sikeresen alkalmazott alkilező ágens (Brinster and Zimmermann, 1994; Nagano et al., 1999; Nakagawa et al., 2007), amely az embriók ivarsejtjeit károsítja maradandóan, majd az alkalmazását követő tíz óra elteltével lebomlik. Madarak esetén a buszulfánnak hasonló a hatása (Reynaud, 1969; Aige-Gil and Simkiss, 1991), azonban a módszer eredményes alkalmazásához szükség volt egy technikai fejlesztésre, mely során egy emulzió részeként célzottan juttatható a buszulfán az embrionális ivarszerv környezetébe (Nakamura et al., 2008). A módszer eredményeképpen rendkívüli hatékonysággal (99.5%) sikerült a donor eredetű ősvarsejteknek kolonizálni a recipiens embriók ivarszerveit (Nakamura et al., 2010b). A módszer hátránya, hogy ha a buszulfán emulzió nem az optimális helyen (az ivarszervek területén) éri az

embrió akkor az fejlődési rendellenességhez, illetve embrió elhaláshoz vezet. Az emulzió bejuttatása a tojáshéjon keresztül történik, így a hatás helye nehezen jósolható.

A következő lehetséges megoldást a génszerkesztés módszerének fejlődése hozta el. Taylor és munkatársai 2017-ben számoltak be egy chicken *VASA* homologue, *DDX4 (CVH)* knock-out házityúkról (Taylor et al., 2017). Egy TALEN konstrukcióval hoztak létre gén kiütött ősvarsejteket, melyek csíravonal kompetensek maradtak, így visszainjektálva ki tudtak alakítani egy olyan házityúk vonalat, melyben a tojó egyedek sterilek voltak. A tojó egyedekben megjelentek ugyan a saját ősvarsejtek, de a meiózis során eliminálódtak, így ezeket az egyedeket alkalmazva recipiensként, azok ivarszervében donor PGC eredetű ivarsejtek termelődtek. Mivel a hím egyedek egészséges spermát termeltek, így a vonal fenntartható volt.

Alternatív megoldás lehet steril interspecifikus hibridek alkalmazása. Molnár és munkatársai (Molnár et al., 2019) házityúk és gyöngytyúk keresztezéséből származó embriókat és kikelt egyedeket vizsgáltak, mint potenciális steril recipiens házityúk ősvarsejtek számára. A keresztezést mindkét irányban elvégezték: házityúk kakasok és gyöngytyúk tojók esetében 6,65 % élő utódot kaptak, míg fordított irányban 0,14 % volt a túlélés. Az első keresztezés során kapott utódok mind steril kakasok voltak, amely a Haldane szabály egy extrém változata. Az így kapott hibrid embriók keringésébe GFP-t expresszáló ősvarsejteket injektáltak, majd vizsgálták az ivarszervekben a jelölt sejtek jelenlétét vagy hiányát. A donor eredetű ősvarsejtek sikeresen vándoroltak be a steril ivarszervekbe. A vizsgálatok alapján a steril fajhibridek alkalmasak lehetnek univerzális recipiensnek génmegőrzési projekteken, így mindenképpen érdemesek a további kutatásra.



## 4. ANYAG ÉS MÓDSZER

### 4.1. A vizsgálatokban résztvevő őshonos tyúkfajták jellemzése

#### 4.1.1. Magyar tyúkfajták

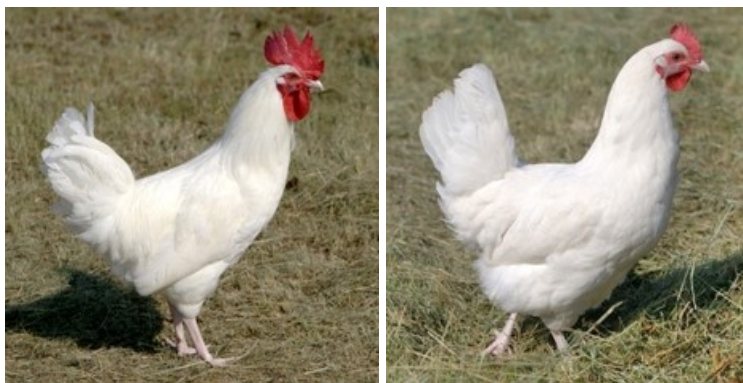
A magyar tyúkfajták kettőshasznúak, jellemző rájuk a közepes testméret. A tyúkok súlya átlagosan 2,0–2,3 kg, a kakasoké 2,5–3,0 kg. Jellemző rájuk a széles, telt és domború mell, a magasan tűzött szárny, a jól fejlett tojóhas, a középhosszú és sárga láb, a test nagyságához viszonyítva túlfejlett faroktollak és a testhez simuló tollazat. Fejük kicsiny, koponyájuk domború, csőrük rövid és erős tövű, szemük élénk. A taréj középnagy és hátranyúló, egyenesen felálló, a tojóké gyakran megdőlt, egyenletesen csipkézett egyszerű fűrésztaraj. Az áll-lebeny finom tapintású és lekerekített, a füllebeny tojásdad alakú és általában teljesen élénkvörös.

A magyar tyúk legfőbb értéke finom rostú és ízletes húsa, mely alapján méltán népszerű itthon és külföldön egyaránt. Csirkéi 8–10 hetes koruktól már értékesíthetők. Tojástermelése átlagosan évi 140–150 darab (Szalay, 2015).

Több színváltozatát is megkülönböztetjük, melyek közül leggyakoribbak: Fehér magyar, Kendermagos magyar, Sárga magyar és Fogolyszínű magyar.

#### 4.1.1.1. Fehér magyar

A tyúkok és kakasok tollazata fényes fehér. A kakasok tollazata egyes esetekben idősebb korban enyhén sárgás színezetű lehet. Tojásaik általában világosbarna színűek. Naposcsibéik pehelytollazata teljesen fehér. A Fehér magyar tyúk elsősorban az Alföld és a Duna–Tisza köze tyúkfajtája volt, mivel fehér színével az árnyék nélküli tartást, a tűző napsugarakat jól viselte (Szalay, 2015). (5. ábra)



5. ábra. Fehér magyar tyúk ([www.genmegorzes.hu](http://www.genmegorzes.hu))

#### 4.1.1.2. Kendermagos magyar

Mindkét ivar tollazatának alapszíne kékesszürke. A sötét, fekete színhatású, keskeny keresztsávok váltakozó elhelyezkedése idézi elő a jellegzetes "kendermagos" színt. A kakasok színe világosabb, a tyúkoké valamivel sötétebb. Tojásaik színe a világosbarnától és barnáig terjed. Naposcsibéik pehelytollazata sötétszürkés-fekete. Jó rejtő színei miatt legfőképp az ország északi részén, általában a ragadozókkal jobban veszélyeztetett területeken tartották, de az egész országban elterjedt fajta volt (Szalay, 2015). (6. ábra)



6. ábra. Kendermagos magyar tyúk ([www.genmegorzes.hu](http://www.genmegorzes.hu))



#### 4.1.1.3. Sárga magyar tyúk

A Sárga magyar tyúk nyaktollának végei, a szárny evezőtollai és a faroktollak végei kismértékben barnásfeketék. A kakas tollazatának alapszíne valamivel sötétebb, a nyak- és nyeregtollak, valamint a szárny fedőtollai élénk vörössárga színűek, az evezőtollak és a kormánytollak barnásfeketék. Csőre és lába sárga, tojása világosbarna színű. A naposcsibék pehelytollazata egyszínű világosbarna. A Sárga magyar tyúk a Dunántúlon, valamint az Alföld és a Duna–Tisza köze egyes részein volt leginkább elterjedt (Szalay, 2015). (7. ábra)



7. ábra. Sárga magyar tyúk (www.genmegorzes.hu)

#### 4.1.1.4. Fogolyszínű magyar tyúk

A tojó alapszíne az egész testre kiterjedően barna. Tollazata a mellen vöröses, a nyakon, vállon és háton sárgás, a test hátsó részén és a hason szürkés árnyalatú. A farok és a szárny evezőtollai feketék vagy sötétbarnák. A nyaktollakon fekete, keskeny csíkok láthatók, úgyszintén a mell-, hát- és szárnytollakon is keskeny, barna sávokból álló a toll körvonalához hasonló rajzolat látható. A kakas nyak- és nyeregtollazata aranysárga. A nyak- és nyeregtollak hosszában vékony, fekete csík látható. A fej tollazata narancsvörös, a nyereg, a váll és a hát felső része barnáspiros, a mell, a has és a combok fedőtollai pedig feketék. A kakas sarlófaroktollai szintén feketék, zöldes árnyalatban játszanak. Csibéik pehelytollazata közép barna, világosabb tarkázottsággal élénkített, vadmadárszerű színeződésű. Tojásaik színe világosbarna vagy barna. A Fogolyszínű magyar tyúkokat a Dunántúlon, valamint a ragadozóktól jobban veszélyeztetett erdős területeken tartották. A fogolyszín kialakulása recesszív tulajdonság (Szalay, 2015). (8. ábra)



8. ábra. Fogolyszínű magyar tyúk (www.genmegorzes.hu)

#### 4.1.2. Erdélyi kopasznakú tyúkfajták

Az erdélyi kopasznakú tyúkra jellemző, hogy nyaka, részben a melle, valamint hasi része is tollatlan. A kopasznakúságot egyetlen autoszomális gén határozza meg. A tulajdonság a fedett nyakúsággal szemben domináns. Homozigóta kopasznakúak esetében a nyak teljesen csupasz, míg a heterozigóta egyedek esetében elől, a nyak alsó részén – már naposcsibéken is jól megfigyelhető – tollpamacs van. A fejtetőn szintén kevés toll található. Sokféle színváltozatban fordult elő, korábban legelterjedtebb a fehér volt. Testalkata hasonlít a magyar tyúkéra, de annál nagyobb törzsű, hosszabb és tojásdad alakú, melle kerek, mint a vadmadaraké. Szárnya hosszabb és hegyesebb. A kakasok testsúlya átlagosan 2,5-3,0 kg, a tojóké 2,0-2,3 kg.

Az erdélyi kopasznakú tyúkfajtákat a 20. század első felében még elsőrendű gazdasági tyúkként tartották nyilván. Rendkívül edzettek, erősek és ellenállóak. Gyorsan fejlődnek és gyorsan tollasodnak. Számukra megfelelő környezetben kitűnő tojástermelők, tojásaik súlya a 70 g-ot is meghaladhatja. A tojások általában barna- vagy krémszínűek, de előfordulnak fehérhéjúak is (Szalay, 2015).

Több színváltozatát is megkülönböztetjük, melyek közül leggyakoribbak: Fehér-, Fekete- és Kendermagos erdélyi kopasznakú.

A jelen dolgozatban végzett vizsgálataimban a Fekete- és Kendermagos erdélyi kopasznakú tyúkokat alkalmaztam.

A kakas jellemzői:

Feje középnagy, gömbölyded. A tetejét fedő tollazat szorosan a koponyához tapad és hátul hegyben fut össze. Egyszerű taraja közép nagyságú, lehetőleg aprón csipkézett. Arca tollatlan, füllebenye kicsiny, kerekded, áll-lebenye középhosszú, tojásdad és lelógó. Nyaka tollatlan, hosszú

és izmos, de sohasem vaskos. A nyak tövében a törzs tollazata a kondorkeselyűéhez hasonló tollbodorban végződik. A kiálló vérvörös begytől végig a hason, egészen a végbélig a törzs csupasz, tollatlan. Melle széles és igen húsos. Az egyenes, hosszú mellcsont fölött a bőr csupasz és azt csak a kétoldalt ráboruló tollazat takarja. Háta széles. Szárnya elég hosszú, erős, majdnem vízszintes tartású. Farka hátrafelé hajló, nem meredek tartású, a tollazat dús, a sarló tollak hosszúak. Combja izmos, hosszú. A közepesnél valamivel hosszabb láb tollatlan és finom, de erős csontozatú. Az egyenes, szétálló lábujjak száma négy.

A tojó jellemzői:

A nemi különbséget és a kisebb testméretet leszámítva, a kakasával egyezik.

#### *4.1.2.1. Fekete erdélyi kopasznyakú*

A tyúkokra és kakasokra is sötét palaszínű csőr, narancsvörös szem, palaszínű lábak és fekete tollazat (acélkékes vagy zöldes zománcozottsággal) jellemző. Mindkét ivar taraja, arca, áll- és füllebenye élénk piros (Szalay, 2015). (9. ábra)



**9. ábra.** Fekete erdélyi kopasznyakú tyúk ([www.genmegorzes.hu](http://www.genmegorzes.hu))

#### 4.1.2.2. *Kendermagos erdélyi kopasznyakú*

A tyúkokra és kakasokra is csontfehér csőr, narancsvörös szem, hússzínű lábak, fehér körmök és kékesszürke tollazat (sötét vagy fekete színhatású, keskeny keresztsávokkal) jellemző. Mindkét ivar taraja, arca, áll- és füllebenye élénk piros (Szalay, 2015). (10. ábra)



10. ábra. Kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk ([www.genmegorzes.hu](http://www.genmegorzes.hu))

## 4.2. Kísérleti állatok, állatkísérletek

A kísérletekben résztvevő állatok tartása a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK HGI) történt és megfelelt a Magyar Állatvédelmi Törvénynek (1998. XXVIII), továbbá a NBGK HGI rendelkezik a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állat-egészségügyi és Állatvédelmi Igazgatóságának állatkísérleti engedélyével. Az embrió manipulációs kísérletek követték az Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézet (NAIK MBK) Állatbiotechnológiai Főosztály szabványos protokolljait, a vizsgálatokat az intézet jóváhagyásával végeztem.

## 4.3. A kísérleti állomány tartástechnológiája

Az ősisarsejt vonalak alapításához használt termékeny tojások a NBGK HGI génbanki állományától származtak. Az intézetben tartott őshonos tyúkfajtákat nagy kültéri kifutóval rendelkező istállóban tartják. Az állománysűrűség 5-6 db/m<sup>2</sup>, az ivararány 7 tyúk : 1 kakas. A

tojások tiszta, száraz gyűjtésére tojófészek állnak rendelkezésre (5 tojó/fészek). A fészekrendszer 2 szintes. A tenyészállomány takarmányozása tojótáppal történik, mészgritt kiegészítés mellett.

A tojásgyűjtést naponta kétszer végzik. Ezután a tenyésztojások a hűtött tojástárolóba kerülnek. A tojások keltetése egy Midi F500S keltetőgépben (PL Maschine Kft.) zajlik 37,8°C-os hőmérsékleten 60-65 %-os páratartalom mellett.

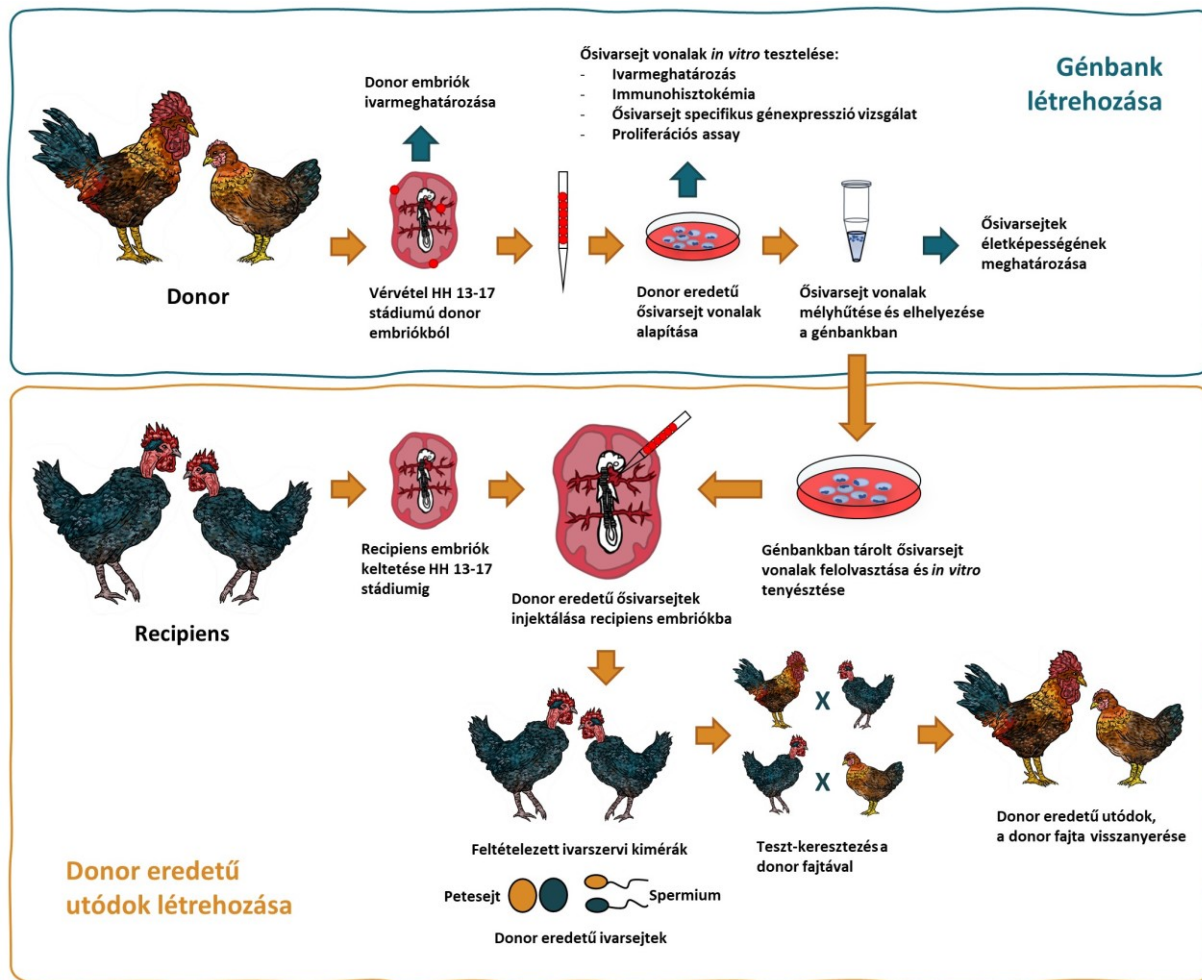
A kikelt naposcsibéket 4 hetes korig a kísérleti állatházban elhelyezett ún. nevelő inkubátorban neveltük 0,5 m<sup>2</sup>/10 állat alapterületen, zeolit alomra kihelyezve, *ad libitum* indítótáp takarmányozás mellett. A készülék belmagassága 40 cm, előlről teljesen átlátszó plexi borítja. Természetes megvilágítás biztosított, de szükség esetén belső világítás is alkalmazható volt. A hőmérsékletet fokozatosan hetente csökkentettük 30°C-ról a végső 22-24°C-ra.

A növényeket 4 hét után kis csoportban (10-15 állat) zeolit / puhafa forgács mélyalomra helyeztük ki 2 m<sup>2</sup> alapterületre. 16 hetes kortól az állományt nagyobb alapterületű fülkékben, szintén mélyalomra telepítettük át. Ez a mélyalmos elhelyezés a kísérleti, zárt istállón belül történt, rácselemekkel elválasztott, mobilan változtatható méretű, felülről nyitott területen. A takarmányozás *ad libitum* indító-, majd nevelőtáp volt. A megvilágítás természetes, de szükség esetén fényprogrammal is szabályozható. A hőmérséklet a fajnak megfelelő 20-22°C volt.

#### 4.4. Ősivarsejtek izolálása az embrióból

Egyedileg vettem vért HH 13-17 stádiumú (2,5-3 napos) embriókból, melyhez (az előzetes alkoholos áttörléssel fertőtlenített) tojásokat először egy üveg Petri csészébe törtem fel, így az embrió teljes érhalózata hozzáférhetővé vált. Következő lépésként sztereo-mikroszkóp alatt steril, húzott üvegkapilláris (~ 20 µm -es vég átmérő) és szájpipetta segítségével 1-3 µl vért szívtam le az embriók dorzális aortájából, melyet azonnal tenyésztő edényben (48 lyukú műanyag plate) levő tyúk ősivarsejtek számára kifejlesztett speciális médiumba (1. táblázat) helyeztem (Whyte et al., 2015). Az izolált embriókból minden esetben szövetmintát vettem későbbi ivarmeghatározás céljára, melyet -20°C-on tároltam későbbi feldolgozásig. Minden esetben rögzítettem az izolálás időpontját, az embriók pontos korát (HH stádiumok) és hogy tapasztalható volt-e valamilyen fejlődési rendellenesség. A folyamat általános bemutatása az 11. ábrán látható.





**11. ábra. Donor eredetű utódok létrehozása génbankban tárolt ösivarsejtek segítségével.** A HH 13-17-es stádiumú donor embriókból egyedi vérvétel szükséges, majd a gyűjtött vérmintákat az ösivarsejtekre specifikus tápoldatba helyezük. A tenyésztés során az ösivarsejtek osztódnak, míg a vér egyéb sejtjes elemei eliminálódnak, így stabil és homogén ösivarsejt vonalak alakíthatók ki. A kapott sejtvonalakat *in vitro* jellemzésnek vetjük alá: ivarmeghatározás, összejt-, és ösivarsejt-specifikus markerek immunohisztokémiai és génexpressziós vizsgálata és proliferációs assay. A megfelelő minőségű sejtvonalakat mélyhűtjük és elhelyezzük a génbankban. Szükség esetén a génbankban tárolt mintákat felolvasztjuk, majd további tenyésztéssel felszaporítjuk. Az ösivarsejteket HH 13-17-es stádiumú recipiens embriók keringésébe injektáljuk, ahol a donor PGC-k a recipiens embrió saját ösivarsejtjeihez hasonlóan, a vérkeringés segítségével eljutnak az ivarszervekig. Az ezzel a módszerrel létrehozott feltételezett ivarszervi kiméra egyedeket egymással vagy a donor fajtával keresztezve, a donor fajta visszanyerhető. (Ábra: Lázár Bence, Grafika: Pataki Luca)

#### 4.5. Ösivarsejtvonalak alapítása és fenntartása – sejtenyésztés

Az embrióból izolált vért, mely tartalmazta a vér sejtjes elemeit és az ösivarsejteket is, 3 hétig tenyésztettem *in vitro* ösivarsejt specifikus médiumban (Whyte et al., 2015) CO<sub>2</sub> termosztátban 38°C-on 5% CO<sub>2</sub> koncentráció mellett. Ez az időtartam elegendő arra, hogy az ösivarsejteken kívül minden egyéb sejttípus eliminálódjon a tenyésztő edényből. Az ösivarsejtek a számukra specifikus tápoldatnak köszönhetően (1. táblázat) osztódásnak indultak és homogén sejtpopulációt hoztak létre. Ha az egy embrióból alapított tenyészet sejt száma elérte 3 hét alatt az  $1,0 \times 10^5$  ösivarsejtet,

akkor sikeresnek tekintettem a sejtvonal alapítást. Az ősvarsejtek a médiumban szabadon úsztak, a tenyésztő edény nyugalmi állapotában az edény alján, de arra nem letapadva, helyezkedtek el. Ezért a médium csere minden második nap a médium egyharmadának óvatos eltávolításával, majd friss médiummal való pótlásával történt. Heti egy alkalommal a teljes sejtmennyiség szuszpendálásra is sor került. Ekkor steril 1,5 milliliteres Eppendorf csőbe helyeztem a sejtsuszpenziót, majd centrifugáltam a sejteket (800 x g, 4 perc). Ezt követően a felülúszót eltávolítottam, majd a pelletet friss médiumban szuszpendálva új tenyésztő edénybe helyeztem ki a sejteket.

**1. táblázat. Házityúk ősvarsejt specifikus tápoldat komponensei (Whyte et al., 2015).**

<b>Komponens</b>	<b>Mennyiség 50 ml PGC médiumhoz</b>
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	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)	0,075 ml
Ovalbumin (20%, Sigma A5503)	0,5 ml
Heparin (50mg/ml, Sigma H3149)	0,1 ml
Pen/Strep (100x)	0,1 ml
Házityúk szérum (0.2% végkoncentráció)	100 µl
h-ActivinA (25ug/ml)	50 µl
h-FGF2 (10 ng/ul)	20 µl
Ovotransferin (10mg/ml)	25 µl

#### 4.6. Ősivarsejtvonalak jellemzése *in vitro*

Az alapított ősivarsejtvonalakat *in vitro* elemzésnek vetettem alá, hogy meghatározzam az alapvető jellegzetességeiket, illetve megbizonyosodjak róla, hogy valóban homogén sejtpopulációkat kaptam, amelyek rendelkeznek az ősivarsejtekre jellemző sajátosságokkal.

##### 4.6.1. DNS izolálás és ivarmeghatározás

Az embriókból történő vérvétel során gyűjtött embrionális szövetdarabokat lízis pufferben tártam fel. A feltárást követően DNS-t izoláltam (High Pure PCR Template Preparation Kit; Roche Diagnostics, US), majd a DNS mintákat hígítottam 25 ng/ µl-es koncentrációra. A DNS koncentrációt NanoDrop Spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével határoztam meg, majd a mintákat -20°C-on tároltam későbbi felhasználásig. Ezt követően kezdetben a P2-P8 (Griffiths et al., 1998), majd később CHD1 primer pár (Lee et al., 2010) (2. táblázat) segítségével sex PCR-t végeztem (MyTaq Red Mix; Bioline Reagents Ltd., UK), melynek paramétereit az M2 melléklet tartalmazza. A PCR termékeket gélelektroforézis segítségével 1,5%-os agaróz gélen 90 V-on 30 percen keresztül futtattam, majd az eredményeket a ChemiDoc XRS+ (Bio-Rad Laboratories, Inc., CA, USA) berendezéssel dokumentáltam.

2. táblázat. Ivmeghatározáshoz használt primerek szekvenciái és jellemzői.

Primer megnevezése	Referencia szám	Szekvencia		PCR termék hossza (bp)	Forrás
P2/P8-Z	NC_006127.4	FW	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	345	Griffiths et al 1998
		RV	CTCCCAAGGATGAGAAATTG		
P2/P8-W	NC_006126.4	FW	TCTGCATCGCTAAATCCTTT	362	
		RV	CTCCCAAGGATGAGAAATTG		
CHD1-Z	NC_006127.4	FW	TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT	461	Wang et al. 2007
		RV	CCTTTT ATTGATCCATCAAGCCT		
CHD1-W	NC_006126.4	FW	TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT	322	
		RV	CCTTTT ATTGATCCATCAAGCCT		



#### 4.6.2. Immunohisztokémiai vizsgálatok

Az ősvarsejt tenyészetekből mintát vettem, ezt követően centrifugáltam a sejtszuszpenziót, majd 20 mikroliternyi PBS-ben szuszpendáltam fel a pelletet. A szuszpenziót kicsöppentve, a sejteket rászárítottam a tárgylemez felületére. Ezt követően 4%-os paraformaldehidben (PFA-ban) fixáltam a cseppeket. Az immunhisztokémiai festés során használt protokollt a 3. táblázat, a felhasznált elsődleges és másodlagos ellenanyagokat és azok hígításait a 4. táblázat tartalmazza. A kész lemezek elemzését konfokális mikroszkóp segítségével végeztem el (Leica TCS SP8, Leica Ltd., Germany).

3. táblázat. Immunhisztokémia protokoll lépései.

	Festés lépései	Oldat	Inkubálási idő	Inkubálási hőmérséklet	Megjegyzés
1	Ősvarsejt 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)	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 (2nd Ab)	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

**4. táblázat. Immunhisztokémiai vizsgálatok során felhasznált anyagok.**

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)
anti-DAZL	ab34139	1:200	nyúl IgG	ősivarsejt
Donkey anti-rabbit IgG (H+L) - Alexa Fluor 555	A-31572	1:500	szamár IgG	anti-rabbit IgG
Donkey anti-Mouse IgM ( $\mu$ ) - Alexa Fluor 488	715-485-140	1:400	szamár IgG	anti-mouse IgM
TO-PRO™-3 Iodide (642/661)	T3605	1:500 (1 $\mu$ M)		
szamár szérum (DS)	017-000-121	6 g / 100 ml		
ProLong® Gold Antifade beágyazó médium	P36934	10 $\mu$ l		

#### **4.6.3. RNS izolálás, cDNS írás és kvantitatív real-time PCR**

Az alapított ősvarsejt vonalakból RNAqueous™-Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) (Lázár et al., 2018) segítségével izoláltam a teljes RNS spektrumot a gyártó protokolljának megfelelően. Az RNS koncentrációt NanoDrop Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével határoztam meg, majd a mintákat -70°C-on tároltam későbbi felhasználásig. cDNS íráshoz High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-et használtam (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, US) a gyártó előírásai alapján (a reakció paraméterei megtalálhatók az M2 mellékletben). Az elkészült cDNS-t -20°C-on tároltam későbbi felhasználásig. A kvantitatív real-time PCR-ek SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, US) - mely egy dupla szálú fluoreszcens DNS specifikus festék - segítségével készültek a gyártó ajánlásai alapján (a reakció paraméterei megtalálhatók az M2 mellékletben). A vizsgálatokban szereplő minden gén esetében három parallel mérést végeztem, mely során detektáltam a fluoreszcens emissziót, majd a GenEx (MultiD, SE) szoftver segítségével kalkuláltam a relatív expressziókat. A kvantitatív real-time PCR során felhasznált primereket és azok részletes adatait az 5. táblázat tartalmazza.

5. táblázat. A kvantitatív real-time PCR során felhasznált primerek és azok részletes adatai.

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 RV CTTGGACTTTGCCAGAGAGG	112
<i>cPOUV</i>	POU domain class 5 transcription factor 3 ( <i>Pou5f3</i> ) ( <i>Gallus gallus</i> )	NM_001110178.1	FW GAGGCAGAGAACACGGACAA RV TTCCCTTCACGTTGGTCTCG	109
<i>CVH</i>	DEAD-box helicase 4 ( <i>DDX4</i> )( <i>Gallus gallus</i> )	NM_204708.1	FW GAACCTACCATCCACCAGCA RV ATGCTACCGAAGTTGCCACA	113

#### 4.6.4. Proliferációs assay

Az ősvarsejtek osztódóképességét és az osztódás sebességét proliferációs assay segítségével vizsgáltam. Az ugyanahhoz a fajtához tartozó sejtvonalakat egy kísérlet keretében mértem, minden vonalat egyedileg, három párhuzamos mintát alkalmazva. A mérést három napon keresztül minden nap ugyanabban az időpontban végeztem. Először minden sejtvonal esetében sejtszámolást végeztem (Arthur<sup>TM</sup> Cell Counter, Nanoentek, AT1000), majd kiosztottam a sejteket 5000 sejt/ well sűrűségben 96-lyukú tenyésztőedénybe. Minden nap a mérést megelőzően 4 órán át, 38°C-on inkubáltam a sejteket CCK-8 (Sigma-Aldrich, 96992) reagenssel, 100 mikroliternyi médiumhoz 10 mikroliter CCK-8 reagenst adva. A CCK-8 reagens élénk narancssárga színváltozással reagál az élő sejtek jelenlétére, vagyis azok által termelt anyagcsere termékre, annak koncentrációját jelezve ezzel. (A narancssárga szín egy formazán festék, mely a WST-8 vegyület bioredukciója által keletkezik egy elektron transzport mediátor (1-Methoxy PMS) jelenlétében.) A keletkező szín intenzitása egyenesen arányos az élő sejtek számával, így az abszorbancia mérésével a sejtszám változásban bekövetkező változás nyomon követhető lesz. A CCK-8 abszorbancia mérése egy CLARIOstar Plus Microplate Reader (BMG Labtech, Germany) készülék segítségével történt. Az így kapott abszorbancia értékekből kiszámoltam minden sejtvonal duplikációs idejét (doubling time, DT), amely a sejtszám megduplázódáshoz szükséges napok száma. A DT értékek kalkulációjához a következő összefüggést használtam:  $DT = d * \log(2) / \log(A_t) - \log(A_0)$ , ahol d: mérések között eltelt napok száma,  $A_t$ : abszorbancia a harmadik napon,  $A_0$ : abszorbancia az első napon (Kong et al., 2018).

#### **4.6.5. Mikroszatellit markerek vizsgálata**

A sejtvonalakból származó DNS minták koncentrációját NanoDrop spektrofotométer (Thermo Fisher Scientific USA) segítségével mértem, 5 ng/μl töménységűre hígítottam, majd további felhasználásig -20°C-on tároltam.

Az általam használt 17 mikroszatellit marker (6. táblázat) az AVIANDIV projektből került kiválasztásra (<https://aviandiv.fli.de/>), hiszen korábbi információinkat a fajtákról szintén ezen markerek segítségével kapták kollégáim. A vizsgálat során úgynevezett farkas primereket használtam (Blacket et al., 2012). Ennek lényege, hogy nem közvetlenül jelölt primerekkel dolgoztam, hanem azok forward szekvenciáinak 5' vége elé különböző, vagy azonos szekvenciákat, de eltérő fluoreszcens jelöléssel raktam (WELL-RED festékek: D2, D3, D4). Így a megfelelő optimalizálással különböző marker szetteket alakítottam ki a PCR reakciókon belüli multiplexálással (7 multiplex, 1 szimplex PCR) és/vagy a PCR termékek poolozásával (I-MCW0206; B-F, H, A-D; C) a fragmens analízis során, vagyis egyidejűleg több markerrel végeztem el a genotipizálást (6. táblázat).

A master mix 5 μM primert, 20mM MgCl<sub>2</sub>-ot (10x Dream Taq Buffer, Thermo Scientific), 25mM dNTP mixet (Thermo Scientific) és 5U/μL Taq DNS polimeráz emzimet (Dream Taq DNA polymerase, Thermo Scientific) tartalmazott. Az egy multiplex PCR reakcióban lévő primerek arányát az amplifikációjuk erősségét figyelembe véve változtattam, azonban mindegyikre érvényes, hogy egy adott primer farkas forward szekvenciájának mennyisége mindig fele annyi, mint a reverse, és megegyezik a hozzá tartozó jelölt farok szekvencia mennyiségével. Vagyis egy adott primer farkas forward és reverse, valamint a hozzá tartozó jelölt farok szekvenciáinak aránya 1:2:1. A PCR reakció paramétereit az M2 melléklet tartalmazza.

A PCR termékek detektálása kapilláris gélelektroforézissel, automata DNS szekvenátor használatával történt (GenomeLab™ GeXP Genetic Analysis System, Beckman Coulter, CA, USA), a gyártó leírása alapján. Az allélméreték meghatározásához 400 bp hosszúságú allél létrát használtunk (400 bp size standard). A kapott eredményeket a GenomeLab Genetic Analysis System program segítségével (Beckman Coulter, Inc. 4300 North Harbor Boulevard, Fullerton, CA 92834-3100) mintánként értékeltem. A populáción belüli beltenyésztettségi értéket ( $F_{IS}$ ) és annak szignifikanciáját az FSTAT program (Goudet, 2001) használatával határoztam meg.

**6. táblázat. A mikroszatellit markerek vizsgálata során használt primerek.** A táblázatban láthatók a markerekből kialakított szettek, az egyes primerek optimalizált tapadási hőmérséklete (T(m)), a várható allélméretetek, a fluoreszcens jelölés feltüntetésével (D2: fekete, D3: zöld, D4: kék), valamint az alkalmazott farok szekvenciák.

Marker szettek	Mikroszatellit marker	T(m)	Várható allélméretetek (bp)
<b>I</b>	MCW0222	60°C	237-243
	MCW0098	60°C	278-282
<b>MCW0206</b>	MCW0206	56°C	239-267
<b>B</b>	ADL0268	60°C	119-133
	MCW0248	60°C	222-272
	MCW0020	60°C	196-202
<b>F</b>	MCW0103	60°C	284-288
	MCW0067	60°C	194-204
<b>H</b>	LEI0166	56°C	371-387
	LEI0234	56°C	234-382
	MCW0037	56°C	171-177
<b>A</b>	LEI0094	60°C	265-305
	MCW0216	60°C	157-167
<b>D</b>	MCW0014	56°C	182-200
	ADL0112	56°C	137-151
<b>C</b>	ADL0278	60°C	132-144
	MCW0034	60°C	230-264
<b>Jelölt farok szekvenciák</b>			
<b>Tail A D2</b>	5'-CAGGACCAGGCTACCGTG-3'		
<b>Tail B D3</b>	5'-CGGAGAGCCGAGAGGTG-3'		
<b>Tail C D4</b>	5'-CAGGACCAGGCTACCGTG-3'		

#### **4.7. Ősivarsejt vonalak jellemzése *in vivo***

A tenyésztett ősivarsejteket *in vivo* jellemzésnek is alávettem, mely során célom a sejtek megfelelő működésének és vándorlási képességének vizsgálata volt fluoreszcensen jelölt sejtek segítségével.

##### **4.7.1. A mélyhűtött/felolvasztott sejtek fluoreszcens jelölése**

A tenyészetben fenntartott ősivarsejteket egy *in vivo* sejtfelületi festékkel jelöltem, mely fluoreszcens tulajdonságainak köszönhetően könnyen nyomon követhető az embrióban. Az ősivarsejteket centrifugálással választottam el a tenyésztő médiumtól, majd egy steril 1x PBS-es mosást követően alkalmaztam a piros (PKH26 Red Fluorescent Cell Linker, Sigma Aldrich, MIDI26-1KT), illetve zöld (PKH67 Green Fluorescent Cell Linker, Sigma Aldrich, MIDI67-1KT) festékeket a gyártó útmutatását követve. A frissen jelölt sejtek fluoreszcenciáját konfokális mikroszkóppal (Leica TCS SP8, Leica Ltd., Germany) ellenőriztem, majd visszahelyeztem őket CO<sub>2</sub> termosztátba későbbi felhasználásig.

##### **4.7.2. A fluoreszcensen jelölt sejtek recipiens embrióba történő bejuttatása injektálással**

A fluoreszcensen jelölt ősivarsejteket összegyűjtöttem, majd megszámláltam (Arthur<sup>TM</sup> Cell Counter, Nanoentek, AT1000). Centrifugálást követően DMEM és steril víz 2:1 arányú keverékében szuszpendáltam fel (a teljes ősivarsejt tenyésztő médium egyes komponensei hatással lehetnek az embrió fejlődésre, ezért egyszerűsített médiumot használtam) a sejt pelletet.

A recipiens tojások héján alkoholos fertőtlenítést követően 1 cm átmérőjű lyukat nyitottam, majd 1 µl-t injektáltam (~3-5000 ősivarsejt) az előkészített sejtszuspenzióból a 2,5 napos recipiens embriók szívébe. Az injektálás egy húzott üvegapilláris segítségével történt, melynek átmérője a hegyes végén ~20 µm volt. Az injektálást követően ~50 µl steril, előmelegített 1x PBS-t csöppentettem az embrióra, majd 2 réteg steril laboratóriumi parafilm segítségével lezártam a nyílást és egyedi jelölést követően a tojást visszahelyeztem a keltetőbe.

#### ***4.7.3. Az injektált sejtek ivarszervbe történő integrációjának ellenőrzése***

Az injektálást követően, 6 napos korban a tojásokat felbontottam, majd az embriók ivarszerveit kiboncoltam. Az ivarszerveket steril 1x PBS-ben mostam, majd 4 %-os PFA-ban fixáltam egy éjszakán keresztül. A fixált ivarszervekben fluoreszcens sztereo-mikroszkóp (Leica M205 FCA, Leica Ltd., Germany) segítségével azonosítottam az injektált sejteket, melyekről fotódokumentációt készítettem. Minden esetben rögzítettem az elhalt embriók számát és ha lehetett, a pusztulás okát is.

#### **4.8. Ősivarsejt vonalak mélyhűtése**

Az alapított ősivarsejt vonalak fagyasztását frissen összemért ősivarsejt fagyasztó médiummal végeztem, mely a következő komponenseket tartalmazta: DMEM (Gibco, 21068-028) és steril víz (Gibco, 15230-089) 2:1 arányban, továbbá 8 % DMSO (SIGMA, D2650), 10 % házityúk szérum (Sigma Aldrich, C5405) és 0,75% 20 mM-os CaCl<sub>2</sub> (Sigma Aldrich, C4901). Az ősivarsejteket óvatosan szuszpendáltam a tenyésztő edény aljáról, majd 1,5 ml Eppendorf csőbe pipettáztam át. A centrifugálást (1000 x g, 3 perc) követően a felülúszót eltávolítottam, majd 250 µl DMSO mentes ősivarsejt fagyasztó médiumban szuszpendáltam a sejteket és átmértem feliratozott fagyasztó csőbe. Ehhez 250 µl ősivarsejt fagyasztó médiumot adtam lassan, cseppenként, majd a csövet -70°C-os mélyhűtőbe helyeztem. Hosszú távú tárolás esetén egy éjszaka után a mintákat -150°C-ra, vagy folyékony nitrogénbe helyeztem át. Minden sejtvonal esetében leszámoltam a mélyhűtésre kerülő sejtek számát, illetve meghatároztam az élő és elpusztult sejtek arányt a fagyasztást megelőzően (Arthur<sup>TM</sup> Cell Counter, Nanoentek, AT1000).

#### **4.9. Ősivarsejt vonalak felolvasztása**

Az ősivarsejtek felolvasztásához 37°C-os vízfürdőt használtam, majd a fagyasztó cső teljes tartalmát 2 ml ősivarsejt tenyésztő médiumba pipettáztam át. Centrifugálást (1000 x g, 3 perc) követően a felülúszót leszívtam, majd friss ősivarsejt tenyésztő médiummal való szuszpendálás után a sejteket tenyésztő edénybe helyeztem ki és tovább tenyésztettem.

#### 4.10. Génbank létrehozása ősvarsejtek felhasználásával

A fajták embrióiból létrehozott egyedi ősvarsejt vonalakat kezdetben 48-lyukú, majd 24-lyukú tenyésztő edényben tartottam fent. A sejtek osztódását követve, amikor kitöltötték a rendelkezésre álló felületet, megfeleztem őket, így alakítva ki minden sejtvonalból hat párhuzamos tenyészetet. Az így létrehozott sejtmennyiséget hat párhuzamos, 2 ml-es fagyasztócsőben mélyhűtöttem a 4.8. fejezetben leírtaknak megfelelően. Az így kapott mélyhűtött ősvarsejt tenyészetekből sejtvonalanként három fagyasztócsőnyi mennyiséget a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ Haszonállat-génmegőrzési Intézetének (NBGK HGI) Génbankjában helyeztem el folyékony nitrogénben, míg három csövet a Nemzeti Agrárkutatási és Innovációs Központ Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóintézetében (NAIK MBK) erre a célra üzembe helyezett -150°C-os mélyhűtőjében helyeztem el. A szeparált tárolás, biztonsági intézkedésként szolgál, ha esetleg valamelyik intézetben nem várt esemény következne be. Az összes alapított sejtvonalból megfelelő lízis pufferbe sejtszuspenziót is legyűjtöttem, későbbi RNS és DNS izolálás céljából. Ezeket a csöveket szintén a NAIK MBK -150°C-os mélyhűtőjében tároljuk.

#### 4.11. A donor fajta visszanyerése ősvarsejtek injektálásával és keresztezéssel

Céлом annak bizonyítása volt, hogy az egyedi embriókból alapított ősvarsejt vonalak *in vitro* fenntartást és mélyhűtést követően is alkalmasak recipiens embriók ivarszervébe beépülni, ott az állat kikelését és ivaréretését követően ivarérett ivarsejteké differenciálódni, végül pedig az ivarszervi kiméra egyedek keresztezésével donor eredetű utódot létrehozni. Ehhez a Fogolyszínű magyar fajtát választottam donor fajtának és a Fekete erdélyi kopasznnyakú fajtát recipiensnek.

Ezt a döntést arra alapoztam, hogy a fogolyszín kialakulása recesszív tulajdonság, míg a kopasznnyakúságé domináns. Így, ha kopasznnyakú recipiensbe Fogolyszínű magyar ősvarsejteket ültetünk be, majd az ivaréretés után Fogolyszínű magyar egyedekkel keresztezzük vissza a recipienst, tiszta fedettnyakú Fogolyszínű magyar csibét csak abban az esetben kapunk, ha az egyedek kialakító mindkét ivarsejt a Fogolyszínű magyar fajtától származik. Mivel minden alapított Fogolyszínű magyar embrióból alapított sejtvonal esetében megtörtént a mikroszatellit marker analízis, a kapott utódokat ez alapján is ellenőrizni tudtam.



#### ***4.11.1. Donor eredetű ősvarsejtek injektálása recipiens embriókba***

A recipiens embrióba történő injektálás menete alapvetően megegyezett az 4.7.2. fejezetben ismertetett protokollal, kivéve az alábbiakat: Ebben a kísérletben nem volt szükség a sejtek fluoreszcens jelölésére, hiszen az injektált egyedek kikeltetése és felnevelése volt a célom. Mivel az injektálás pillanatában nem ismertem a recipiens embriók ivarát, így egy-egy előzetesen véletlenszerűen kiválasztott Fogolyszínű magyar hím- és nőivarú sejtvonalat 1:1 arányban keverve injektáltam minden Fekete erdélyi kopasznnyakú recipiens embrióba. Ezzel a módszerrel növelve a sikeres beépülés lehetőségét és optimalizálva a szükséges injektálások számát (Lásd: 11. ábra).

#### ***4.11.2. Recipiens embriók keltetése, az embrionális fejlődés ellenőrzése***

A recipiens tojások keltetése egy Midi F500S keltetőgépben (PL Maschine Kft.) zajlott 37,8°C-os hőmérsékleten 60-65 %-os páratartalom mellett. Az injektálást követően a tojások visszakerültek a keltetőbe kikelésig. A tojások ellenőrzése lámpázással zajlott először a keltetés 10. napján. A lámpázás során eltávolított tojásokat felbontottuk és rögzítettük az embrió pusztulásának okát.

#### ***4.11.3. A kapott ivarszervi kiméra egyedek tesztkeresztése***

A tesztpárosításhoz az általam keltetett és felnevelt potenciálisan ivarszervi kiméra Fekete erdélyi kopasznnyakú tojókat és Fekete erdélyi kopasznnyakú kakasokat egyedi ketreces tartásban helyeztünk el. Az állatok granulált tojótápot fogyasztottak, önitatókból ittak *ad libitum*. A megvilágítás, természetes fény mellett, mesterséges kiegészítéssel történt, napi 16 óra időtartamban. A tojásokat naponta kétszer gyűjtöttük, egyedileg jelöltük, és a felhasználásig tojástároló helyiségben helyeztük el őket.

A tesztpárosításokhoz a Fogolyszínű magyar fajtát használtuk, amely egyedeket szintén egyedi ketrecekben helyeztük el. A Fekete erdélyi kopasznnyakú kakasok spermájával egyedenként két Fogolyszínű magyar tyúkot termékenyítettünk. A Fekete erdélyi kopasznnyakú tyúkokat 5 darab Fogolyszínű magyar kakas kevert spermájával termékenyítettük.

#### ***4.11.4. Ondóvétel és mesterséges termékenyítés***

A kakasoktól az ondóvétel dorso-abdominális masszázstechnikával történt (Burrows and Quinn, 1935) az első héten heti 3 alkalommal, az ezt követő hetekben heti két alkalommal két hónapon keresztül, a kéthetes trenírozási időszakot követően. A tojók mesterséges termékenyítése a Bakst és Dymond által leírtak szerint történt (Bakst and Dymo, 2013).

#### **4.12. Statisztikai módszerek**

Az adatok elemzéséhez az Excel (MS Office), RStudio (Version 1.3.959), R (R-4.0.2), a GeneEx 6.0 valamint a Microsatellite Toolkit (Park, 2002) szoftvereket használtam. A szignifikancia szinteket a következők szerint határoztam meg: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , és \*\*\* $p < 0,001$ . A duplikációs idő (DT) adatok esetében a csoportokat Mann-Whitney tesztek segítségével hasonlítottam össze. A qPCR-es vizsgálatok esetében a target gén expressziójának változását a belső kontroll gén referencia értékéhez képest a  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  formulával számoltam, melyben  $\Delta C_t = C_t$  (target gén) –  $C_t$  (belső kontroll), valamint  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t$  (teszt minta) –  $\Delta C_t$  (kontroll minta).

## 5. EREDMÉNYEK

### 5.1. Őshonos magyar tyúkfajták ősivarsejt vonalainak alapítása

Hat őshonos magyar fajtaból alapítottam sikeresen ősivarsejt vonalakat. Minden fajta esetében egyedi tenyészeteket hoztam létre, vagyis az adott tenyészet egy embrió vérében található ősivarsejtekből származott. Az alapítási arányt az összes vérvételre vetített sikeres sejtvonal alapítások számával határoztam meg. Összesen 396 vérvételből 166 sikeres vonal alapítás történt, mely a hat fajtára 42,0 %-os átlagos alapítási aránynak felel meg. Három fajta esetében az alapítási arány az átlagosnál magasabb volt: a Sárga magyar – 50,0 %, a Fehér magyar – 47,6 % és a Kendermagos magyar – 48,7 %. A Fekete- és Kendermagos erdélyi kopasznyakú fajtáknál az átlaghoz közeli 39,7 % és 37,5 %-os értékeket kaptam, míg a Fogolyszínű magyar fajta alapítási aránya bizonyult a legalacsonyabbnak 28,4 %-kal (7. táblázat). A sejtvonal alapításnál a cél minimum 20 egyedi embrióból származó stabil sejtvonal kialakítása volt, melyet sikerült teljesítenem. Stabil sejtvonalnak tekintettem minden olyan tenyészetet, melyben 3 hét, *in vitro* tenyésztést követően  $1,0 \times 10^5$  vagy több ősivarsejt volt található. A vérvételek számát az adott időszakban hozzáférhető tojások mennyisége, azok termékenysége és a kísérlet napján megfelelő stádiumban lévő embriók száma határozta meg.

**7. táblázat. Magyar őshonos fajtákból alapított ősivarsejt vonalak és az eltárolt génbanki minták száma. Az alapítási arány az összes vérvételre vonatkoztatott sikeres sejtvonal alapítások száma százalékban.**

Magyar őshonos fajták	Vérvétel (db)	Alapított sejtvonal (db)	Hímivarú sejtvonal (db)	Nőivarú sejtvonal (db)	Alapítási arány (%)	Génbanki minták (db)
Sárga magyar	80	40	29 (72,5%)	11 (27,5%)	50,0%	240
Fehér magyar	42	20	14 (70,0%)	6 (30,0%)	47,6%	120
Kendermagos magyar	76	37	27 (73,0%)	10 (27,0%)	48,7%	222
Fogolyszínű magyar	74	21	17 (81%)	4 (19,0%)	28,4%	126
Fekete erdélyi kopasznnyakú	68	27	23 (85,2%)	4 (14,8%)	39,7%	162
Kendermagos erdélyi kopasznnyakú	56	21	11 (52,4%)	10 (47,6%)	37,5%	126
Átlag	66,0	27,7	20,2	7,5	42,0%	166,0
Összesen	396	166	121 (72,3%)	45 (27,7%)	-	996

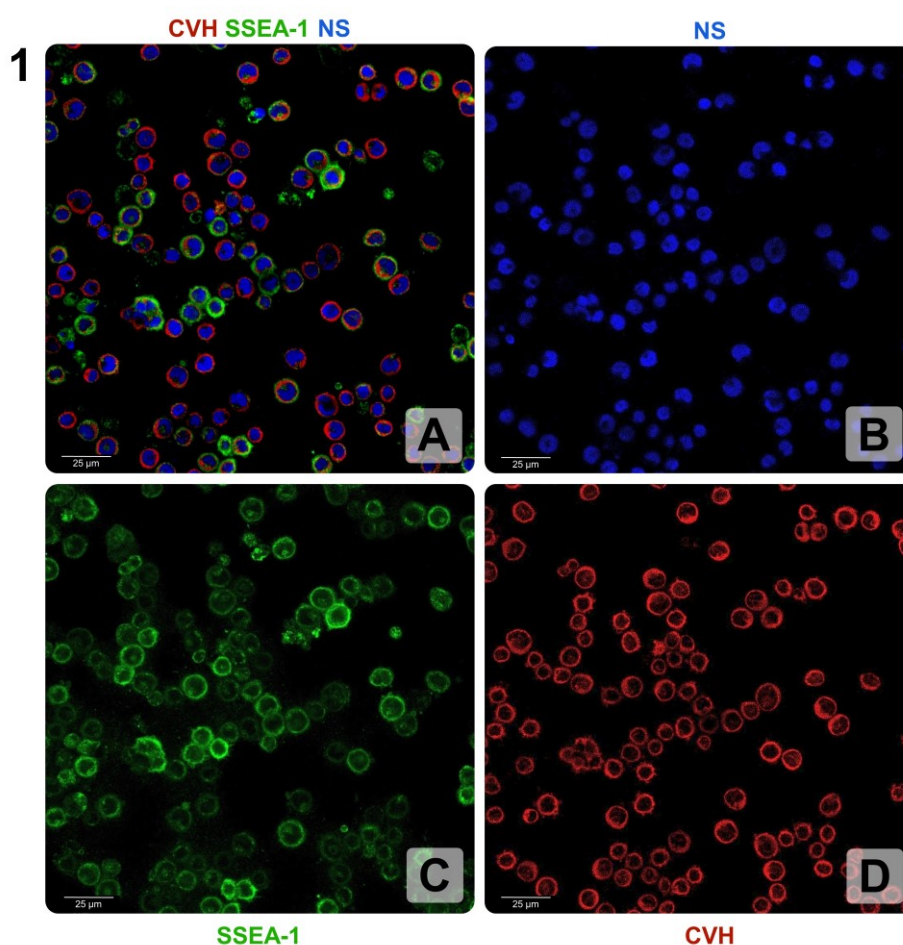
## 5.2. Az alapított ősivarsejt vonalak *in vitro* jellemzése

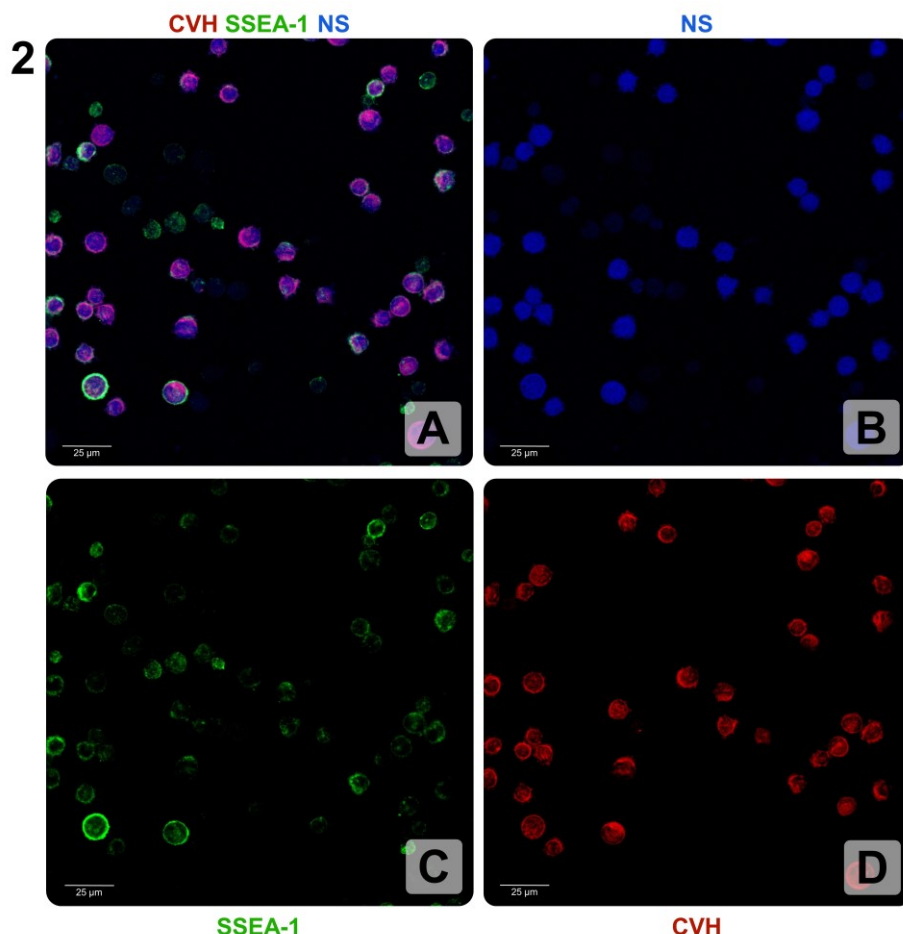
### 5.2.1. Ivar meghatározás

Minden létrehozott ősivarsejt vonal esetében elvégeztem az ivarmeghatározást. Ehhez a vérvétel során gyűjtött embrionális szövetmintát használtam. A 166 stabil sejtvonalból 121 (72,3 %) hímivarú és 45 (27,7 %) nőivarú volt (7. táblázat). Az 50-50 %-os elméleti arányt a Kendermagos erdélyi kopasznnyakú fajta közelítette meg, ahol a sejtvonalak 47,6 % nőivarú volt. Az ivararány a Fekete erdélyi kopasznnyakú fajtánál volt a leginkább eltolódva: a nőivarú egyedek aránya csak 14,8 % volt. A nőivarú vonalak arányából arra következtethetünk, hogy az alkalmazott médium, habár alkalmas a nőivarú sejtvonalak tenyésztésére, még nem tekinthető mindkét ivar számára ugyanolyan hatékonynak.

### 5.2.2. Immunhisztokémiai vizsgálat

Immunhisztokémiai vizsgálatot 6 fajta esetében végeztem. Minden fajta esetében egy hím- és egy nőivarú tenyészetet választottam (12. ábra, M3 melléklet). Minden vizsgált vonal ősvarsejt (DAZL, CVH) és őssejt (SSEA-1) specifikus festődést mutatott. A DAZL és a CVH a citoplazmában található, míg az SSEA-1 egy sejtfelszíni antigén, így az ősvarsejtek pozitív festődést mutattak mind a citoplazmában, mind a sejtmembránban. A sejtmagfestést TO-PRO<sup>®</sup>-3-mal végeztem, mely a képeken kék színnel jelenik meg.



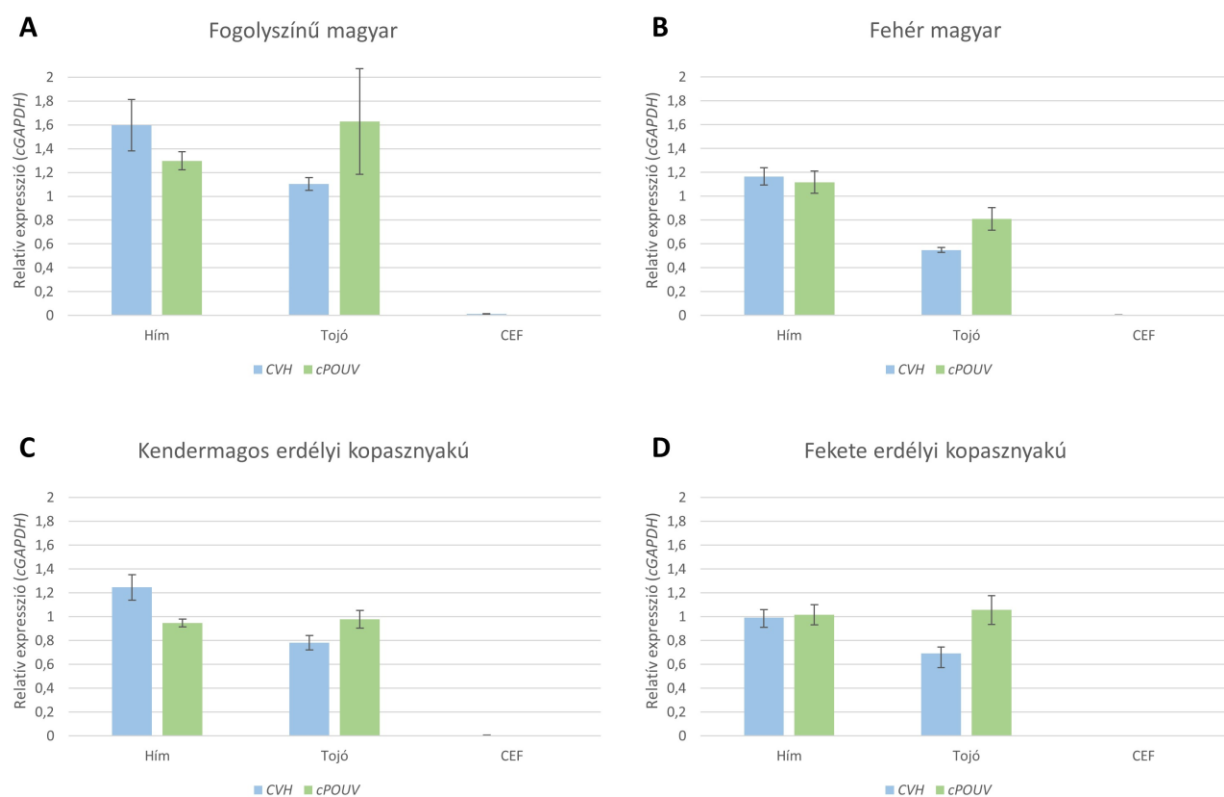


**12. ábra.** Az alapított ősvarsejt vonalak immunhisztokémiai festése. A képen látható PG sejtek CVH és SSEA-1 festődést mutattak. A CVH a citoplazmában található, míg az SSEA-1 egy sejt felszíni antigén, így az ősvarsejtek mind a citoplazmában, mind a sejtmembránban jelölődtek. A sejtmagfestést TO-PRO®-3-mal végeztem, mely a képeken kék színnel jelenik meg. Az ábrán a Fehér magyar fajta két sejtvonala látható. **1:** Az FM1102 hímivarú Fehér magyar ősvarsejt tenyészet. **A:** CVH (piros), SSEA-1 (zöld) és magfestés (NS, kék), **B:** magfestés (NS, kék), **C:** SSEA-1 (zöld), **D:** CVH (piros)., **2:** Az FM1125 nőivarú Fehér magyar ősvarsejt tenyészet. **A:** CVH (piros), SSEA-1 (zöld) és magfestés (NS, kék), **B:** magfestés (NS, kék), **C:** SSEA-1 (zöld), **D:** CVH (piros). (Méret skála 25 µm.)

### 5.2.3. Génexpressziós vizsgálat

Az ősvarsejt- és őssejt specifikus gének expressziójának vizsgálatát négy tyúkfajta két hímivarú és két nőivarú PGC vonala esetében végeztem el (Fogolyszínű magyar, Fehér magyar, Kendermagos erdélyi kopasznakú, Fekete erdélyi kopasznakú). Az ősvarsejt specifikus *CVH* és az őssejtekre jellemző *cPOUV* gének mind a négy vizsgált fajtában, minden egyes vizsgált sejtvonala esetében, magas expressziós értéket mutattak. Az expressziós értékek összehasonlításakor háztartási génként a *cGAPDH-t* használtam, ehhez képest számoltam ki a relatív expressziós értékeket. Házityúk embrionális fibroblaszt sejteket (CEF) használtam kontroll mintaként, melyekben a vizsgált ősvarsejt és őssejt specifikus gének expressziója (a várt módon) nem volt számottevő. Az eredményeket az 13. ábrán foglaltam össze. Az expressziós értékeket az

azonos tyúkfajták him-, illetve nőivarú sejtvonalaiban mért relatív expressziós értékek átlagaként adtam meg.

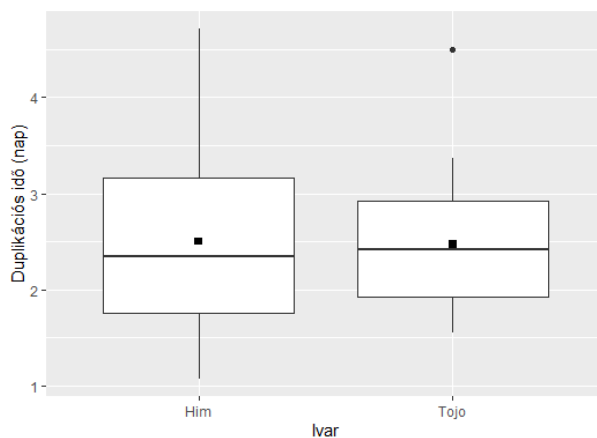


**13. ábra. Ősivarsejt- és őssejt specifikus gének expressziójának vizsgálata őshonos magyar házityúk fajták ősivarsejt vonalaiban.** Az ábrán két magyar és két erdélyi kopasznnyakú fajta esetében látható a *CVH* és *cPOUV* gének expressziója a *cGAPDH* háztartási génhez viszonyítva. Az expressziós értékeket az azonos tyúkfajták him-, illetve nőivarú sejtvonalaiban mért relatív expressziós értékek átlagaként adtam meg. Kontroll mintaként házityúk embrionális fibroblaszt sejteket (CEF) használtam., **A:** Fogolyszínű magyar fajta, **B:** Fehér magyar fajta, **C:** Kendermagos erdélyi kopasznnyakú fajta, **D:** Fekete erdélyi kopasznnyakú fajta.

#### 5.2.4. Sejtosztódás vizsgálata

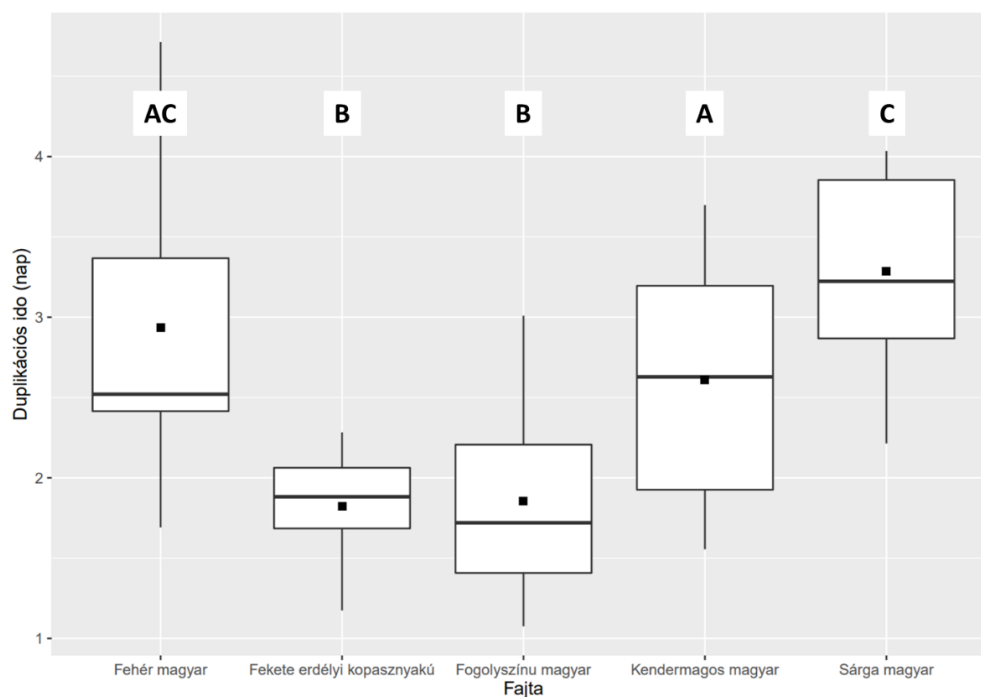
A sejtosztódás sebességének vizsgálata fontos tényező az ősivarsejt vonalak génbanki mintáinak létrehozása során. A gyors osztódási sebesség, ebből következően a rövid duplikációs idő (doubling time, DT) a PG sejtek jellemző tulajdonsága. A gyors osztódási sebességük megkönnyíti a sejtekkel való munkát, így alapvetően kívánatos tulajdonság, azonban, amennyiben valamelyik vonal esetében extrém magas proliferációs rátát találunk, az a vonal genetikai transzformációjára utal, így génbanki megőrzésre nem alkalmas. Azt is fontos megemlíteni, hogy a proliferációs rátákban talált nagy különbség a genetikai diverzitásra utal, ebből következően a génbanki megőrzésből csak abban az esetben zártam ki ősivarsejt vonalat az osztódás sebessége

alapján, ha annak lassú osztódása miatt nem lehetett elegendő számú sejtet gyűjteni az *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokhoz, illetve a mélyhűtéshez szükséges minimális sejtszám összegyűjtéséhez. Általánosságban elmondható, hogy az összes vizsgált ősvarsejt vonal elfogadható sejtosztódási rátát mutatott, amit az abszorbancia értékekből számolt duplikációs idővel (doubling time, DT) jellemeztem. A vizsgált vonalak esetében a DT értékek alacsonynak adódtak, így a tenyészetek megfeleltek a dolgozatban célul kitűzött génbanki törekvéseknek. Az összes fajta adatait elemezve nem találtam szignifikáns különbséget a hím és tojó vonalak között (14. ábra, 8. táblázat). A fajtákat egymással összehasonlítva szignifikáns eltérést kaptam 10-ből 7-esetben, amelyet az 8. táblázat foglal össze (15. ábra). Vizsgáltam továbbá a fajtákon belül a hím és tojó vonalak közötti különbséget, mely során az 5 fajtából 2-nél (Fogolyszínű és Kendermagos magyar) találtam szignifikáns különbséget (16. ábra, 8. táblázat).

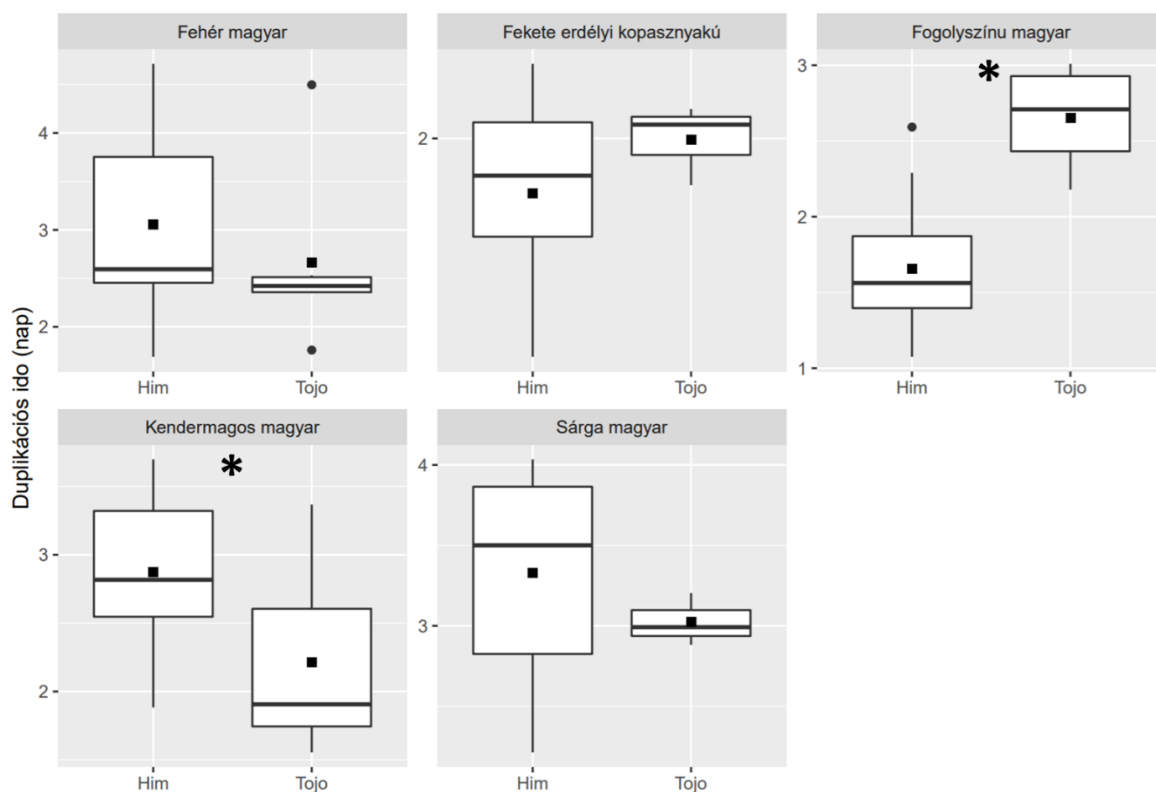


**14. ábra.** Az összes fajta ősvarsejt vonalainak duplikációs idő (DT) értékei ivaronként ábrázolva. A két ivar között nincs szignifikáns különbség (Mann-Whitney teszt,  $p=0,91220$ ). A boxplot-okon a fekete négyzet jelöli az átlagot, a középső vonal a mediánt, a doboz határok az alsó és felső kvartilist.





**15. ábra. A duplikációs idő (DT) értékek fajtánként ábrázolva.** A fajtákat egymással összehasonlítva szignifikáns eltérést kaptam 10-ből 7-esetben (8. táblázat). A Mann-Whitney teszt eredményei alapján a betűk különbözősége szignifikáns különbséget jelent, míg az azonos betűvel jelölt csoportok között statisztikailag kimutatható különbség nincs. A boxplot-okon a fekete négyzet jelöli az átlagot, a középső vonal a mediánt, a doboz határok az alsó és felső kvartilist.



**16. ábra. Duplikációs idő (DT) értékek fajtánként és ivaronként ábrázolva.** Az ivarokat egymással összehasonlítva szignifikáns eltérést kaptam 5-ből 2-esetben (8. táblázat). A Mann-Whitney teszt eredményei alapján csillaggal jelöltem a szignifikáns különbségeket. A boxplot-okon a fekete négyzet jelöli az átlagot, a középső vonal a mediánt, a doboz határok az alsó és felső kvartilist.

**8. táblázat. A duplikációs idő (DT) adatok elemzése során elvégzett Mann-Whitney tesztek eredményei.** (A szignifikancia szinteket a következők szerint határoztam meg: \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , and \*\*\* $p < 0,001$ .)

Összehasonlított csoportok	p-érték	Szignifikancia szint
Összes fajta hím - tojó	0,91220	
Fehér magyar hím-tojó	0,28180	
Fekete erdélyi kopasznnyakú hím - tojó	0,47890	
Fogolyszínű hím - tojó	0,00289	**
Kendermagos magyar hím - tojó	0,02524	*
Sárga magyar hím - tojó	0,41580	
Fogolyszínű - Fehér magyar	0,00010	***
Fogolyszínű - Fekete erdélyi kopasznnyakú	0,84100	
Fogolyszínű - Sárga magyar	3,94E-08	***
Fogolyszínű - Kendermagos magyar	0,00075	***
Fehér magyar - Fekete erdélyi kopasznnyakú	5,27E-07	***
Fehér magyar - Sárga magyar	0,09483	
Fehér magyar - Kendermagos magyar	0,58770	
Fekete erdélyi kopasznnyakú - Sárga magyar	5,81E-11	***
Fekete erdélyi kopasznnyakú - Kendermagos magyar	0,00060	***
Sárga magyar - Kendermagos magyar	0,00427	**

### 5.2.5. Mikroszatellit markerek vizsgálata

A munka célja annak megállapítása volt, hogy az alapított Fogolyszínű magyar ősvarsejt vonalak mennyire jól reprezentálják ezt a fajtát. Ehhez 21 ősvarsejt vonalat használtam, és hasonlítottam össze 30 (NBGK HGI állományából származó) Fogolyszínű magyar mintával, ugyanazon 17 mikroszatellit marker alapján.

Az általános diverzitás mutatókat (átlag allélszám, allélgyakoriság, várt és tényleges heterozigotizás) figyelembe véve elmondható, hogy a sejtvonalak jól reprezentálják a Fogolyszínű magyar tyúkfajtát (9. táblázat, M4 melléklet). Ugyanakkor meg kell jegyezni, hogy több marker esetében megfigyeltem egy-egy allélt, mely vagy csak az egyik, vagy a másik populációban volt megtalálható. Ennek oka lehet az, hogy összesen mintegy 51 mintát vizsgáltam meg, így a markerek és minták számának növelésével nagy valószínűséggel megtaláltam volna ezeket a kiugró, jelenleg „ritka” allélnak vélt fragmenteket mindkét állományban. Szignifikáns eltérést találtam a kontroll állomány várt és tényleges heterozigotizása között ( $F_{IS}$ : populáción belüli beltenyésztettség értéke). A sejtvonalak esetében szignifikáns eltérés nem volt kimutatható.

**9. táblázat. Mikroszatellit markerek vizsgálata során használt általános diverzitás mutatók.** (MNA: mean number of alleles = átlag allélszámok, H<sub>E</sub>: expected heterozigotizita = várt heterozigotizita, H<sub>O</sub>: observed heterozigotizita = tényleges heterozigotizita, SD: standard deviation = szórás, F<sub>IS</sub>: populáción belüli beltenyésztettségi érték (\*\*P<0.001))

Populáció	MNA±SD	H <sub>E</sub> ±SD	H <sub>O</sub> ±SD	F <sub>IS</sub>
Alapított ősvarsejt vonalak	3,59±2,00	0,52±0,05	0,50±0,03	0,04
Kontroll állomány mintái	3,76±1,44	0,52±0,05	0,43±0,02	0,18***

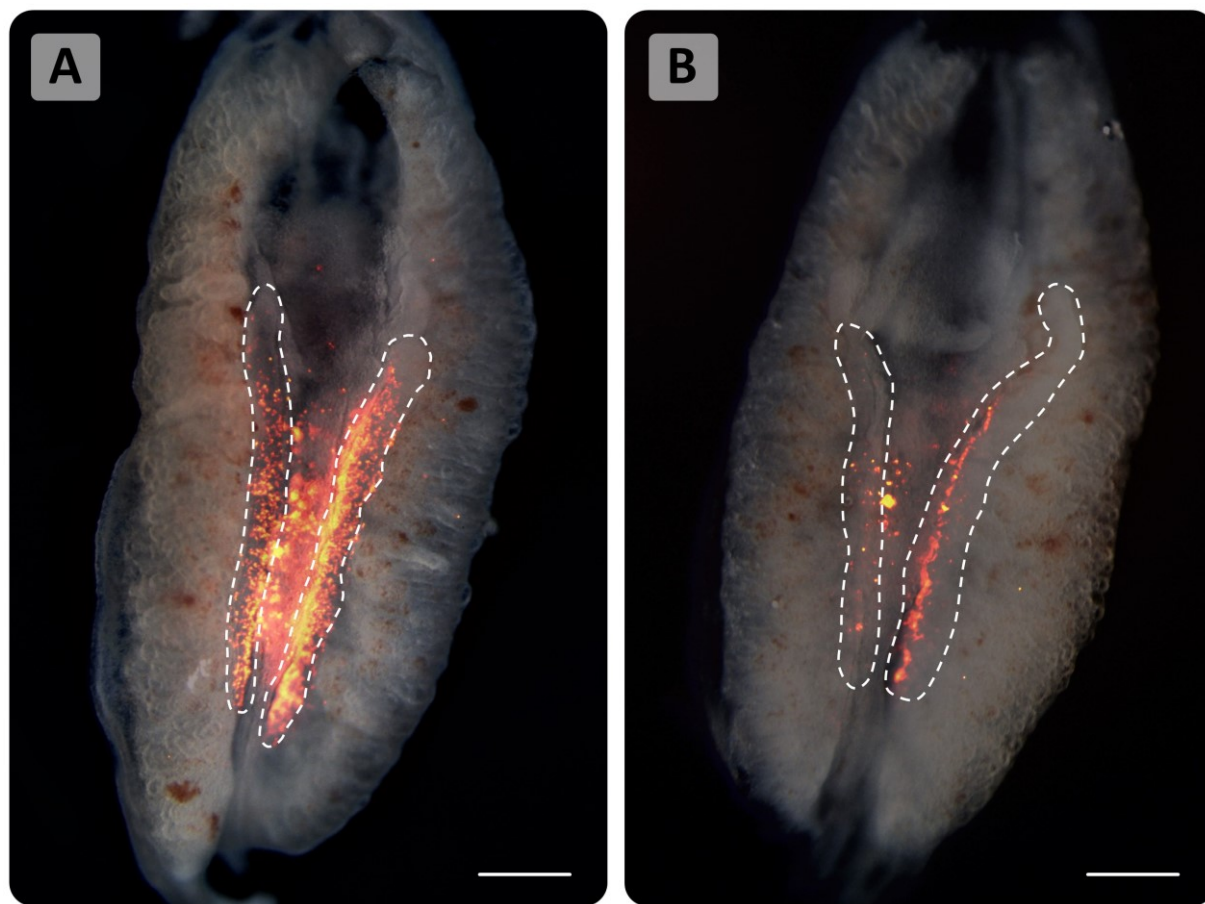
### 5.3. Az alapított ősvarsejt vonalak *in vivo* jellemzése

#### 5.3.1. Fluoreszcensen jelölt donor ősvarsejtek integrációjának vizsgálata a recipiens embrióban

A sejt vonalakat egy *in vivo*, funkcionalitást vizsgáló tesztnek is alávettem. A recipiens embrióban belüli vándorlási képességet vizsgáló kísérleteket öt magyar őshonos fajtán végeztem el. Minden fajta esetében véletlenszerűen választottam egy hím és egy tojó sejt vonalat a tesztbe. Összesen 118 injektálást végeztem fluoreszcensen jelölt donor ősvarsejtekkel, melyből 69 (58,5%) esetben élt túl a recipiens embrió. A gonádok elemzése során 60 embrió esetében volt kimutatható a donor eredetű sejtek beépülése (17. ábra, M5 melléklet), mely 87%-os átlagos beépülési aránynak felel meg (10. táblázat). A Sárga magyar, Fehér magyar és Fekete erdélyi kopasznakú fajták esetén minden, a manipulációt túlélő embrió pozitívnak bizonyult, míg a Fogolyszínű és Kendermagos magyar fajták esetében 76,2 és 77,8 % beépülési arányt mértem.

**10. táblázat. Az alapított ősvarsejt vonalak vándorlási képességének vizsgálata a recipiens embrióban. A beépülési arányt az injektálást túlélő embriók számához viszonyítva adtam meg.**

Magyar őshonos fajták	Injektálások száma (db)	Élő embriók száma (db)	Kimérák száma (db)	Kimérák aránya
Sárga magyar	20	13 (65,0%)	13	100,0%
Fehér magyar	15	8 (53,3%)	8	100,0%
Fogolyszínű magyar	32	21 (65,6%)	16	76,2%
Fekete erdélyi kopasznakú	19	9 (47,4%)	9	100,0%
Kendermagos erdélyi kopasznakú	32	18 (56,3%)	14	77,8%
Összesen (db)	118	69 (58,5%)	60 (87,0%)	-



**17. ábra. Fluoreszcensen jelölt donor ősvarsejtek vizsgálata a recipiens embrióban.** A jelölt donor sejteket 2,5 napos (HH14-17) recipiens embriók keringésébe injektáltam, majd 6 napos korban az embrionális gonádokban vizsgáltam a sejtek jelenlétét/hiányát. A képen Fekete erdélyi kopasznnyakú embrióból létrehozott jelölt ősvarsejtek (piros) láthatók recipiens embriók ivarszervében. A recipiens embrióból izolált ivarszerv pár (fehér szaggatott vonallal kiemelve) az ősvese (*mesonephros*) felületén található. A bevándorlás ténye jelzi, hogy az adott sejtvonal az *in vitro* tenyésztés és mélyhűtés után is képes az embrióon belüli célzott, a PG sejtekre jellemző vándorlásra. **A:** a hímivarú FEK508 sejtvonalból származó ősvarsejtek integrációját mutatja a recipiens gonádban. **B:** nőivarú FEK513 sejtvonalból származó ősvarsejtek integrációja a recipiens gonádban. (Méretarány: 500  $\mu$ m)

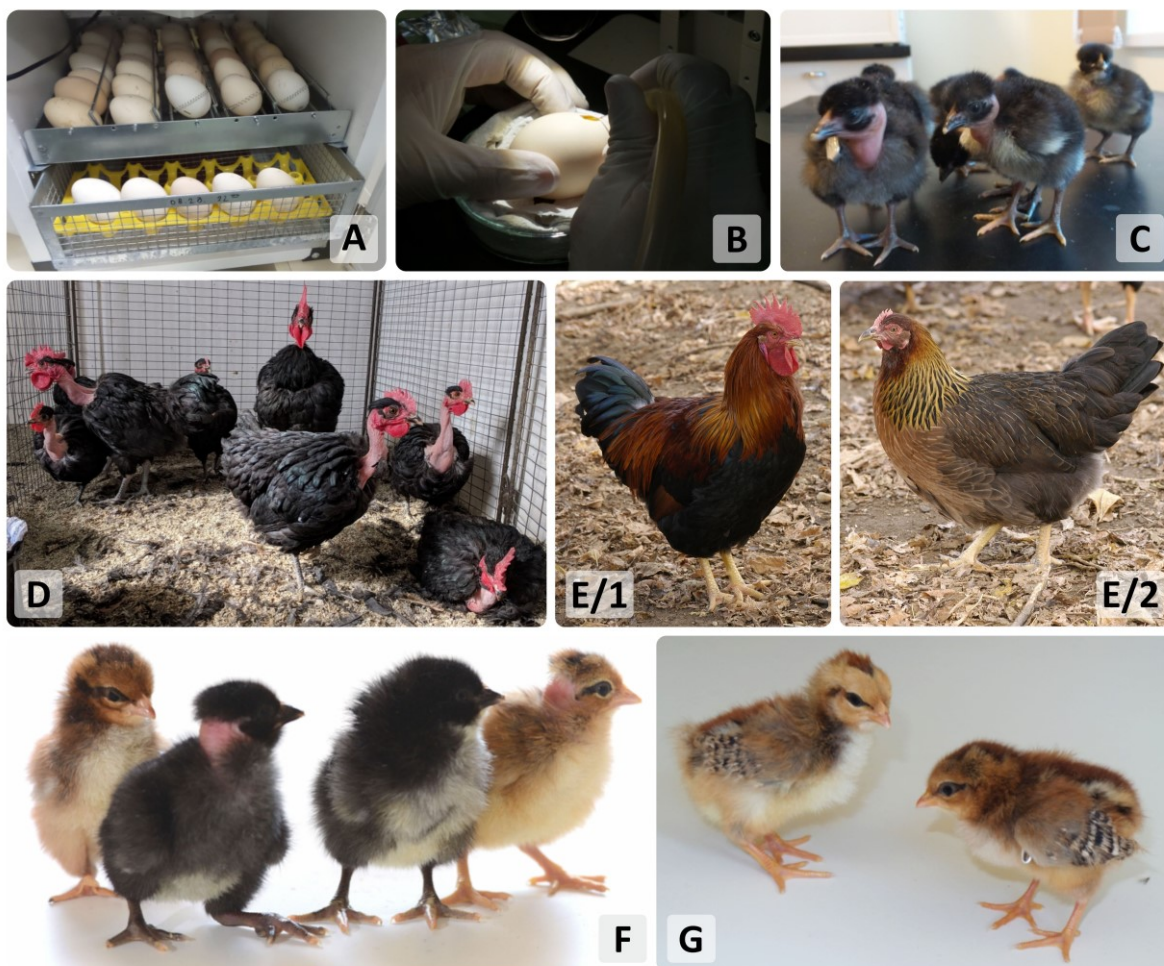
#### 5.4. Génbank létrehozása az alapított ősvarsejt vonalakból

Az egyedi embriókból származó stabil ősvarsejt vonalakat mélyhűtöttem. Minden fajta esetében az összes alapított vonalat bevontam a génbanki megőrzésbe. Minden ősvarsejt vonal felszaporítását addig végeztem, míg  $6 \times (5 \times 10^4)$  (6 párhuzamos fagyasztócsőre elegendő) sejtet elő nem állítottam. A génbank földrajzilag két különböző helyen, a NBGK HGI és a NAIK MBK létesítményiben került kialakításra. A HGI-ben folyékony nitrogénben, míg az MBK-ban egy  $-150^\circ\text{C}$ -os mélyhűtőben találhatóak a minták, intézetenként, sejtvonalanként 3-3 fagyasztó csőnyi sejt. A hat fajtából összesen 972 génbanki minta került megőrzésre. A mintaszámokat az 7. táblázat tartalmazza fajtákra lebontva.

## 5.5. A donor fajta visszanyerése ősvarsejtek injektálásával és keresztezéssel

### 5.5.1. Donor eredetű ősvarsejtek injektálása

Öt kísérlet során összesen 52 Fekete erdélyi kopasznyakú recipiens embrióba injektáltam mélyhűtött, majd felolvasztott Fogolyszínű magyar donor ősvarsejteket (18. és 19. ábra). Az injektáláshoz 1:1 arányban használtam egy hím- (FS101) és egy nőivarú (FS111) tenyésztet sejtjeit azért, hogy a recipiens embrió nemétől függetlenül minél nagyobb eséllyel kapjak ivarszervi kiméra állatokat. Az injektált embriók közül összesen 29 (55,8 %) kelt ki, melyekből 24 (82,8 %) érte el az ivarérett kort (13 kakas és 11 tyúk) (18. és 19. ábra).



**18. ábra. Donor eredetű ősvarsejtek recipiens embrióba injektálása és a donor fajta visszanyerése tesztkeresztezéssel.** A: Recapiens Fekete erdélyi kopasznyakú tojások keltetése a donor sejtek injektálásához.; B: Fogolyszínű magyar ősvarsejtek injektálása a recipiens embriókba.; C: A kikelt, recipiens Fekete erdélyi kopasznyakú egyedek (feltételezett ivarszervi kimérák); D: Az ivarérett, recipiens Fekete erdélyi kopasznyakú egyedek (feltételezett ivarszervi kimérák); E/1: Fogolyszínű magyar kakas.; E/2: Fogolyszínű magyar tyúk.; F: A tesztkeresztezésből kikelt csibék. A keresztezés során kapott összes színváltozat látható.; G: A tesztkeresztezésből kikelt, donor eredetű Fogolyszínű magyar egyedek (1 hetes korban). (Képek: Patakiné Várkonyi Eszter, Lehoczky István, Lázár Bence és <http://www.geneconservation.hu>)



### 5.5.2. Feltételezett ivarszervi kiméra egyedek tesztkeresztése

A 24, donor ősvarsejtekkel injektált, Fekete erdélyi kopasznnyakú feltételezett ivarszervi kiméra egyedet a donor fajtával kereszteztem. A tesztkeresztelés során 795 darab tojás került keltetőgépbe 9 héten keresztül. A 340 kikelt utódból 14 (4,1 %) bizonyult tiszta fedett nyakú fogolyszínűnek (18. és 19. ábra). A 14 (7 kakas és 7 tyúk) kikelt Fogolyszínű magyar utód 4 (3 kakas és 1 tyúk) injektált Fekete erdélyi kopasznnyakú egyedtől származott, így a feltételezett kimérák 16,6 %-ról sikerült bizonyítani, hogy valóban ivarszervi kimérák voltak. A tesztkeresztelés bizonyította, hogy a génbankban tárolt (*in vitro* tenyésztett, mélyhűtött, majd felolvasztott) ősvarsejtek segítségével a donor fajta mindkét nemben sikeresen visszanyerhető.



19. ábra. A donor eredetű ősvarsejtek recipiens embrióba injektálásának és a donor fajta visszanyerésének folyamata és eredményei.

## 5.6. Javasolt protokoll házityúk ősivarsejt vonalak létrehozásához és tárolásához génbankok számára

A magyar őshonos házityúk fajták ősivarsejt alapú génbankjának létrehozása mellett célom volt egy olyan általános protokoll kidolgozása, amely kellőképpen egyszerű (ezáltal kevésbé jól finanszírozott laborok/kutatóintézetek is alkalmazhatják), de általa jó minőségű génbanki ősivarsejt minták állíthatók elő. A témában eddig közzétett módszereket áttekintve azt tapasztaltam, hogy nincs egy általánosan elfogadott eljárás, mely alapján a terület kutatói megítélhetik az ősivarsejt vonalak minőségét. A minőség márpedig fontos, tekintve, hogy a jövőben az előállított és tárolt sejtvonalakból donor eredetű egyedek előállítása a cél. Az eddigi kutatásokat és saját tapasztalataimat alapul véve az alábbiakban ajánlok egy protokollt, melyet követve nagy bizonyossággal állíthatjuk, hogy a génbankba szánt sejtvonalak megfelelnek az ősivarsejtekre jellemző *in vitro* és *in vivo* sajátosságoknak, illetve alkalmasak a későbbi felhasználásra a génmegőrzésben. A protokoll tartalmazza azt a kritériumrendszert, melynek véleményem szerint a sejtvonalaknak meg kell felelni. A javasolt lépéseket és kritériumokat az 11. táblázat foglalja össze. Az alkalmazandó technikák részletes leírása megtalálható a dolgozat 2. fejezetében.

**11. táblázat. Javasolt protokoll házityúk ősivarsejt vonalak létrehozásához és tárolásához génbankok számára.**

Lépések	Kritérium
1 Vervétel donor állomány embrióiból	Min. 50 db vervétel
2 Ősivarsejt vonalak alapítása táplálósejt mentes környezetben	Min. $1,0 \times 10^5$ ősivarsejt 3 hét alatt / sejtvonala
3 Ősivarsejt vonalak ivarmeghatározása	Min. 4-6 db nőivarú sejtvonala
5 Ősivarsejt vonalak immunhisztokémiai festése	CVH / DAZL és SSEA-1 pozitív sejtek
6 Ősivarsejt vonalak génexpressziós vizsgálata	CVH és cPOUV expresszió
7 Ősivarsejt vonalak vándorlási képességének vizsgálata	Integrálódás a recipiens embriók ivarszervébe
8 Tesztelt ősivarsejt vonalak mélyhűtése	Min. 6 db fagyasztó cső, min. $5,0 \times 10^4$ sejt/cső

## 5.7. Új tudományos eredmények

1. Elvégeztem hat magyar őshonos házityúk fajtából (Fehér magyar, Sárga magyar, Kendermagos magyar, Fogolyszínű magyar, Fekete erdélyi kopasznakú, Kendermagos erdélyi kopasznakú) mindkét ivar esetében az ősvarsejtek izolálását és hosszú távú fenntartását sejtenyészetben, valamint kialakítottam egy ősvarsejt alapú génbankot, mely mind a hat fajta mintáit tartalmazza.
2. Ivarszervi kimérákat hoztam létre öt magyar őshonos házityúk fajta (Fehér magyar, Sárga magyar, Fogolyszínű magyar, Fekete erdélyi kopasznakú, Kendermagos erdélyi kopasznakú) ősvarsejtjeinek felhasználásával.
3. Sikeresen visszanyertem a donor fajtát Fogolyszínű magyar házityúkból származó ősvarsejtek génbaki mintáiból.
4. Kidolgoztam egy általános protokollt és kritériumrendszert a házityúk ősvarsejt vonalak alapítására, minőségbiztosítására és génbanki megőrzésére.



## 6. KÖVETKEZTETÉSEK ÉS JAVASLATOK

A Természetvédelmi Világszövetség Vörös listája (IUCN Red list) jelenleg 11147 madár fajt tart számon, melyből 1486 faj (13.3 %) súlyosan veszélyeztetett, veszélyeztetett vagy sebezhető kategóriákba sorolható (IUCN Red List version 2020-1: Table 4a, <https://www.iucnredlist.org/resources/summary-statistics#Summary%20Tables>). A háziállatokkal kapcsolatos felméréseket és nyilvántartásokat az Egyesült Nemzetek Szervezetének Élelmészügyi és Mezőgazdasági Szervezete (FAO) végzi. Adataik szerint a 40 fajhoz tartozó közel 8800 bejegyzett fajta 7 %-a már kihalt és további 24 %-a kihalással fenyegetett (FAO 2019, <http://www.fao.org/resources/infographics/infographics-details/en/c/174199/>). A világon nyilvántartott baromfi fajták száma 3689 (ebből 2222 őshonos), melyek 28 %-a veszélyeztetett, sebezhető vagy már kihalt (FAO, DAD-IS, <http://www.fao.org/3/CA0121EN/ca0121en.pdf>). Ezekből az adatokból látható, hogy a vadmadár fajok és a baromfi fajták jelentős része valamilyen kockázati kategóriába sorolható. Így megfelelő védelmi stratégiákra és aktív cselekvésre van szükség, hogy a jelenleg negatív trend lassíthatóvá, majd a jövőben stabillá váljon. Az őshonos házityúk és egyéb baromfi fajták genetikai információjának megőrzése kiemelkedően fontos a mezőgazdasági biodiverzitás fenntartása szempontjából. Az így tárolt allél variációk (pl.: rezisztencia, stressz tűrés, előnyös termelési paraméterek stb.) alapanyagai lehetnek a jövő keresztezési stratégiáinak (Wang et al., 2017).

Az ősvarsejtek szélesebb körű kísérleti felhasználása 2012-ben kezdődött, amikor van de Lavoie és munkatársai először hoztak létre olyan tenyésztő oldatot, melyben a sejtek osztódása és fenntartása hosszú távon biztosított volt (Van De Lavoie et al., 2012). Ez alapján nem meglepő, hogy a FAO 2012-ben publikált állati eredetű genetikai minták kriokonzervációjával foglalkozó irányelvei (FAO Guidelines 2012) még csak elméleti szinten foglalkoznak az ősvarsejteken alapuló génmegőrzés lehetőségeivel. Ami meglepőbb, hogy az időközben eltelt években sem jelent meg a FAO részéről hivatalos ajánlás és általános protokoll a témában. Így munkám során céltom a magyar őshonos házityúk fajták ősvarsejt alapú génbankjának létrehozásán túl egy olyan általánosan ajánlható protokoll volt, mellyel egyszerűen, de hatékonyan lehet házityúk ősvarsejteket izolálni, tenyészteni, mélyhűteni és tesztelni. A közelmúltban számos kutatócsoport ért el sikereket őshonos házityúk fajták ősvarsejtjeivel kapcsolatos vizsgálatokban, illetve többen hoztak létre őshonos egyedeket az ősvarsejtek injektálásán alapuló módszerrel (Nakamura et al., 2010a; Rikimaru et al., 2011; Tonus et al., 2016; Wang et al., 2017; Yu et al., 2019).

Nakamura és munkatársai a Gifujidori őshonos japán fajta embrióiból vettek vért, melyből gradiens centrifugálással tisztították az ősvarsejteket. A tisztított sejteket ivarmeghatározás után

hím- és nőivarú csoportokba osztották és további tenyésztés nélkül hat hónapig mélyhűtötték. A felolvasztott sejteket sikeresen injektálták vissza két recipiens White Leghorn fajta (24HS, ST) ivar azonos embrióiba. Mindkét recipiens vonal esetében keltek ki bizonyítottan ivarszervi kiméra egyedek, melyeket egymással keresztezve az ST fajta esetében donor eredetű utódokat is kaptak (6,0 %) (Nakamura et al., 2010a).

Rikimaru és munkatársai a Hinai-dori őshonos japán fajta 6 napos embrionális ivarszerveiből izoláltak ősvarsejteket. Az ivarszerv szövet emésztése után mikrokapilláris segítségével egyenként gyűjtötték össze 50-100 ősvarsejtet melyeket X-es stádiumú (E-G&K) embriók szubgerminális üregébe, illetve HH12-13 stádiumú embriók dorzális aortájába injektáltak. A X-es stádiumú embriók esetén alacsonyabb embrió túlélést tapasztaltak, mint az aortába történő injektálásnál (12,5 % vs. 80,0 %). A hímvivarú feltételezett ivarszervi kiméra egyedeket tojó Hinai-dori egyedekkel visszakeresztezve csak az aortába injektált recipiens egyedekkel kaptak donor eredetű utódokat (8,1 %), melyeket a fenotípus vizsgálaton felül mikroszatellit marker analízis segítségével is visszaigazoltak (Rikimaru et al., 2011).

Tonus és munkatársai két őshonos belga fajtán (Walloon Herve és Ardennes) végeztek vizsgálatokat. A vért HH13-18 stádiumú embriókból gyűjtötték és fajtánként összekeverték, majd BRL (Buffalo Rat Liver) táplálósejt réteget tartalmazó tenyésztő rendszerben több, mint egy évig fenntartották. A sejtvonalak *in vitro* jellemzésére különböző ősvir- és őssejt specifikus markereket (*CVH*, *CDH*, *cDAZL*, *SOX2*, *cPOUV* és *NANOG*), illetve immunfestést (anti-SSEA-1) alkalmaztak, továbbá sikeresen mélyhűtötték a kapott sejtvonalakat. A hosszú távú fenntartás és a nőivarú sejtek számára kevésbé optimális tápoldat összetételnek köszönhetően a sejtvonalaik csak hímvivarú sejteket tartalmaztak (habár kezdetben kevert ivarú sejtekből indultak ki). A létrehozott sejtvonalak jelenlétét visszaigazolták recipiens embriók ivarszervében, de donor eredetű utódokat nem hoztak létre (Tonus et al., 2016).

Wang és munkatársai az őshonos kínai Guangxi sárga-tollú fajtából származó ősvarsejtek *in vitro* jellemzését és megőrzését tűzték ki célul. A kísérletek során az embriókból vett vérmintákat keverték, majd táplálósejteket (BRL) tartalmazó médiumban tenyésztették a sejteket. Összesen 3 stabil ősvarsejt tenyészetet kaptak, melyek hímvivarúnak bizonyultak az ivarmeghatározás során. Sejtvonalaik átlagos duplikációs ideje (DT) 49 óra volt. Az alapított sejtvonalak *in vitro* vizsgálatát ősvarsejt-specifikus gének (*CVH*, *CDH*, *cDAZL*, *NANOG* és *cPOUV*) expressziójának ellenőrzésével és immunhisztokémiai festésekkel (anti-SSEA-1, anti-EMA-1) végezték. A sejtek vándorlókéességének vizsgálatához az ősvarsejteket egy GFP-t tartalmazó piggyBac transzpozon vektorral transzformálták. A jelölt sejteket recipiens embriókba

injektálták, majd a sejtek jelenlétét sikeresen mutatták ki 7 napos embriókban, naposcsibékben, valamint ivarérett kakasok ondójában is. Donor eredetű utódokat nem hoztak létre.

Yu és munkatársai a kínai Meiling fajtaival érték el sikereket. Ez a fajta nagy népszerűségnek örvend az ízletes húsa és kiváló adaptációs képességei miatt, azonban tiszta állományai veszélyben vannak, így szükséges a fajta genetikai megőrzése. A kutatók HH13-15 stádiumú embriókból vettek vért, majd az azonos ivarú mintákat keverték. A kevert vérből gradiens centrifugálás segítségével tisztították az ősvarsejteket, majd perjódsvavas festéssel (PAS), anti-SSEA-1 immunhisztokémiával és a *cGAPDH*, *cDAZL*, *NANOG*, *cPOUV* gének expressziójának vizsgálatával igazolták az ősvarsejt jelleget. Ezt követően *in vivo* fluorescens festéssel jelölték az ősvarsejteket, majd recipiens embriók ivarszervében visszaigazolták a beépülést. Utolsó lépésként ivarszerv kimérákat hoztak létre, majd 4 ivarérett recipiens kakast kereszteztek donor fajtából származó tyúkokkal. A tesztkeresztezés során 12,6 % donor eredetű utódot kaptak.

A bemutatott vizsgálatokban legtöbbször nem sejtvonalakat használtak, csak ősvarsejteket. Ahol sejtvonalakat használtak fel, ott általában táplálósejt réteg segítségével tenyésztették a sejteket, vagy csak hímivarú sejtvonalakat tudtak fenntartani és felhasználni. Eddig csak Woodcock és munkatársai alkalmaztak táplálósejt mentes tenyésztési technikát és mindkét ivarból származó egyedi ősvarsejt vonalakat őshonos házityúk fajták esetében (Woodcock et al., 2019). Ők azonban recipiensként génmódosított egyedeket használtak fel, ami nagyban növeli a donor eredetű egyedek előállításának hatékonyságát, azonban az Európai Unió jelenlegi szabályozása mellett ennek széleskörű gyakorlati alkalmazása nem lehetséges.

A fent bemutatott ősvarsejtekkel kapcsolatos alap- és alkalmazott kutatás és a módszerek fejlesztése nagyrészt házityúk fajon zajlik, azonban az elmúlt években már történtek törekvések a vadmadár fajokon való alkalmazhatóság növelésére is.

Kang és munkatársai például 7 napos fácán (*Phasianus colchicus*) embriók ivarszerveiből izoláltak ősvarsejteket egy mágneses sejt válogató eljárás segítségével, majd 2,5 napos házityúk embriók keringésébe injektálták az így tisztított sejteket. A feltételezett ivarszerv kimérákat ivarérésig nevelték, majd a kakasok ondójával mesterséges termékenyítést végeztek fácán tojókon. A donor ősvarsejt eredetű utódok aránya 17,5 % volt (Seok et al., 2008). Ezt követően Tirawattanawanich és munkatársai hamvas fácán (*Lophura diardi*) és bankivatyúk (*Gallus gallus*) ősvarsejtek *in vitro* fenntartását tűzték ki célul táplálósejtek segítségével. Mindkét faj esetében japán fürj táplálósejteket alkalmaztak, segítségükkel 21 napon (hamvas fácán), illetve 3 hónapon (bankivatyúk) keresztül tudták tenyészetben tartani és felszaporítani a gradiens centrifugálással tisztított ősvarsejteket. A sejtek minőségét perjódsvav és anti-SSEA-1 festéssel igazolták vissza (Tirawattanawanich, 2012; Srihawong et al., 2016).

A galléros tűzok (*Chlamydotis undulata*) állománya a világon az utóbbi 20 évben jelentősen csökkent, így ma a Vörös Listán a sebezhető kategóriában található. Wernery és munkatársai célul tűzték ki tűzok egyedek előállítását az ősvarsejteken alapuló kiméra technológiával. Ez a vizsgálat jó példa arra, hogy a szükséges alapozó vizsgálatok után, hogyan lehet ősvarsejtekkel támogatni egy arra rászoruló vadon élő faj védelmi törekvéseit. A vizsgálat során hímivarú 8 napos tűzok embriók ivarszerv szövetét gyűjtötték össze, majd a szövetből sejtszuspenziót készítettek. Az ősvarsejteket is tartalmazó szuszpenziót hímivarú házityúk embriók keringésébe injektálták, majd kikeltették a tojásokat. Az injektált embriók ~25 %-a érte el az ivarérett kort, melyből 8 kakasról (5,7 %) bizonyították, hogy valóban ivarszerv kiméra. A kakasoktól gyűjtött spermát galléros tűzok tojók mesterséges termékenyítésére használták fel, melyből 45 tojást kaptak, ezekből kettő volt termékeny és végül egy (2,2 %) egészséges hímivarú tűzok fióka kelt ki. A vizsgálat a galléros tűzok embriók feláldozásával járt, mely mindenképpen kerülendő egy Vörös Listás faj esetében, azonban rámutat, hogy vadon élő fajok esetén is lehetséges a módszer alkalmazása további fejlesztésekkel. Házityúk esetében számos vizsgálatban gyűjtöttek ősvarsejt izolálásra alkalmas embrionális vérmintákat az embriók feláldozása nélkül, így a módszer adaptálása más fajok esetében is lehetségesnek tűnik. (Wernery et al., 2010).

Láthatjuk, hogy sokan és sok különböző fajtán, fajon érték már el eredményeket, ennek ellenére úgy gondolom, hogy az ebben a dolgozatban bemutatott eredmények egyediek, mert tudomásom szerint ez az első vizsgálat, amelyben egy egész régió őshonos házityúk fajtáinak ősvarsejt alapú genetikai megőrzése megvalósult, továbbá mindkét ivarból származó egyedi sejtvonalakat sikerült fenntartani táplálósejt mentes tenyésztési technikával.

A dolgozatban bemutatott őshonos magyar fajtákra adaptált sejtenyésztési technika előnye, hogy segítségével sikerült nőivarú ősvarsejt vonalakat alapítani és fenntartani minden fajta esetében, valamint ezekből is (a hím vonalakhoz hasonlóan) ivarszerv kimérákat és végül donor eredetű utódokat létrehozni. A tenyésztési módszer további előnye, hogy nem használ tápláló sejteket, így egyrészt a tápoldat pontosabban reprodukálható, másrészt egyszerűbb és gyorsabb a folyamat. Hat őshonos magyar fajtából izoláltam ősvarsejteket és alapítottam sejtvonalakat. Az átlagos sejtvonal alapítási ráta 42,0 % volt, mely hasonló a más kutatócsoportok által kapott vizsgálati eredményekhez (Vantress heritage fajta: 40-56 %; Fehér leghorn fajta: 49-82 %) (Nandi et al., 2016; Woodcock et al., 2019). Az alapított sejtvonalak pozitív festődést mutattak összejt- és ősvarsejt-specifikus ellenanyagokkal (anti-SSEA-1, anti-DAZL és anti-CVH), továbbá kifejeztek összejt- és ősvarsejt-specifikus géneket (*CVH*, *cPOUV*), mely eredmények bizonyítják, hogy a tenyésztés során hosszú távon fenntartott sejtek valóban ősvarsejtek. Donor eredetű utódokat 4,1 %-os hatékonysággal sikerült létrehozni, mely közel azonos, mint a korábbi kutatások során

bemutatott értékek (Gifujidori fajta: 6,0 %; Hinai-dori fajta: 8,1 %; Meiling fajta: 12,6 %) (Nakamura et al., 2010a; Rikimaru et al., 2011; Miyahara et al., 2014; Rikimaru et al., 2014; Yu et al., 2019). A dolgozatban bemutatott *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján nagy biztonsággal állítható, hogy az ajánlott protokollok alkalmazásával génmegőrzésre alkalmas ősvarsejt génbanki minták állíthatók elő, melyekkel visszanyerhető a megőrizni kívánt őshonos vagy gazdaságilag fontos házityúk fajta.

## 6.1. Javaslatok

Az ősvarsejtek tárolásán keresztül megvalósított génbanki megőrzés az irodalmi adatok és saját vizsgálataim alapján is értékes részét képezheti a jövő faj és fajtavédelmi programjainak. A sperma és ivarszerv-szövet mélyhűtéssel együtt egy olyan génbanki gyűjtemény hozható létre az adott fajtából, mely segítségével a jövőben nagy hatékonysággal lesz visszanyerhető a megőrizni kívánt fajta mindkét ivara. A házityúk esetében az ősvarsejtek kinyerésének, tenyésztésének, mélyhűtésének és minőség ellenőrzésének módszerei a különböző fajták esetén is jó eredményeket hoztak (jelen dolgozat eredményei alapján is), így minimális adaptálással bevezethetők a gyakorlatban. Más fajok esetében azonban szükséges a hosszú távú tenyésztéshez használni kívánt tápoldat komponenseinek optimalizálása, esetleg új összetételű médiumok, új izolálási módszerek kidolgozása. Ez a feladat igen bonyolult is lehet, mert fel kell hozzá térképezni az adott faj ősvarsejtjeire jellemző jelátviteli útvonalakat. Jelenleg véleményem szerint ez az egyik terület, aminek a fejlesztése mindenképpen szükséges, mert a megőrzési módszer kulcseleme a fajspecifikus tápoldat, melyben a sejtek osztódása optimális sebességű, és képesek megőrizni ősvarsejt jellegüket (nem differenciálódnak tovább). A megőrzési folyamatot a recipiens oldaláról vizsgálva pedig fontos lenne olyan univerzális recipiensek keresése, illetve létrehozása, melyek akár vad madárfajok esetében is képesek a donor ősvarsejtek befogadására. További kíváncsi tulajdonság lenne, hogy a recipiens embriók ivarszervében ne legyenek saját ivarsejtek (vagy csak csökkentett darabszámban), ezzel jelentősen növelve a folyamat hatékonyságát. Ezek nem egyszerű feladatok, de a közelmúltban a DDX knock-out házityúk és az interspecifikus steril hibridek példája biztató első lépéseknek tekinthetők. Javaslom tehát a terület kutatói számára a dolgozatban tárgyalt módszer kiterjesztését minden arra érdemes őshonos, veszélyeztetett vagy gazdaságilag fontos házityúk fajtára, illetve egyéb fajok bevonását és a házityúkon már bevált módszerek adaptálását. Ezzel a megközelítéssel a jövőben jóval védettebbé válhatnak a jelenleg csak *in vivo* megőrzés alatt álló értékes baromfi fajok és fajták, illetve egyéb veszélyeztetett madárfajok.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az IUCN és a FAO adatai szerint a vadmadár fajok és a baromfi fajták jelentős része valamilyen kockázati kategóriába sorolható. Így megfelelő védelmi stratégiára és aktív cselekvésre van szükség, hogy a jelenleg negatív trend lassíthatóvá váljon. Az őshonos házityúk és egyéb baromfi fajták genetikai információjának megőrzése kiemelkedően fontos a mezőgazdasági biodiverzitás fenntartása szempontjából. Az így tárolt allél variációk (pl.: rezisztencia, stressz tűrés, előnyös termelési paraméterek stb.) kiindulási pontjai lehetnek a jövő keresztezési stratégiáinak.

Jelenleg az *in vitro* megőrzés egyik leghatékonyabb módja madaraknál a mindkét ivartól származó ősvarsejtek mélyhűtése és génbanki tárolása. Ennek azért van nagy jelentősége, mert a nőivarban jelenlévő W ivari kromoszóma genetikai anyagát, valamint a mitokondriális DNS-t csak így lehet megőrizni. Madaraknál, ellentétben az emlősökkel, a hímivar rendelkezik a homogametikus ZZ kromoszómával, míg a nőivar a heterogametikus ZW kromoszómapárral.

Napjainkban az ősvarsejtek madárembrió véréből történő kinyerésére, tenyésztésére, mélyhűtésére, valamint a recipiens embrió keringésébe történő visszainjektálásra és ivarszerv kimérák létrehozására léteznek hatékony módszerek. Azonban se a génbanki ősvarsejt minták előállításának, se azok tesztelésének nincs még meg a kialakult gyakorlata. Munkám során a szakirodalmi forrásokat alapul véve, sikerült kidolgoznom egy a házityúk fajták esetében hatékonyan alkalmazható módszertant. A munka sikerességének igazolására *in vitro* és *in vivo* vizsgálatokkal igazoltam az általam eltárolt ősvarsejt minták használhatóságát.

Hat őshonos magyar fajtából izoláltam ősvarsejteket és alapítottam sejtvonalakat. Az átlagos sejtvonal alapítási ráta 42,0 % volt, mely hasonló a más kutatócsoportok által kapott vizsgálati eredményekhez (Vantress heritage fajta: 40-56 %; Fehér leghorn fajta: 49-82 %). Az alapított sejtvonalak pozitív festődést mutattak összejt- és ősvarsejt-specifikus ellenanyagokkal (anti-SSEA-1, anti-DAZL és anti-CVH), továbbá kifejeztek összejt- és ősvarsejt-specifikus géneket (*CVH*, *cPOUV*), mely eredmények bizonyítják, hogy a tenyésztés során hosszú távon fenntartott sejtek valóban ősvarsejtek. Donor eredetű utódokat 4,1 %-os hatékonysággal sikerült létrehoznom, mely hasonló a korábbi kutatások során közölt értékekhez (Gifujidori fajta: 6,0 %; Hinai-dori fajta: 8,1 %; Meiling fajta: 12,6 %). A dolgozatban bemutatott *in vitro* és *in vivo* vizsgálatok eredményei alapján nagy biztonsággal állítható, hogy az ajánlott protokollok alkalmazásával génmegőrzésre alkalmas ősvarsejt génbanki minták állíthatók elő, melyekkel visszanyerhető a megőrizni kívánt őshonos vagy gazdaságilag fontos házityúk fajta vagy jelleg.

## 8. SUMMARY

According to the data published by IUCN and FAO, a considerable number of wild avian species and poultry breeds are vulnerable or endangered. Thus, adequate conservation strategy and prompt action are needed to slow down and eventually stabilize the currently negative trend. Indigenous chicken and other poultry breeds are highly important to protect because they contain numerous valuable allele variants (disease resistance, stress tolerance, production traits, etc.) which could be the raw material for the agricultural biodiversity in the future.

Freezing and gene banking of avian primordial germ cell lines established from both sexes are among the best ways of *in vitro* conservation. In birds, males are homogametic with ZZ sex chromosomes and females are heterogametic with ZW sex chromosomes, thus for the complete preservation of the genome, it is necessary to establish and freeze female cell lines.

Previously, methods were established to efficiently isolate, culture, and freeze primordial germ cells, furthermore injecting PGCs into recipient embryos and creating germline chimeras. In contrast, there is no standard protocol for creating good quality PGC samples for gene banking and for testing of those samples. Therefore, my aim was to propose such a workflow and test it on the samples I collected.

In this study, primordial germ cells were isolated and cell lines were established from six Hungarian indigenous breeds. The average rate of cell line establishment was 42.0 %, which is similar to previous results of other breeds (Vantress heritage breed: 40-56 %; White Leghorn breed: 49-82 %). The cell lines showed specific staining for germ cell- and stem cell-specific antibodies (anti-SSEA-1, anti-DAZL, and anti-CVH), and they expressed germ cell- and stem cell-specific genes (*CVH*, *cPOUV*). Donor-derived offspring were created with 4.1 % efficiency which is comparable to results obtained previously (Gifujidori breed: 6.0 %; Hinai-Dori breed: 8.1 %; Meiling breed: 12.6 %). The results presented in this thesis showed that the proposed protocols are suitable to establish and *in vitro* culture good quality cell lines which are applicable for gene banks, to inject PGCs into the recipients who are able to join the migration pathways of the embryo after injection. and to produce donor-derived animals.

## 9. MELLÉKLETEK

### 9.1. M1 – Irodalomjegyzék

- Aige-Gil, V., and K. Simkiss. 1991. Sterilisation of avian embryos with busulphan. *Res. Vet. Sci.* 50:139–144.
- Aire, T. A. 2011. Anatomy of the testis and male reproductive tract .Pages 37–113 in *Reproductive Biology and Phylogeny of Birds, Part A: Phylogeny, Morphology, Hormones and Fertilization*. Jamieson, B.G.M., ed. Enfield, Jersey, Plymouth.
- Alev, C., M. Nakano, Y. Wu, H. Horiuchi, and G. Sheng. 2013. Manipulating the avian epiblast and epiblast-derived stem cells. *Methods Mol. Biol.* 1074:151–173.
- Andersson, L., and M. Georges. 2004. Domestic-animal genomics: Deciphering the genetics of complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 5:202–212.
- Ara, T., Y. Nakamura, T. Egawa, T. Sugiyama, K. Abe, T. Kishimoto, Y. Matsui, and T. Nagasawa. 2003. Impaired colonization of the gonads by primordial germ cells in mice lacking a chemokine, stromal cell-derived factor-1 (SDF-1). *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100:5319–5323.
- Aramaki, S., F. Sato, T. Kato, T. Soh, Y. Kato, and M. A. Hattori. 2007. Molecular cloning and expression of dead end homologue in chicken primordial germ cells. *Cell Tissue Res.* 330:45–52.
- Bakst, M. R., and J. S. Dymo. 2013. Artificial Insemination in Poultry.in *Success in Artificial Insemination - Quality of Semen and Diagnostics Employed*. Lemma, A., ed.
- Bakst, M. R., G. Wishart, and J.-P. Brillard. 1994. Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 5:117–143.
- Báldy, B. 1954. A baromfi tenyésztése. *Mezőgazda Kiadó, Budapest*.
- Bellairs, R. 1979. The mechanism of somite segmentation in the chick embryo. *J. Embryol. Exp. Morphol.* VOL.51:227–243.
- Biszkup, F., and L. Beke. 1951. A magyaróvári sárga magyar tájfajta tyúk kitenyésztésének módszerei és eredményei. *Agrártudomány* III:461–467.
- Blacket, M. J., C. Robin, R. T. Good, S. F. Lee, and A. D. Miller. 2012. Universal primers for fluorescent labelling of PCR fragments-an efficient and cost-effective approach to genotyping by fluorescence. *Mol. Ecol. Resour.* 12:456–463.
- Blesbois, E. 2007. Current status in avian semen cryopreservation. *Worlds. Poult. Sci. J.* 63:213–



- Bobr, L. W., F. X. Ogasawara, and F. W. Lorenz. 1964. Distribution of Spermatozoa in the Oviduct and Fertility in Domestic. *J. Reprod. Fertil.* 8:49–58.
- Bosselman, R. A., R. Y. Hsu, T. Boggs, S. Hu, J. Bruszewski, S. Ou, L. Kozar, F. Martin, C. Green, F. Jacobsen, M. Nicolson, J. A. Schultz, K. M. Semon, W. Rishell, and R. G. Stewart. 1989. Germline transmission of exogenous genes in the chicken. *Science*. 243:533–535.
- Brillard, J. P. 1993. Sperm storage and transport following natural mating and artificial insemination. *Poult. Sci.* 72:923–928.
- Brinster, R. L., and J. W. Zimmermann. 1994. Spermatogenesis following male germ-cell transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:11298–11302.
- Burrows, W. H., and J. P. Quinn. 1935. A Method of Obtaining Spermatozoa from the Domestic Fowl. *Poult. Sci.* 14:251–253.
- Cain, J. A., N. Solis, and S. J. Cordwell. 2014. Beyond gene expression: The impact of protein post-translational modifications in bacteria. *J. Proteomics* 97:265–286.
- Carsience, R. S., M. E. Clark, A. M. V. Gibbins, and R. J. Etches. 1993. Germline chimeric chickens from dispersed donor blastodermal cells and compromised recipient embryos. *Development* 117:669–675.
- Castrillon, D. H., B. J. Quade, T. Y. Wang, C. Quigley, and C. P. Crum. 2000. The human VASA gene is specifically expressed in the germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97:9585–9590.
- Chalah, T., F. Seigneurin, E. Blesbois, and J. P. Brillard. 1999. In vitro comparison of fowl sperm viability in ejaculates frozen by three different techniques and relationship with subsequent fertility in vivo. *Cryobiology* 39:185–191.
- Chang, I. K., A. Tajima, T. Chikamune, and T. Ohno. 1995. Proliferation of chick primordial germ cells cultured on stroma cells from the germinal ridge. *Cell Biol. Int.* 19:143–150.
- Choi, J. W., S. Kim, T. M. Kim, Y. M. Kim, H. W. Seo, T. S. Park, J. W. Jeong, G. Song, and J. Y. Han. 2010. Basic fibroblast growth factor activates MEK/ERK cell signaling pathway and stimulates the proliferation of chicken primordial germ cells. *PLoS One* 5:e12968.
- Christensen, V. L., B. D. Fairchild, and D. T. Ort. 2005. The relationship between sperm hydrolysis of the perivitelline layer and embryonic livability. *J. Appl. Poult. Res.* 14:60–68.

- Clulow, J., and R. C. Jones. 1982. Production, transport, maturation, storage and survival of spermatozoa in the male Japanese quail, *Coturnix coturnix*. *J. Reprod. Fertil.* 64:259–266.
- Cooper, C. A., A. Challagulla, K. A. Jenkins, T. G. Wise, T. E. O’Neil, K. R. Morris, M. L. Tizard, and T. J. Doran. 2017. Generation of gene edited birds in one generation using sperm transfection assisted gene editing (STAGE). *Transgenic Res.* 26:331–347.
- Doitsidou, M., M. Reichman-Fried, J. Stebler, M. Köprunner, J. Dörries, D. Meyer, C. V. Esguerra, T. C. Leung, and E. Raz. 2002. Guidance of primordial germ cell migration by the chemokine SDF-1. *Cell* 111:647–659.
- Eddy, E. M. 1976. Germ Plasm and the Differentiation of the Germ Cell Line. *Int. Rev. Cytol.* 43:229–280.
- Etches, R. J., R. S. Carsience, M. E. Clark, R. A. Fraser, A. Toner, and A. M. Verrinder Gibbins. 1993. Chimeric chickens and their use in manipulation of the chicken genome. *Poult. Sci.* 72:882–889.
- Evans, M. 2011. Discovering pluripotency: 30 years of mouse embryonic stem cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12:680–686.
- Evans, M. J., and M. H. Kaufman. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* 292:154–156.
- Fujimoto, T., A. Ukeshima, and R. Kiyofuji. 1976. The origin, migration and morphology of the primordial germ cells in the chick embryo. *Anat. Rec.* 185:139–153.
- Fujiwara, Y., T. Komiya, H. Kawabata, M. Sato, H. Fujimoto, M. Furusawa, and T. Noce. 1994. Isolation of a DEAD-family protein gene that encodes a murine homolog of *Drosophila* vasa and its specific expression in germ cell lineage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 91:12258–12262.
- Gilbert, S. F., and M. J. F. Barresi. 2017. *Developmental Biology*, 11Th Edition 2016. *Am. J. Med. Genet. Part A* 173:1430–1430.
- Ginsburg, M. 1994. Primordial germ cell formation in birds. *Ciba Found. Symp.* 182:52–61; discussion 61-67.
- Goudet, J. 2001. FSTAT, a program to estimate and test gene diversities and fixation indices (vers. 2.9.3). [Www.Unil.Ch/Izea/Softwares/Fstat.Html](http://www.Unil.Ch/Izea/Softwares/Fstat.Html) 149:507–526.
- Griffiths, R., M. C. Double, K. Orr, and R. J. G. Dawson. 1998. A DNA test to sex most birds. *Mol. Ecol.* 7:1071–1075.

- Hamburger, V., and H. L. Hamilton. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.* 195:231–272.
- Hammerstedt, R. H., and J. K. Graham. 1992. Cryopreservation of poultry sperm: The enigma of glycerol. *Cryobiology* 29:26–38.
- Han, J. Y. 2009. Germ cells and transgenesis in chickens. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 32:61–80.
- Harvey, W., and H. E. Sigerist. 1628. *Exercitatio anatomica de motu cordis et sanguinis in animalibus*. Movement of the heart and blood in animals. Sumptibus Guilielmi Fitzeri.
- Harvey, A. J., G. Speksnijder, L. R. Baugh, J. A. Morris, and R. Ivarie. 2002. Expression of exogenous protein in the egg white of transgenic chickens. *Nat. Biotechnol.* 20:396–399.
- Héjja, I., E. Várkonyi, L. Zöldág, and J. Barna. 2006. A mesterséges kimérizmus jelentősége baromfiban 1. Rész. Irodalmi áttekintés. *Magy. Allatorvosok Lapja* 128:273–280.
- Hen, G., M. Friedman-Einat, and D. Sela-Donenfeld. 2014. Primordial germ cells in the dorsal mesentery of the chicken embryo demonstrate left-right asymmetry and polarized distribution of the EMA1 epitope. *J. Anat.* 224:556–563.
- Holt, W. V. 2011. Mechanisms of sperm storage in the female reproductive tract: an interspecies comparison. *Reprod Domest Anim* 2:68–74.
- Howarth, B. 1970. An examination for sperm capacitation in the fowl. *Biol. Reprod.* 3:338–341.
- Hughes, G. C. 1963. The Population of Germ Cells in the Developing Female Chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 11:513–536.
- Illmensee, K., and A. P. Mahowald. 1976. The autonomous function of germ plasm in a somatic region of the *Drosophila* egg. *Exp. Cell Res.* 97:127–140.
- Intarapat, S., and C. D. Stern. 2013. Chick stem cells: Current progress and future prospects. *Stem Cell Res.* 11:1378–1392.
- Kagami, H., M. E. Clark, A. M. V. Gibbins, and R. J. Etches. 1995. Sexual differentiation of chimeric chickens containing ZZ and ZW cells in the germline. *Mol. Reprod. Dev.* 42:379–387.
- Karagenç, L., Y. Cinnamon, M. Ginsburg, and J. N. Petitte. 1996. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet.* 19:290–301.
- Kim, Y. M., and J. Y. Han. 2018. The early development of germ cells in chicken. *Int. J. Dev. Biol.* 62:141–148.

- Kim, H., D. H. Kim, J. Y. Han, S. B. Choi, Y.-G. Ko, Y. J. Do, H.-H. Seong, and S. W. Kim. 2013. The Effect of Modified Cryopreservation Method on Viability of Frozen-thawed Primordial Germ Cell on the Korean Native Chicken (Ogye). *J. Anim. Sci. Technol.* 55:427–434.
- Kino, K., B. Pain, S. P. Leibo, M. Cochran, M. E. Clark, and R. J. Etches. 1997. Production of Chicken Chimeras from Injection of Frozen-Thawed Blastodermal Cells. *Poult. Sci.* 76:753–760.
- Kito, G., S. Aramaki, K. Tanaka, T. Soh, N. Yamauchi, and M. Hattori. 2010. Temporal and spatial differential expression of chicken germline-specific proteins cDAZL, CDH and CVH during gametogenesis. *J. Reprod. Dev.* 56:341–346.
- Knaut, H., C. Werz, R. Geisler, E. Busch-Nentwich, R. Dahm, H. G. Frohnhöfer, H. Geiger, D. Gilmour, S. Holley, J. Hooge, D. Jülich, F. Maderspacher, H. M. Maischein, C. Neumann, T. Nicolson, H. Roehl, U. Schönberger, C. Seiler, C. Söllner, M. Sonawane, F. Van Bebber, A. Wehner, C. Weiler, P. Erker, H. Habeck, U. Hagner, C. E. H. Kapst, A. Kirchner, T. Koblizek, U. Langheinrich, C. Loeschke, C. Metzger, R. Nordin, J. Odenthal, M. Pezzuti, K. Schlombs, J. DeSantana-Stamm, T. Trowe, G. Vacun, B. Walderich, A. Walker, and C. Nüsslein-Volhard. 2003. A zebrafish homologue of the chemokine receptor Cxcr4 is a germ-cell guidance receptor. *Nature* 421:279–282.
- Kochav, S., M. Ginsburg, and H. Eyal-Giladi. 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. *Dev. Biol.* 79:296–308.
- Kohara, Y., Y. Kanai, and A. Tajima. 2008. Cryopreservation of gonadal germ cells (GGCs) from the domestic chicken using vitrification. *J. Poult. Sci.* 45:57–61.
- Kong, L., L. Qiu, Q. Guo, Y. Chen, X. Zhang, B. Chen, Y. Zhang, and G. Chang. 2018. Long-term in vitro culture and preliminary establishment of chicken primordial germ cell lines. *PLoS One* 13:e0196459.
- Koo, B. C., M. S. Kwon, H. Lee, M. Kim, D. Kim, J. Y. Roh, Y. Y. Park, X. S. Cui, N. H. Kim, S. J. Byun, and T. Kim. 2010. Tetracycline-dependent expression of the human erythropoietin gene in transgenic chickens. *Transgenic Res.* 19:437–447.
- Kuwana, T., and T. Fujimoto. 1984. Locomotion and scanning electron microscopic observations of primordial germ cells from the embryonic chick blood in vitro. *Anat. Rec.* 209:337–343.

- Kwon, M. S., B. C. Koo, D. Kim, Y. H. Nam, X. S. Cui, N. H. Kim, and T. Kim. 2018. Generation of transgenic chickens expressing the human erythropoietin (hEPO) gene in an oviduct-specific manner: Production of transgenic chicken eggs containing human erythropoietin in egg whites. *PLoS One* 13:e0194721.
- Kwon, M. S., B. C. Koo, J. Y. Roh, M. Kim, J. H. Kim, and T. Kim. 2011. Production of transgenic chickens expressing a tetracycline-inducible GFP gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 410:890–894.
- Lake, P. E., and J. M. Stewart. 1978. Preservation of fowl semen in liquid nitrogen—an improved method. *Br. Poult. Sci.* 19:187–194.
- Lasko, P. F., and M. Ashburner. 1988. The product of the *Drosophila* gene *vasa* is very similar to eukaryotic initiation factor-4A. *Nature* 335:611–617.
- Lavial, F., H. Acloque, E. Bachelard, M. A. Nieto, J. Samarut, and B. Pain. 2009. Ectopic expression of *Cvh* (Chicken *Vasa* homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate. *Dev. Biol.* 330:73–82.
- Lavial, F., and B. Pain. 2010. Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model. *Dev. Growth Differ.* 52:101–114.
- Van De Lavoie, M. C., E. J. Collarini, P. A. Leighton, J. Fesler, D. R. Lu, W. D. Harriman, T. S. Thiyyagasundaram, and R. J. Etches. 2012. Interspecific germline transmission of cultured primordial germ cells. *PLoS One* 7:e35664.
- Van De Lavoie, M. C., J. H. Diamond, P. A. Leighton, C. Mather-Love, B. S. Heyer, R. Bradshaw, A. Kerchner, L. T. Hooi, T. M. Gessaro, S. E. Swanberg, M. E. Delany, and R. J. Etches. 2006. Germline transmission of genetically modified primordial germ cells. *Nature* 441:766–769.
- Lázár, B., M. Anand, R. Tóth, E. P. Várkonyi, K. Liptói, and E. Gócza. 2018. Comparison of the MicroRNA expression profiles of male and female avian primordial germ cell lines. *Stem Cells Int.* 2018:1–17.
- Lee, H. J., H. C. Lee, and J. Y. Han. 2015. Germline modification and engineering in avian species. *Mol. Cells* 38:743–749.
- Lee, J. C. I., L. C. Tsai, P. Y. Hwa, C. L. Chan, A. Huang, S. C. Chin, L. C. Wang, J. T. Lin, A. Linacre, and H. M. Hsieh. 2010. A novel strategy for avian species and gender identification using the *CHD* gene. *Mol. Cell. Probes* 24:27–31.
- Li, Z. D., H. Deng, C. H. Liu, Y. H. Song, J. Sha, N. Wang, and H. Wei. 2002. Production of

- duck-chicken chimeras by transferring early blastodermal cells. *Poult. Sci.* 81:1360–1364.
- Liu, C., I. Chang, K. A. Khazanehdari, S. Thomas, P. Varghese, V. Baskar, R. Alkhatib, and W. Li. 2017. Uniparental chicken offsprings derived from oogenesis of chicken primordial germ cells ( ZZ ). *Biol. Reprod.* 96:686–693.
- Liu, C., K. A. Khazanehdari, V. Baskar, S. Saleem, J. Kinne, U. Wernery, and I. K. Chang. 2012. Production of Chicken Progeny (*Gallus gallus domesticus*) from Interspecies Germline Chimeric Duck (*Anas domesticus*) by Primordial Germ Cell Transfer. *Biol. Reprod.* 86:101.
- Love, J., C. Gribbin, C. Mather, and H. Sang. 1994. Transgenic birds by DNA microinjection. *Bio/Technology* 12:60–66.
- Lu, Y., F. D. West, B. J. Jordan, J. L. Mumaw, E. T. Jordan, A. Gallegos-Cardenas, R. B. Beckstead, and S. L. Stice. 2012. Avian-induced pluripotent stem cells derived using human reprogramming factors. *Stem Cells Dev.* 21:394–403.
- Macdonald, J., J. D. Glover, L. Taylor, H. M. Sang, and M. J. McGrew. 2010. Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells. *PLoS One* 5:e15518.
- Macdonald, J., L. Taylor, A. Sherman, K. Kawakami, Y. Takahashi, H. M. Sang, and M. J. McGrew. 2012. Efficient genetic modification and germ-line transmission of primordial germ cells using piggyBac and Tol2 transposons. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:E1466–E1472.
- Major, P., I. Baczkó, L. Hiripi, K. E. Odening, V. Juhász, Z. Kohajda, A. Horváth, G. Seprényi, M. Kovács, L. Virág, N. Jost, J. Prorok, B. Ördög, Z. Doleschall, S. Nattel, A. Varró, and Z. Bősze. 2016. A novel transgenic rabbit model with reduced repolarization reserve: Long QT syndrome caused by a dominant-negative mutation of the KCNE1 gene. *Br. J. Pharmacol.* 173:2046–2061.
- Matsuzaki, M., and T. Sasanami. 2017. Sperm storage in the female reproductive tract: A conserved reproductive strategy for better fertilization success. Pages 173–186 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC.
- De Melo Bernardo, A., K. Sprenkels, G. Rodrigues, T. Noce, and S. M. C. De Sousa Lopes. 2012. Chicken primordial germ cells use the anterior vitelline veins to enter the embryonic circulation. *Biol. Open* 1:1146–1152.
- Méndez, C., E. Carrasco, and E. Pedernera. 2005. Adenohypophysis regulates cell proliferation in the gonads of the developing chick embryo. *J. Exp. Zool. Part A Comp. Exp. Biol.* 303:179–185.
- Meyer, D. B. 1960. Application of the periodic acid-schiff technique to whole chick embryos.

- Biotech. Histochem. 35:83–89.
- Miller, J. F. A. P. 2004. Events that led to the discovery of T-cell development and function - A personal recollection. *Tissue Antigens* 63:509–517.
- Miyahara, D., T. Mori, R. Makino, Y. Nakamura, I. Oishi, T. Ono, K. Nirasawa, T. Tagami, and H. Kagami. 2014. Culture Conditions for Maintain Propagation, Long-term Survival and Germline Transmission of Chicken Primordial Germ Cell-Like Cells. *J. Poult. Sci.* 51:87–95.
- Miyahara, D., I. Oishi, R. Makino, N. Kurumisawa, R. Nakaya, T. Ono, H. Kagami, and T. Tagami. 2016. Chicken stem cell factor enhances primordial germ cell proliferation cooperatively with fibroblast growth factor 2. *J. Reprod. Dev.* 62:143–149.
- Mizushima, S. 2017. Fertilization 2: Polyspermic fertilization. Pages 105–123 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC.
- Molnár, M., B. Lázár, N. Sztán, B. Végi, Á. Drobnyák, R. Tóth, K. Liptói, M. Marosán, E. Gócza, S. Nandi, M. J. McGrew, and E. P. Várkonyi. 2019. Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes. *Sci. Rep.* 9:1–13.
- Molyneaux, K. A., H. Zinszner, P. S. Kunwar, K. Schaible, J. Stebler, M. J. Sunshine, W. O'Brien, E. Raz, D. Littman, C. Wylie, and R. Lehmann. 2003. The chemokine SDF1/CXCL12 and its receptor CXCR4 regulate mouse germ cell migration and survival. *Development* 130:4279–4286.
- Moore, D. T., P. H. Purdy, and H. D. Blackburn. 2006. A method for cryopreserving chicken primordial germ cells. *Poult. Sci.* 85:1784–1790.
- Mozdziak, P. E., J. Angerman-Stewart, B. Rushton, S. L. Pardue, and J. N. Petitte. 2005. Isolation of chicken primordial germ cells using fluorescence-activated cell sorting. *Poult. Sci.* 84:594–600.
- Munro, A. 1977. Mammalian Chimaeras . Anne McLaren . *Q. Rev. Biol.* 52:416–416.
- Nagai, H., M. Sezaki, K. Kakiguchi, Y. Nakaya, H. C. Lee, R. Ladher, T. Sasanami, J. Y. Han, S. Yonemura, and G. Sheng. 2015. Cellular analysis of cleavage-stage chick embryos reveals hidden conservation in vertebrate early development. *Dev.* 142:1279–1286.
- Nagano, M., M. R. Avarbock, and R. L. Brinster. 1999. Pattern and kinetics of mouse donor spermatogonial stem cell colonization in recipient testes. *Biol. Reprod.* 60:1429–1436.

- Naito, M. 2003. Cryopreservation of Avian Germline Cells and Subsequent Production of Viable Offspring. *J. Poult. Sci.* 40:1–12.
- Naito, M., Y. Matsubara, T. Harumi, T. Tagami, H. Kagami, M. Sakurai, and T. Kuwana. 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. *J. Reprod. Fertil.* 117:291–298.
- Naito, M., K. Nirasawa, and T. Oishi. 1992. Preservation of quail blastoderm cells in liquid nitrogen. *Br. Poult. Sci.* 33:449–453.
- Naito, M., K. Nirasawa, T. Oishi, M. Watanabe, and M. Kinutani. 1991. Production Of Quail-Chick Chimaeras By Blastoderm Cell Transfer. *Br. Poult. Sci.* 32:79–86.
- Naito, M., A. Tajima, T. Tagami, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1994. Preservation of chick primordial germ cells in liquid nitrogen and subsequent production of viable offspring. *J. Reprod. Fertil.* 102:321–325.
- Nakagawa, T., Y.-I. Nabeshima, and S. Yoshida. 2007. Functional Identification of the Actual and Potential Stem Cell Compartments in Mouse Spermatogenesis. *Dev. Cell* 12:195–206.
- Nakamura, Y. 2016. Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. *J. Reprod. Dev.* 62:2016–2052.
- Nakamura, Y., M. Tasai, K. Takeda, K. Nirasawa, and T. Tagami. 2013. Production of Functional Gametes from Cryopreserved Primordial Germ Cells of the Japanese Quail. *J. Reprod. Dev.* 59:580–587.
- Nakamura, Y., F. Usui, D. Miyahara, T. Mori, T. Ono, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami. 2010a. Efficient system for preservation and regeneration of genetic resources in chicken: Concurrent storage of primordial germ cells and live animals from early embryos of a rare indigenous fowl (Gifujidori). *J. Reprod. Fertil. Dev.* 22:1237–1246.
- Nakamura, Y., F. Usui, D. Miyahara, T. Mori, H. Watanabe, T. Ono, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami. 2011. Viability and functionality of primordial germ cells after freeze-thaw in chickens. *J. Poult. Sci.* 48:57–63.
- Nakamura, Y., F. Usui, T. Ono, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami. 2010b. Germline replacement by transfer of primordial germ cells into partially sterilized embryos in the chicken. *Biol. Reprod.* 83:130–137.
- Nakamura, Y., Y. Yamamoto, F. Usui, Y. Atsumi, Y. Ito, T. Ono, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami. 2008. Increased proportion of donor primordial germ cells in



- chimeric gonads by sterilisation of recipient embryos using busulfan sustained-release emulsion in chickens. *Reprod. Fertil. Dev.* 20:900–907.
- Nakamura, Y., Y. Yamamoto, F. Usui, T. Mushika, T. Ono, A. R. Setioko, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami. 2007. Migration and proliferation of primordial germ cells in the early chicken embryo. *Poult. Sci.* 86:2182–2193.
- Nandi, S., J. Whyte, L. Taylor, A. Sherman, V. Nair, P. Kaiser, and M. J. McGrew. 2016. Cryopreservation of specialized chicken lines using cultured primordial germ cells. *Poult. Sci.* 95:1905–1911.
- Nilsson, E. E., and J. G. Cloud. 1992. Rainbow trout chimeras produced by injection of blastomeres into recipient blastulae. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89:9425–9428.
- Niwa, H. 2010. Mouse ES cell culture system as a model of development. *Dev. Growth Differ.* 52:275–283.
- Oishi, I., K. Yoshii, D. Miyahara, H. Kagami, and T. Tagami. 2016. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 6:23980.
- Okutsu, T., S. Shikina, M. Kanno, Y. Takeuchi, and G. Yoshizaki. 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science.* 317:1517.
- Olsen, L. C., R. Aasland, and A. Fjose. 1997. A vasa-like gene in zebrafish identifies putative primordial germ cells. *Mech. Dev.* 66:95–105.
- Olsen, M. W., and B. H. Neher. 1948. The site of fertilization in the domestic fowl. *J. Exp. Zool.* 109:355–366.
- Ono, T., and Y. Machida. 1999. Immunomagnetic purification of viable primordial germ cells of Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 122:255–259.
- Pain, B., M. E. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut, and R. J. Etches. 1996. Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities. *Development* 122:2339–2348.
- Pander, C. 1817. Beiträge zur Entwicklungsgeschichte des Hünchens im Eye. Würzburg.
- Park, S. D. E. 2002. Trypanotolerance in West African cattle and the population genetic effects of selection (PhD Thesis).
- Park, T. S., and J. Y. Han. 2000. Derivation and characterization of pluripotent embryonic germ cells in chicken. *Mol. Reprod. Dev.* 56:475–482.

- Park, T. S., and J. Y. Han. 2012. piggyBac transposition into primordial germ cells is an efficient tool for transgenesis in chickens. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 109:9337–9341.
- Park, T. S., H. J. Lee, K. H. Kim, J. S. Kim, and J. Y. Han. 2014. Targeted gene knockout in chickens mediated by TALENs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111:12716–12721.
- Patakiné Várkonyi, E., E. Gócza, and B. Lázár. 2017. Génmegőrzés embrionális sejtek segítségével. Page 214 in *Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében*. Szalay, I., ed. Mezőgazda Lap- és Könyvkiadó, Budapest.
- Péczely, P. 2013. *Madár szaporodásbiológia*. Agroiinform Kiadó, Budapest.
- Péczely, P., G. Réz, and G. Zboray. 2007. *Összehasonlító anatómiai praktikum II.* (G Zboray, Ed.). Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
- Perevozchikov, A. P., O. K. Kuznetsov, and Y. P. Zerov. 1973. RNA dependent RNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Dokl. Biol. Sci.* 209:121–124.
- Petitte, J. N., M. E. Clarck, G. Liu, A. M. Verrinder Gibbins, and R. J. Etches. 1990. Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells. *Development* 108:185–189.
- Pham, P. V. 2018. Medical biotechnology: Techniques and applications. Pages 449–469 in *Omics Technologies and Bio-engineering: Towards Improving Quality of Life*.
- Rapp, J. C., A. J. Harvey, G. L. Speksnijder, W. Hu, and R. Ivarie. 2003. Biologically active human interferon  $\alpha$ -2b produced in the egg white of transgenic hens. *Transgenic Res.* 12:569–575.
- Raya, A., and J. C. Izpisua Belmonte. 2004. Unveiling the establishment of left-right asymmetry in the chick embryo. *Mech. Dev.* 121:1043–1054.
- Reedy, S. E., S. P. Leibo, M. E. Clark, and R. J. Etches. 1995. Beyond freezing semen .Pages 251–261 in *Proceedings First International Symposium on the Artificial Insemination of Poultry*. Bakst, M.R., Wishart, G.J., eds. Poultry Science Association, Savoy, IL.
- Reynaud, G. 1969. Transfert de cellules germinales primordiales de Dindon à l’embryon de Poulet par injection intravasculaire. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 21:485–507.
- Rikimaru, K., N. Ito, Y. Nakamura, D. Takahashi, M. Ono, M. Komatsu, and K. Matsubara. 2011. Identification of germline chimeric chickens produced by transfer of primordial germ cells using a Hinai-dori-specific microsatellite marker. *J. Poult. Sci.* 48:281–291.
- Rikimaru, K., Y. Nakamura, D. Takahashi, M. Komatsu, N. Ito, K. Matsubara, and T. Tagami.

2014. Production of Pure Hinai-dori with Normal Reproductive Capability from Transferred Primordial Germ Cells. *J. Poult. Sci.* 51:297–306.
- Rous, P. 1911. A sarcoma of the fowl transmissible by an agent separable from the tumor cells. *J. Exp. Med.* 13:397–411.
- Roussell, D. L., and K. L. Bennett. 1993. *glh-1*, A germ-line putative RNA helicase from *Caenorhabditis*, has four zinc fingers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90:9300–9304.
- Saitou, M., S. C. Barton, and M. A. Surani. 2002. A molecular programme for the specification of germ cell fate in mice. *Nature* 418:293–300.
- Salter, D. W., E. J. Smith, S. H. Hughes, S. E. Wright, A. M. Fadly, R. L. Witter, and L. B. Crittenden. 1986. Gene insertion into the chicken germ line by retroviruses. *Poult. Sci.* 65:1445–1458.
- Sanchez-Garcia, L., L. Martín, R. Mangues, N. Ferrer-Miralles, E. Vázquez, and A. Villaverde. 2016. Recombinant pharmaceuticals from microbial cells: A 2015 update. *Microb. Cell Fact.* 15.
- Sawicka, D., L. Chojnacka-Puchta, M. Zielinski, G. Plucienniczak, A. Plucienniczak, and M. Bednarczyk. 2015. Flow cytometric analysis of apoptosis in cryoconserved chicken primordial germ cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* 20:143–159.
- Seok, J. K., W. C. Jin, Y. K. Sun, J. P. Kyung, M. K. Tae, M. L. Young, H. Kim, M. L. Jeong, and Y. H. Jae. 2008. Reproduction of wild birds via interspecies germ cell transplantation. *Biol. Reprod.* 79:931–937.
- Setioko, A. R., T. Tagami, H. Tase, Y. Nakamura, K. Takeda, and K. Nirasawa. 2007. Cryopreservation of Primordial Germ Cells (PGCs) from white leghorn embryos using commercial cryoprotectants. *J. Poult. Sci.* 44:73–77.
- Sherman, A., A. Dawson, C. Mather, H. Gilhooley, Y. Li, R. Mitchell, D. Finnegan, and H. Sang. 1998. Transposition of the drosophila element mariner into the chicken germ line. *Nat. Biotechnol.* 16:1050–1053.
- Smith, C. A., K. N. Roeszler, J. Bowles, P. Koopman, and A. H. Sinclair. 2008. Onset of meiosis in the chicken embryo; evidence of a role for retinoic acid. *BMC Dev. Biol.* 8:85.
- Srihawong, T., P. Teinlek, and C. Tirawattanawanich. 2016. Investigation of an In Vitro Culture System for Siamese Fireback Pheasant (*Lophura diardi*) Primordial Germ Cell. *J. Kasetsart Vet.* 26:70–82.

- Stebler, J., D. Spieler, K. Slanchev, K. A. Molyneaux, U. Richter, V. Cojocaru, V. Tarabykin, C. Wylie, M. Kessel, and E. Raz. 2004. Primordial germ cell migration in the chick and mouse embryo: The role of the chemokine SDF-1/CXCL12. *Dev. Biol.* 272:351–361.
- Stern, C. D. 2000. Conrad H. Waddington's contributions to avian and mammalian development, 1930-1940. *Int. J. Dev. Biol.* 44:15–22.
- Swift, C. H. 1914. Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick. *Am. J. Anat.* 15:483–516.
- Szalay, I. 2015. Régi magyar baromfifajták a XXI. században (Old Hungarian Poultry in the 21th century). *Mezőgazda Kiadó, Budapest.*
- Tagami, T., H. Kagami, Y. Matsubara, T. Harumi, M. Naito, K. Takeda, H. Hanada, and K. Nirasawa. 2007. Differentiation of female primordial germ cells in the male testes of chicken (*Gallus gallus domesticus*). *Mol. Reprod. Dev.* 74:68–75.
- Tagami, T., D. Miyahara, and Y. Nakamura. 2017. Avian primordial germ cells .Pages 1–18 in *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer New York LLC.
- Tajima, A. 2002. Production of germ-line chimeras and their application in domestic chicken. *Avian Poult. Biol. Rev.* 13:15–30.
- Tajima, A., E. F. Graham, R. N. Shoffner, J. S. Otis, and D. M. Hawkins. 1990. Cryopreservation of semen from unique lines of chicken germ plasm. *Poult. Sci.* 69:999–1002.
- Tajima, A., H. Hayashi, A. Kamizumi, J. Ogura, T. Kuwana, and T. Chikamune. 1999. Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos. *J. Exp. Zool.* 284:759–764.
- Tajima, A., M. Naito, Y. Yasuda, and T. Kuwana. 1993. Production of germ line chimera by transfer of primordial germ cells in the domestic chicken (*Gallus domesticus*). *Theriogenology* 40:509–519.
- Tam, P. P. L., and S. X. Zhou. 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. *Dev. Biol.* 178:124–132.
- Taylor, L., D. F. Carlson, S. Nandi, A. Sherman, S. C. Fahrenkrug, and M. J. McGrew. 2017. Efficient TALEN-mediated gene targeting of chicken primordial germ cells. *Dev.* 144:928–934.

- Thoraval, P., M. Afanassieff, F. L. Cosset, F. Lasserre, G. Verdier, F. Coudert, and G. Dambrine. 1995. Germline transmission of exogenous genes in chickens using helper-free ecotropic avian leukosis virus-based vectors. *Transgenic Res.* 4:369–377.
- Thoraval, P., F. Lasserre, F. Coudert, and G. Dambrine. 1994. Somatic and germline chicken chimeras obtained from brown and white Leghorns by transfer of early blastodermal cells. *Poult. Sci.* 73:1897–1905.
- Tickle, C. 2004. The contribution of chicken embryology to the understanding of vertebrate limb development. *Mech. Dev.* 121:1019–1029.
- Tirawattanawanich, C. 2012. Conservation of Red Junglefowl Biodiversity by Primordial Germ Cell Cryopreservation .Pages 82–92 in *The Proceeding of the Human-Chicken Multi-Relationships (HCMR) Symposium*. Thailand.
- Tonus, C., K. Cloquette, F. Ectors, J. Piret, L. Gillet, N. Antoine, D. Desmecht, A. Vanderplasschen, O. Waroux, and L. Grobet. 2016. Long term-cultured and cryopreserved primordial germ cells from various chicken breeds retain high proliferative potential and gonadal colonisation competency. *Reprod. Fertil. Dev.* 28:628–639.
- Tonus, C., D. Connan, O. Waroux, B. Vandenhove, J. Wayet, L. Gillet, D. Desmecht, N. Antoine, F. J. Ectors, and L. Grobet. 2017. Cryopreservation of chicken primordial germ cells by vitrification and slow freezing: A comparative study. *Theriogenology* 88:197–206.
- Tsunekawa, N., M. Naito, Y. Sakai, T. Nishida, and T. Noce. 2000. Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells. *Development* 127:2741–2750.
- Tyack, S. G., K. A. Jenkins, T. E. O’Neil, T. G. Wise, K. R. Morris, M. P. Bruce, S. McLeod, A. J. Wade, J. McKay, R. J. Moore, K. A. Schat, J. W. Lowenthal, and T. J. Doran. 2013. A new method for producing transgenic birds via direct in vivo transfection of primordial germ cells. *Transgenic Res.* 22:1257–1264.
- Urven, L. E., U. K. Abbott, and C. A. Erickson. 1989. Distribution of extracellular matrix in the migratory pathway of avian primordial germ cells. *Anat. Rec.* 224:14–21.
- Váradi, É., B. Végi, K. Liptói, and J. Barna. 2013. Methods for Cryopreservation of Guinea Fowl Sperm. *PLoS One* 8:e62759.
- Venkatarama, T., F. Lai, X. Luo, Y. Zhou, K. Newman, and M. Lou King. 2010. Repression of zygotic gene expression in the *Xenopus* germline. *Development* 137:651–660.
- Vick, L., Y. Li, and K. Simkiss. 1993. Transgenic birds from transformed primordial germ cells.

Proc. R. Soc. B Biol. Sci. 251:179–182.

Waldeyer, W. 1870. *Eirstock und Ei*. 1st ed. Leipzig.

Wang, L., M. J. Chen, D. Y. Chen, S. F. Peng, X. L. Zhou, Y. Y. Liao, X. G. Yang, H. Y. Xu, S. S. Lu, M. Zhang, K. H. Lu, and Y. Q. Lu. 2017. Derivation and characterization of primordial germ cells from Guangxi yellow-feather chickens. *Poult. Sci.* 96:1419–1425.

Wernery, U., C. Liu, V. Baskar, Z. Guerineche, K. A. Khazanehdari, S. Saleem, J. Kinne, R. Wernery, D. K. Griffin, and I. K. Chang. 2010. Primordial germ cell-mediated chimera technology produces viable pure-line houbara bustard offspring: Potential for repopulating an endangered species. *PLoS One* 5:e15824.

Whyte, J., J. D. Glover, M. Woodcock, J. Brzeszczynska, L. Taylor, A. Sherman, P. Kaiser, and M. J. McGrew. 2015. FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports* 5:1171–1182.

Wolfné Táskai, E. 2000. A madarak szaporodásbiológiai folyamatai .Pages 592–607 in *A gazdasági állatok élettana az anatómia alapjaival*. Husvéth, F., ed. Mezőgazda Kiadó, Budapest.

Woodcock, M. E., A. A. Gheyas, A. S. Mason, S. Nandi, L. Taylor, A. Sherman, J. Smith, D. W. Burt, R. Hawken, and M. J. McGrew. 2019. Reviving rare chicken breeds using genetically engineered sterility in surrogate host birds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 116:20930–20937.

Yan, L., J. S. Gao, L. Rui, Y. N. Lu, Z. Y. Wan, X. X. Yu, W. X. Zhang, H. T. Li, Q. Shao, J. Zhang, and Z. D. Li. 2014. A review of strategies for producing chimeric birds. *Avian Biol. Res.* 7:3–9.

Yoon, C., K. Kawakami, and N. Hopkins. 1997. Zebrafish vasa homologue RNA is localized to the cleavage planes of 2- and 4-cell-stage embryos and is expressed in the primordial germ cells. *Development* 124:3157–3165.

Yoshizaki, G., M. Ichikawa, M. Hayashi, Y. Iwasaki, M. Miwa, S. Shikina, and T. Okutsu. 2010. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development* 137:1584.

Yoshizaki, G., S. Sakatani, H. Tominaga, and T. Takeuchi. 2000. Cloning and characterization of a vasa-like gene in rainbow trout and its expression in the germ cell lineage. *Mol. Reprod. Dev.* 55:364–371.

Yu, F., Z. Zhu, X. Chen, J. Huang, R. Jia, and J. Pan. 2019. Isolation, characterization and germline chimera preparation of primordial germ cells from the Chinese Meiling chicken.

Poult. Sci. 98:566–572.

Zhang, Z., P. Sun, F. Yu, L. Yan, F. Yuan, W. Zhang, T. Wang, Z. Wan, Q. Shao, and Z. Li. 2012. Transgenic Quail Production by Microinjection of Lentiviral Vector into the Early Embryo Blood Vessels. *PLoS One* 7:e50817.

Zhu, L., M. C. Van De Lavoie, J. Albanese, D. O. Beenhouwer, P. M. Cardarelli, S. Cuison, D. F. Deng, S. Deshpande, J. H. Diamond, L. Green, E. L. Halk, B. S. Heyer, R. M. Kay, A. Kerchner, P. A. Leighton, C. M. Mather, S. L. Morrison, Z. L. Nikolov, D. B. Passmore, A. Pradas-Monne, B. T. Preston, V. S. Rangan, M. Shi, M. Srinivasan, S. G. White, P. Winters-Digiacinto, S. Wong, W. Zhou, and R. J. Etches. 2005. Production of human monoclonal antibody in eggs of chimeric chickens. *Nat. Biotechnol.* 23:1159–1169.

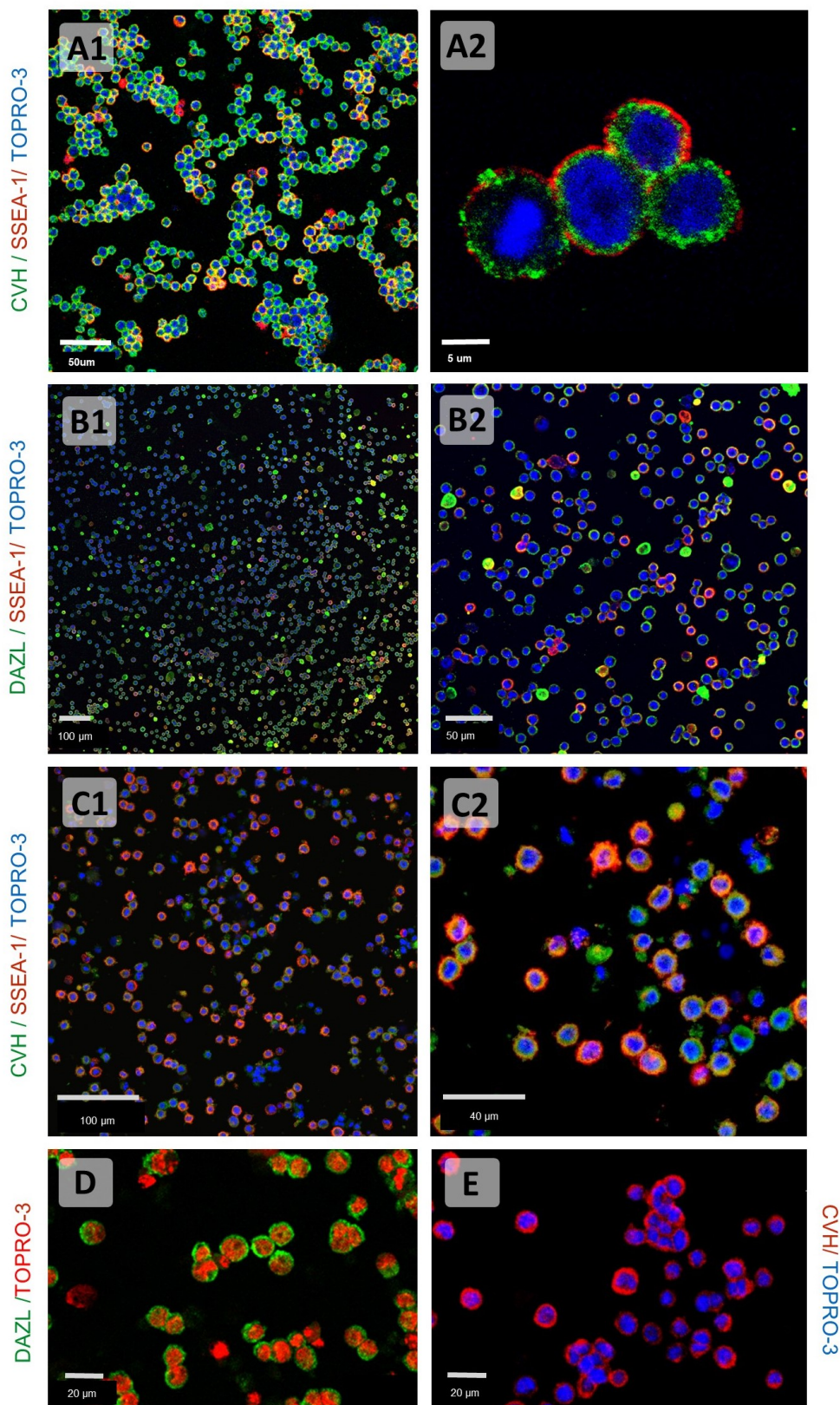
**9.2. M2 – Az ivarmeghatározás, cDNS írás, qPCR és mikroszatellit marker vizsgálat során alkalmazott reakciók paraméterei**

Reakció	Paraméterek		
	Hőmérséklet	Idő	Ismétlés
<b><i>P2-P8 sex PCR</i></b>	95 °C	1 perc	1x
	95 °C	15 mp	
	48 °C	45 mp	35x
	72 °C	10 mp	
	72 °C	2 perc 30 mp	1x
<b><i>CHD1 sex PCR</i></b>	95 °C	1 perc	1x
	95 °C	15 mp	
	48 °C	30 mp	28x
	72 °C	10 mp	
	72 °C	5 perc	1x
<b><i>cDNS írás</i></b>	25 °C	10 perc	1x
	37 °C	120 perc	1x
	85 °C	5 perc	1x
<b><i>qPCR futtatás</i></b>	95 °C	10 perc	1x
	95 °C	15 mp	
	60 °C	40 mp	40x
	68 °C	20 mp	
	95 °C	15 mp	1x
	48 °C	15 mp	1x
	95 °C	15 mp	1x
<b><i>Mikroszatellit markerek vizsgálata</i></b>	95 °C	4 perc	1x
	95 °C	15 mp	
	60 °C	30 mp	30x
	72 °C	1 perc	
	72 °C	9 perc	1x



### 9.3. M3 – Az alapított ősvarsejt vonalak immunhisztokémiai festése

Minden vizsgált vonal ősvarsejt (DAZL, CVH) és őssejt (SSEA-1) specifikus festődést mutatott. A DAZL és a CVH a citoplazmában található, míg az SSEA-1 egy sejtfelszíni antigén, így a pozitív sejtek jellemzően festődtek mind a citoplazmában, mind a sejtmembránban. **A1, A2:** Fogolyszínű magyar fajta nőivarú ősvarsejt vonal.; **B1, B2:** Sárga magyar fajta nőivarú ősvarsejt vonal.; **C1, C2:** Fekete erdélyi kopasznyakú hímivarú ősvarsejt vonal.; **D:** Kendermagos erdélyi kopasznyakú nőivarú ősvarsejt vonal.; **E:** Kendermagos magyar fajta hímivarú ősvarsejt vonal.



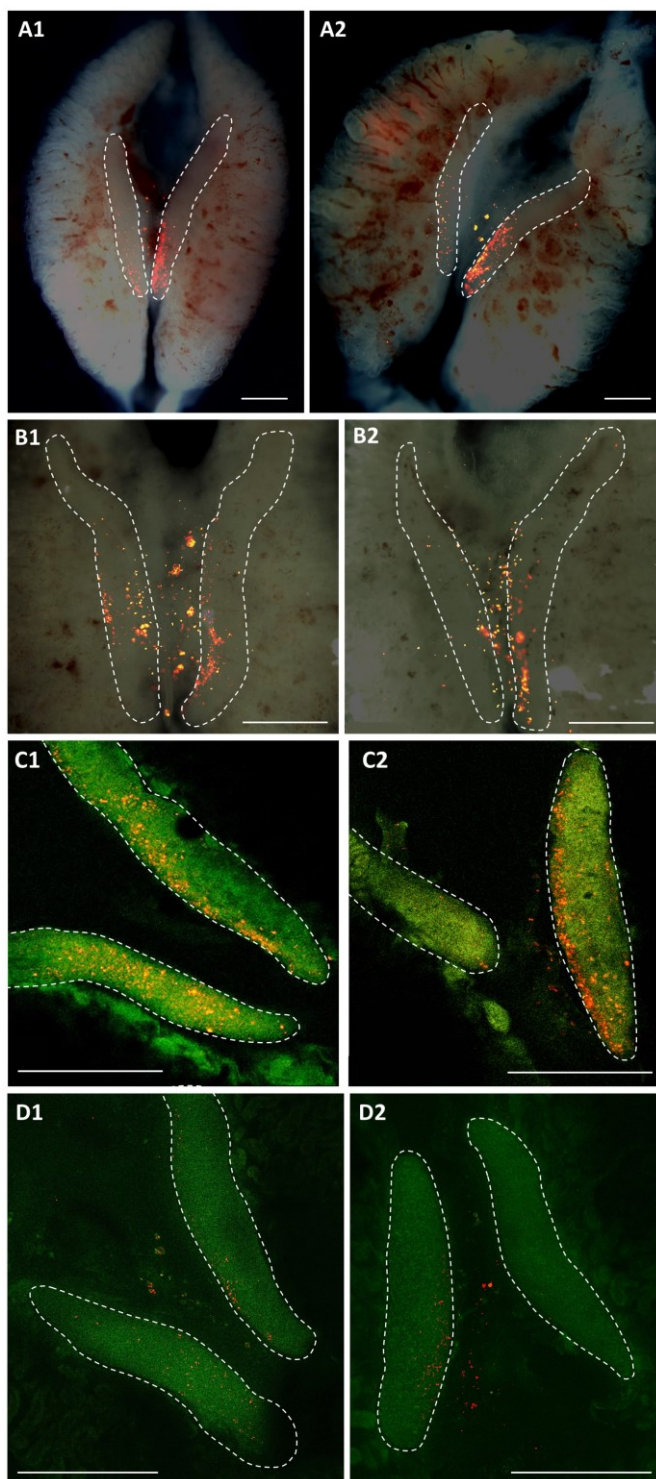
#### 9.4. M4 – Allélgyakoriságok összehasonlítása

Mikroszatellit lokusz	Allélméret (bp)	Allélgyakoriság	
		Ősivarsejt vonalak	Kontroll állomány
MCW0067	177	33,33	31,67
	179	42,86	28,33
	183	23,81	40,00
MCW0248	214	88,10	76,67
	218	11,90	23,33
MCW0020	179	14,29	16,67
	181	14,29	20,00
	183	26,19	10,00
	185	45,24	50,00
	198		3,33
ADL0268	104	7,14	11,67
	107	14,29	13,33
	109	16,67	11,67
	111	57,14	63,33
	113	4,76	
MCW0103	268	30,95	28,33
	272	69,05	71,67
MCW0206	224	64,29	55,00
	228		1,67
	232	16,67	15,00
	240	19,05	28,33
MCW0037	150	40,48	13,79
	152	35,71	62,07
	154	23,81	24,14
LEI0234	216	2,38	
	218	19,05	20,83
	276	11,90	12,50
	288	2,38	18,75
	290	14,29	8,33
	294	2,38	
	310	30,95	37,50
	312	4,76	
	314	9,52	
	316	2,38	
LEI0166	318		2,08
	343	19,05	17,31
	347	52,38	67,31
	353	28,57	15,38
MCW0222	217	9,52	8,62

	219	76,19	81,03
	223	14,29	10,34
<b>MCW0098</b>	255	100,00	96,67
	257		3,33
<b>MCW0034</b>	222	26,19	32,76
	224	35,71	31,03
	226	7,14	3,45
	230	4,76	3,45
	232	14,29	13,79
	236	11,90	12,07
	248		3,45
<b>ADL0278</b>	112	80,95	86,21
	116	4,76	6,90
	118		5,17
	123	14,29	1,72
<b>ADL0112</b>	122	5,00	7,89
	124	72,50	73,68
	126		5,26
	128	15,00	10,53
	130	7,50	
	137		2,63
<b>MCW0216</b>	143	30,00	16,67
	145	7,50	21,67
	147	62,50	61,67
<b>MCW0014</b>	162		54,17
	165	20,00	
	178		25,00
	180	72,50	20,83
	184	7,50	
<b>LEI0094</b>	259		1,72
	261	25,00	27,59
	263	30,00	17,24
	265	45,00	46,55
	283		6,90

### 9.5. M5 – Fluoreszcensen jelölt donor ősvarsejtek vizsgálata a recipiens embrióban

A jelölt donor sejteket 2.5 napos (HH14-17) recipiens embriók keringésébe injektáltam, majd 6 napos korban az embrionális gonádokban vizsgáltam a sejtek jelenlétét/hiányát. A képeken különböző fajtákból származó ősvarsejtek (piros) láthatóak a recipiens embriók ivarszervében. A recipiens embrióból származó ivarszerv pár (fehér szaggatott vonallal kiemelve) az ősvese (mesonephros) felületén található. A bevándorlás ténye jelzi, hogy az adott sejtvonal az *in vitro* tenyésztés és mélyhűtés után is képes az embrióon belüli hatékony vándorlásra. **A:** Sárga magyar sejtvonalakból származó ősvarsejtek a recipiens gonádban (**A1:** hím sejtvonal, **A2:** nő ivarú sejtvonal). **B:** Fehér magyar sejtvonalakból származó ősvarsejtek a recipiens gonádban (**B1:** hím sejtvonal, **B2:** nőivarú sejtvonal). **C:** Kendermagos erdélyi kopasznnyakú sejtvonalakból származó ősvarsejtek a recipiens gonádban (**C1:** hím sejtvonal, **C2:** nő ivarú sejtvonal). **D:** Fogolyszínű magyar sejtvonalakból származó ősvarsejtek a recipiens gonádban (**D1:** hím sejtvonal, **D2:** nő ivarú sejtvonal). (Méterarány: 500  $\mu$ m)





## 10. FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

### Az értekezés témakörében megjelent impakt faktoros tudományos szakcikkek:

- Sztán, N., **Lázár, B.**, Bodzsár, N., Végi, B., Liptói, K., Pain, B., Patakiné Várkonyi, E. (2017): Successful chimera production in the Hungarian goose (*Anser anser domestica*) by intracardiac injection of blastodermal cells in 3-day-old embryos. **REPRODUCTION, FERTILITY AND DEVELOPMENT**. doi: 10.1071/RD16289. **Q1, IF: 2.656**
- **Lázár, B.\***, Anand, M.\*, Tóth, R., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Gócza, E. (2018): Comparison of the microRNA expression profiles of male and female avian primordial germ cell lines., PMID: 30123283, **STEM CELLS INTERNATIONAL**. **Q2, IF: 3.989**
- Anand\*, M., **Lázár\*, B.**, Tóth, R., Páll, E., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Homolya, L., Hegyi, Z., Hidas, A., Gócza, E. (2018): Enhancement the chicken primordial germ cell in vitro maintenance using automated cell image analyser. **ACTA VETERINARIA HUNGARICA** 66(4): 518–529. **Q2, IF:1.042**
- Tóth Roland, **Lázár Bence**, Tokodyné Szabadi Nikolett, Patakiné Várkonyi Eszter, Gócza Elen (2019): Őshonos magyar tyúkfajták, mint lehetséges univerzális recipiensek az ősvarsejt alapú génmegőrzésben. **MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA** 141/439-447. **Q4, IF: 0,143**
- Molnár, M., **Lázár, B.**, Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Liptói, K., Marosán, M., Gócza, E., Nandi, S., McGrew, M. J., Patakiné Várkonyi, E. (2019): Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes. **SCIENTIFIC REPORT**, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50763-3>. **D1, IF:4,585**
- **Lázár, B.**, Molnár, M., Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., McGrew, M. J., Gócza, E., Patakiné Várkonyi, E. (2020): Successful cryopreservation and regeneration of a Partridge coloured Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. **POULTRY SCIENCE** *jelenleg bírálattal alatt.*

### Az értekezés témájában íródott könyvfejezetek:

- Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E., **Lázár, B.** (2017): **Génmegőrzés embrionális sejtek segítségével.** In: Szalay István (szerk.) Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében: Műhelytanulmányok a tudományos génmegőrzés tárgyköréből. 214 p. Budapest; Gödöllő: Haszonállat-génmegőrzési Központ, 2017, pp.64-80. (ISBN 978-963-286-729-8)
- Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E., **Lázár, B.**, Sztán, N. (2017): **Mindkét ivar megőrzése embrionális sejtek segítségével különböző baromfifajokban.** In: Szalay István (szerk.) Génbanki kutatások régi haszonállataink védelmében: Műhelytanulmányok a tudományos génmegőrzés tárgyköréből. 214p. Budapest; Gödöllő: Haszonállat-génmegőrzési Központ, 2017, pp.113-122. (ISBN 978-963-286-729-8)

**Az értekezés témájában megjelent nem impakt faktoros tudományos szakcikkek:**

- Anand, M., Tóth, R., Kidane, A., Nagy, A., **Lazar, B.**, Patakiné Várkonyi E., Liptói, K., Gócza, E. (2016): Examination the expression pattern of HSP70 heat shock protein in chicken PGCs and developing genital ridge. Scientific Papers: **Animal Science and Biotechnologies**, 49 (1), 78-82.
- **Lázár, B** (2018): Comparison of the MicroRNA Expression Profiles of Male and Female Avian Primordial Germ Cell Lines. (short report), **Image Newsletter**, 2018/4. pp. 5. (image/Newsletter4).
- Molnár, M., **Lázár, B.**, Nandi, S., McGrew, M. J., Patakiné Várkonyi, E. (2019): Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes. **Innovative Management of Animal Genetic Resources Newsletter**, 2019/7. pp. 8-9.

**Az értekezés témájában megjelent magyar nyelvű ismeretterjesztő cikkek:**

- Tóth, R., **Lázár, B.**, Gócza, E. (2018): A házityúk-ivarszerv kialakulásának érdekességei. Tyúkok, tojások, őssejtek. **Természettudományi Közlöny**, 149(11):498-504.
- **Lázár, B.**, Patakiné Várkonyi, E., Gócza, E. (2016): Embriológiai vizsgálatok a genetikai sokféleségért. Madárles a tojásban. **Élet és Tudomány**, LXXI. (3): 84-85.

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsősorban témavezetőimnek, **Dr. Gócza Elennek** és **Patakiné Dr. Várkonyi Eszternek** tartozom köszönettel és hálával az elmúlt évek során nyújtott szakmai és emberi támogatásukért. Elennek köszönöm, hogy lehetőséget biztosított a PhD tanulmányok elkezdésére, valamint türelmét és tanácsait, amivel végig kísérte a dolgozat (hosszas) létrejöttét. Eszternek köszönöm a rengeteg biztatást, motiválást és a (sokszor megelőlegezett) bizalmat a munkám során. Kettőjük iránymutatása és szakértelme, valamint az általuk előteremtett források nélkül ez a dolgozat nem készülhetett volna el. Az ő vezetésükkel munkám nyugalomban és jó hangulatban folyhatott, bármilyen felmerülő probléma esetén számíthattam rájuk.

Köszönettel tartozom **Dr. Liptói Krisztinának**, segítségével csatlakozhattam az NBGK HGI kötelékéhez.

Köszönöm az összes NAIK MBK-s és NBGK HGI-s kollégámnak, akik a folyamat valamely pontján segítségemre voltak tanáccsal, labor munkával, telepi feladatok elvégzésével, illetve baráti légkört teremtettek mindkét intézetben. Külön köszönöm **Tóth Rolandnak** az MBK-ban zajlott kísérletek során nyújtott segítségét, illetve **Molnár Marian-nak** a HGI-ben folyó feladatokba való rendszeres bekapcsolódást és precíz tojás, illetve állat nyilvántartást. Köszönöm a NBGK HGI Genetikai és Szaporodásbiológia Kutatócsoport munkatársainak, külön **Sztán Nikolettának**, **Dr. Bodzsár Nórának**, **Dr. Végi Barbarának**, **Drobnay Árpádnak** és **Dr. Barna Juditnak**, hogy segítségemre voltak a mikroszatellit vizsgálatok és a telepi feladatok ellátásában. Köszönet illeti a NAIK MBK Digitális Képkalkító Laboratórium jelenlegi és volt munkatársait **Dr. Tóth Zoltánt** és **Iski Gergelyt** a konfokális mikroszkópos felvételek elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönöm **Dr. Nagy Nándornak** és kutatócsoportjának (SOTE Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet), hogy segítettek elsajátítani immunhisztokémiai és madár embriómanipulációs technikákat, amelyek rendkívül hasznosnak bizonyultak a kísérleteim során.

Hálás vagyok **Dr. Mike McGrew-nak** és csoportjának (The Roslin Institute), ahol PhD tanulmányaim kezdetekor megtanulhattam az alapokat madár ősvarsejtek izolálásáról és tenyésztéséről.

Köszönöm továbbá szüleimnek **Lázárné Kontor Emíliának** és **Lázár Miklósnak**, valamint páromnak **Gudor Dettinek** a dolgozat megírása során nyújtott biztos háttérrel és rengeteg támogatást.