



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Genetika és
Biotechnológia Intézet

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

**IVARSZERV VIZSGÁLATOK HÁZITYÚKBAN: A
HŐKEZELÉS HATÁSÁNAK ÉS AZ ŐSIVARSEJTEK
INTEGRÁCIÓS KÉPESSÉGÉNEK TESZTELÉSE**

DOI: 10.54598/002320

**Tóth Roland Imre
Gödöllő
2022**

A doktori iskola

megnevezése: Állattbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztési tudományok

vezetője: Dr. Mézes Miklós

egyetemi tanár, MTA rendes tagja

MATE, Mezőgazdasági- és Környezettudományi Kar
Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: Dr. Gócza Elen

MTA levelező tagja, tudományos tanácsadó

MATE, GBI, ÁBI tanszékvezető

.....

Iskolavezető jóváhagyása

Dr. Mézes Miklós, akadémikus

.....

Témavezető jóváhagyása

Dr. Gócza Elen, akadémikus

Tartalomjegyzék

1. JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	- 5 -
2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK	- 7 -
2.1. Bevezetés	- 7 -
2.2. Célkítűzés	- 8 -
3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS	- 9 -
3.1. A hő hatása az állatokra	- 9 -
3.1.1. Hőkezelési eljárások	- 9 -
3.1.2. Hősokk fehérjék és hősokk faktorok	- 10 -
3.1.3. Hőkezelés és hőstressz hatásának kimutatása <i>HSF</i> és <i>HSP</i> expressziók mérésével ..	- 11 -
3.1.4. Házityúk ivarszervekben végbemenő <i>HSF</i> és <i>HSP</i> változások hőkezelés hatására ..	- 12 -
3.2. Ivarszervek morfológiai jellemzése	- 12 -
3.2.1. Hímivar	- 13 -
3.2.2. Nőivar	- 14 -
3.3. Kísérletekben használt őshonos magyar házityúk fajták bemutatása	- 15 -
3.3.1. Kendermagos erdélyi kopasznyakú fajta	- 15 -
3.3.2. Fogolyszínű magyar fajta	- 15 -
3.3.3. Fehér magyar fajta	- 16 -
3.3.4. Sárga magyar fajta	- 17 -
3.4. Házityúk embriófejlődés	- 17 -
3.5. Ősivarsejtek (PGC) szerepe az ivarszervben	- 18 -
3.5.1. PGC eredet és vándorlás	- 18 -
3.5.2. Ivarsejtek érése	- 20 -
3.5.3. Ősivarsejtek hosszú távú fenntartása	- 20 -
3.5.4. Transzgenikus ősivarsejt vonalak előállítás	- 21 -
3.5.5. Ivarszervi kiméra egyedek előállítása GFP-PGC visszainjektálásával	- 22 -
3.5.6. Ideális recipiens fajta jelentősége	- 23 -
4. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN	- 25 -
4.1. Kísérleti állatok és engedélyek	- 25 -
4.2. Hőhatások	- 25 -
4.2.1. Hőkezelés	- 25 -
4.2.2. Hőstressz	- 25 -
4.3. Hőkezelési kísérletekből származó szöveti minták gyűjtése, elemzése	- 26 -
4.3.1. Szervek izolálása, tárolása	- 26 -
4.3.2. Ivarszervek izolálása	- 26 -
4.3.3. RNS izolálás szövetmintákból	- 27 -
4.3.4. cDNS írás és génexpressziós vizsgálatok kvantitatív real-time qPCR-rel	- 27 -
4.3.5. DNS izolálás izomszövetből	- 28 -
4.3.6. Ivarmeghatározás (szex PCR)	- 29 -
4.4. Fluoreszcensen jelölt ősivarsejt (PGC) vonalak alapítása, karakterizálása	- 31 -
4.4.1. PGC vonalak alapítása	- 31 -
4.4.2. PGC vonalak fenntartása, tenyésztése	- 32 -
4.4.3. PGC tenyészetek mélyhűtése	- 32 -
4.4.4. DNS izolálás PG sejtekből	- 33 -
4.4.5. RNS izolálás PG sejtekből	- 33 -
4.4.6. PGC tenyészetek felolvasztása	- 34 -
4.4.7. PG sejtek immunhisztokémiai vizsgálata	- 34 -
4.4.8. PG sejtek proliferációs rátájának és apoptotikus PGC-k arányának meghatározása ..	- 35 -
4.4.9. Fluoreszcensen jelölt PG sejtek mikroinjektálása recipiens embrióba	- 36 -
4.5. Ivarszervi vizsgálatok	- 37 -
4.5.1. Ivarszervekbe integrálódott PGC-k detektálása, ivarszerv fixálása	- 37 -
4.5.2. Ivarszervek beágyazása	- 37 -
4.5.3. Ivarszervek metszése	- 38 -
4.5.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok kiméra ivarszervben	- 38 -

4.5.5.	Statisztikai módszerek	39 -
5.	EREDMÉNYEK	41 -
5.1.	Szaporodásbiológiai vizsgálatok eredményei (előzetes kísérletek).....	41 -
5.1.1.	Tojástermelés és termékenység vizsgálata	41 -
5.1.2.	Spermatológiai vizsgálat	41 -
5.2.	A hőkezelés molekuláris biológiai hatásának vizsgálata.....	42 -
5.2.1.	HSP és HSF Delta Ct értékeinek összehasonlítása.....	42 -
5.2.2.	HSP és HSF relatív expressziós értékek összehasonlítása	44 -
5.3.	Fluoreszcensen jelölt házityúk ősvarsejtek alapítása	46 -
5.4.	Fluoreszcensen jelölt ősvarsejt tenyészetek <i>in vitro</i> jellemzése.....	46 -
5.4.1.	A tenyészetek ivarmeghatározása.....	46 -
5.4.2.	Génexpressziós vizsgálatok eredményei	46 -
5.4.3.	Immunhisztokémiai vizsgálatok	47 -
5.4.4.	Proilferációs vizsgálatok	49 -
5.5.	Fluoreszcensen jelölt ősvarsejt tenyészetek <i>in vivo</i> jellemzése.....	49 -
5.5.1.	Visszainjektált ősvarsejtek integrációs hatékonysága embrióban	49 -
5.5.2.	Visszainjektált ősvarsejtek integrációs hatékonysága kikelt csibében	51 -
5.6	Új tudományos eredmények	54 -
6.	KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	55 -
6.1	Javaslatok	59 -
7.	ÖSSZEFOGLALÁS	61 -
8.	SUMMARY	62 -
9.	MELLÉKLETEK	63 -
9.1	1.számú melléklet (M1).....	63 -
9.2	2.számú melléklet (M2).....	74 -
9.3	3.számú melléklet (M3).....	75 -
10.	FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK	77 -
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	79 -

1. JELÖLÉSEK ÉS RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

BAG3	BAG family chaperon regulator 3 fehérje génje
CEF	Házityúk embrionális fibroblaszt (chicken embryo fibroblast)
CVH	Házityúk <i>Vasa</i> homológ (Chicken <i>Vasa</i> homologue)
CRISPR	Nagy számban előforduló, szabályos közökkel elválasztott palindromikus ismétlődések (clustered regularly interspaced short palindromic repeats)
DAZL	Deleted in azoospermia-like
DMEM	Dulbecco által módosított Eagle tápoldat (Dulbecco's modified Eagles's medium)
DMRT1	Doublesex and mab-3 related transcription factor 1
DMSO	Dimetil szulfoxid
DT	duplikációs idő (doubling time)
EMA1	Anti-embryonic mouse antigen 1
FGF2	Fibroblaszt növekedési faktor 2 (Fibroblast growth factor 2)
FOXL2	Forkhead box protein L2
GFP	Zöld fluoreszcens fehérje (Green Fluorescent Protein)
gPGC/GGC	Ivarszervi PGC vagy gonadális ősvarsejt (gonadal germ cells)
HH	Hamburger és Hamilton által készített embrionális fejlődési sor
HT	Hőkezelt (heat-treatment)
HS	Hőstresszelt (heat-stress)
HSF	Hősokk faktor (Heat shock factor)
HSP	Hősokk fehérje (Heat shock protein)
LIF	Leukémia inhibitor faktor (Leukemia inhibitory factor)
MATE GBI	Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem – Genetika és Biotechnológiai Intézet
MYOC	Miocilin (myocilin)
NBGK HGI	Nemzeti Biodiverzitási és Génmegőrzési Központ – Haszonállat Génmegőrzési Intézet
NS	Sejtmagfestés (Nuclear staining)
NANOG	Homeobox protein NANOG
PBS	Foszfáttal pufferolt sóoldat (Phosphate-buffered saline)
PFA	Paraformaldehid (Paraformaldehyde)
PGC	Ősvarsejtek vagy Őscsírarsejtek (Primordial germ cells)

PAS	Perjódsav-Schiff reakció (PAS-festés)
PTRF	Polimeráz I és transzkripció faktor (Polimerase I. and transcript release factor, Cavin1)
RALDH	Retinaldehid dehidrogenáz (Retinaldehyde dehydrogenase)
SOGA3	Supported of glucose, autophagy associated 3
STAGE	Spermium transzekció által asszisztált génszerkesztés (sperm transfection assisted gene editing)
SSEA1	Stádium-specifikus embrionális antigén-1 (stage-specific embryonic antigen-1)
SST	Spermium tároló tubulusok (sperm-storage tubules)
TALEN	Transzkripció aktivátorszerű effektor nukleázok (transcriptional activator-like effector nuclease)
TAGLN	Transgelin
ZFN	Cink ujj nukleázok (Zink-finger nuclease)

2. BEVEZETÉS, CÉLKITŰZÉSEK

2.1. Bevezetés

A XXI. század derekán már jól érezhető az emberi tevékenység hatása a Földön. Klímánk állapota jelentősen romlott, az átlagos évi középhőmérséklet már lassan 1,5 °C-al meghaladja az XX. század elején mért átlagos középhőmérsékletet és várhatóan, ha nem szorítjuk vissza a fosszilis energiahordozók használatát ez tovább fog emelkedni (“The Intergovernmental Panel on Climate Change: 30 Years Informing Global Climate Action,” 2018). A hőmérséklet emelkedésével gazdasági növényeinknek és haszonállatainknak is meg kell küzdeniük. Mivel kedvezőtlen számukra a környezeti hőmérséklet, így produktivitásuk csökken (Babinszky et al., 2011; Zaboli et al., 2019). Dolgozatomban az előzetes hőkezelés hatására a házityúk ivarszervében végbemenő változásokat elemeztem, így az irodalmi áttekintés részben is a házityúk ivarszervében végbemenő változásokra fókuszáltam. Átlagosan 40-41 °C a madarak belső testhőmérséklete (Murugesan, 2018), melyet magasabb környezeti hőmérséklet esetén izzadással nem, főképp csak hiperventillálással tudnak hűteni. Több kutatás is foglalkozott már hőkezelési eljárások kidolgozásával, melynek segítségével magasabb hőmérsékleten is megőrizhető a házityúkok termelékenységére (Al-zhghoul et al., 2013; Sun et al., 2015; Xie et al., 2015; Al-Rubika et al., 2017; Al-Zghoul and El-Bahr, 2019). Legnagyobb áttörést az jelentené, hogyha az előzetes hőkezelési eljárással az ősvarsejtekben olyan módosulást lehetne elérni, amely átörökíthető az utódokra is.

A teljes genetikai anyag megőrzésére az ivarsejtek prekursor sejtjei az ősvarsejtek (PGC) képesek, így ezen sejtek szerepe meghatározó. Már az 1990-es évek derekán felismerték az ősvarsejtek fontosságát a transzgerenációs epigenetikus öröklődésben. Azóta is intenzíven kutatott terület az ősvarsejtekben zajló epigenetikai szabályozás folyamata (Tajima et al., 1993; Naito et al., 1994). 2006-ig kellett várni, amíg egy kutatócsoport ki tudta dolgozni ezen sejtek speciális médiumban történő fenntartását (van de Lavoie et al., 2006). Kezdetben csak a hím ivarú tenyészeteket tudták hosszabb távon fenntartani, a nőstény ivarnak nem volt megfelelő a médium összetétele. Később ez alapján a médium alapján tökéletesítették az összetevőket (Macdonald et al., 2010; van de Lavoie et al., 2012; Whyte et al., 2015), így mára már egy komplexebb, mindkét ivarnál jól használható tápoldatot sikerült előállítani.

Az ősvarsejtek az embrionális fejlődés 6. napján lépnek ki a vérkeringésből és kezdik el kolonizálni a fejlődő ivarszerveket. A hím és a női ivarszervek kezdetben egymással párhuzamosan fejlődnek, majd a tojó állatok esetében a jobb oldali ivarszerv regressziója

látható. A madarak többségében ivarszervi aszimmetria figyelhető meg a tojóknál, miszerint a jobb oldali ivarszerv visszafejlődik (Romanoff, 1960; Smith and Sinclair, 2001, 2004). Néhány ragadozómadárnál (sas, keselyű) és a kivinél viszont, mind a két funkcionáló petefészek megtalálható (Péczely, 2013). Az aszimmetriát felfedezhetjük a hím ivarszervekben is, ahol az ősvarsejtek száma alacsonyabb a jobboldali ivarszervben (Levin, 1998; Guioli et al., 2014). Az ősvarsejtek visszajuttatva egy megfelelő fejlődési állapotban lévő és megfelelő fajtájú recipiens embrióba, képesek integrálódni annak ivarszervébe, így ivarszervi kiméra jön létre. Egy ideális recipiens fajta megtalálása fontos feladat, mert ezt az ideális recipiens fajtát lehetne alkalmazni több baromfi fajta ősvarsejtjei esetében is recipiensként.

Dolgozatomban azt a kutatási munkát foglaltam össze, amelynek keretében házityúkok ivarszervében vizsgáltam a hőkezelés hatására a hősokk faktorok és hősokk fehérjék expressziójában létrejött változásokat, illetve az ősvarsejtek integrációs képességét hasonlítottam össze három régi magyar házityúk fajta ivarszervének esetében.

2.2.Célkitűzés

A doktori munka során kitűzött célok a következők voltak:

- ❖ Hőkezelés hatásának molekuláris biológiai vizsgálata házityúk ivarszervekben
 - Hősokk fehérjék és hősokk faktorok expressziójának vizsgálata a kontroll és hőkezelt hím, valamint tojó csibékben
 - Hősokk fehérjék és hősokk faktorok expressziójának vizsgálata a kontroll és hőkezelt ivarérett hím, valamint tojó házityúkokban
- ❖ Ideális recipiens fajta keresése
 - GFP riportergénnel jelölt ősvarsejt tenyészetek alapítása
 - A GFP-t expresszáló PGC tenyészetek *in vitro* jellemzése.
 - Jelölt PGC-k visszainjektálása recipiens házityúk fajtába, valamint az integráció mértékének meghatározása.

3. IRODALMI ÁTTEKINTÉS

3.1. A hó hatása az állatokra

3.1.1. Hőkezelési eljárások

Napjaink egyik legfontosabb témája és megoldandó problémája, a globális klímaváltozás. A magasabb környezeti hőmérséklet olyan folyamatokat indít el növényekben és állatokban egyaránt, melyek kedvezőtlenül hatnak komfortérzetükre, ezáltal a produktivitásukra is (Wolfenson et al., 1997; Magdi et al., 2004; Rath et al., 2015; Araya et al., 2020). A magas hőmérséklet által kiváltott reakciók jobb megértése, részben megoldást jelenthet, a klímaváltozás által okozott termék kiesésre. Különösen nagy problémát jelent ez a trópusi területeken (Gregory, 2010). Dolgozatomban erdélyi magyar kopasznyakú házityúk fajtát használtam a hőkezelés hatásainak vizsgálatához. Ennek a fajtának nagyobb a hőtoleranciája, mint fedett nyakú társainak. Magas hőmérsékleten előnyt jelent a kopasznyakúságot jelentő gén jelenléte, mivel így könnyebben tudja elviselni a magasabb környezeti hőmérsékletet (Bordas et al., 1978). A madarak képesek szabályozni a testhőmérsékletüket egy szűk hőmérsékleti tartományon belül (Arjona et al., 1988). A házityúk húsa és tojása az emberiség egyik legfontosabb fehérjeforrása, ráadásul kevésbé megterhelő a környezet számára az előállítás, mint a vöröshúsoké. Korábban több hőkezelési eljárást is kidolgoztak már, mellyel elősegíthetik az állatok tűrőképességének növekedését. A házityúk homeotermikus élőlény, belső testhőmérséklete 40-41 °C (Murugesan, 2018). A magas hőmérsékletet főként evaporációs hűtéssel (lihegés, zihálás) tudja elviselni, ugyanis nem rendelkezik izzadság mirigyekkel, amivel tudná hűteni a testét (Donald D. Bell; William, 2002). A hőmérsékleti komfort tartományon kívüli állapotot a fent említett zihálással, illetve a szárnyak lógatásával és bágyadtsággal jelzik. Több publikációban is bizonyították, hogy a házityúk tojástermelése csökken magas környezeti hőmérséklet esetén, így jelentős gazdasági kár is keletkezhet (Donald D. Bell; William, 2002; Nawab et al., 2018; Gitau Gicheha, 2021). Az előzetes hőkezelés (más néven hőkondicionálás, vagy akut hőstressz) egy rövid ideig tartó extrém magas hőmérsékleti érték, melynek az állatok ki vannak téve. Krónikus hőstressz esetén hosszú időn keresztül a környezeti hőmérséklet a komforttartományon kívül esik.

Két hőkezelési eljárást különböztethető meg a madár embrionális fejlődési idejét tekintve. Az egyik a tojásban fejlődő embrió magasabb hőmérsékleti viszonyok közötti keltetése, a másik a csibe kibújását követő időszakban van kitéve magasabb hőmérsékletnek. Al-Rubika és

munkatársai eredményei szerint a magasabb hőmérsékleten történő keltetés nincs hatással a keltethetőségre, de az előzetesen magasabb (40 °C) hőmérsékleten tartott házityúk csibék nagyobb testtömeggel rendelkeztek, mint kontroll társaik, kikelés utáni 42. napon (Al-Rubika et al., 2017). A keltetés 14 és 18. napja közötti időszakban naponta négy órára 40 °C-os hőterhelésnek tették ki a tojásban fejlődő embriókat Walstra és munkatársai, majd mérték a viselkedésbeli különbséget és a belső testhőmérsékletet. Viselkedésben nem találtak különbséget a kontroll és kezelt csoport között, de a belső testhőmérséklete a hőkezelt embrióknak magasabb volt, valamint a keltetési idő a hőkezelt embriók csoportjában lerövidült, átlagosan 7 órával (Walstra et al., 2010). A házityúk csibék termoregulációs rendszere a kikelést követő 3. és 10. nap között fejlődik ki teljesen, így addig manipulálható (Yahav et al., 2004; Collin et al., 2005). Az előzetes hőkezeléssel sikeresen adaptálódhatnak a kibújt csibék a magasabb vagy alacsonyabb hőmérsékletű környezethez (Decuypere, 1984).

3.1.2. Hősokk fehérjék és hősokk faktorok

A hősokk faktorok (*HSF*) elengedhetetlenek az akut hőhatás túlélésében (Åkerfelt et al., 2010). Ezek transzkripciós faktorok, melyek hősokk, vagy más környezeti sokk következményeként aktiválódnak a szervezetben (Saju et al., 2018). Hatásuk érzékelhető ezen felül a sejtek differenciálódásában, az embrionális fejlődésben, a szaporodásban, valamint a stresszválaszban (Åkerfelt et al., 2010). Négy fő hősokk faktort ismerünk (*HSF1*, *HSF2*, *HSF3*, *HSF4*), melyekből több is szerepet játszik az ivarszerv fejlődésében, valamint a spermatogenezisben (Saju et al., 2018). Házityúknál a *HSF1* a második kromoszómán, a *HSF2* a harmadik, a *HSF3* a negyedik, míg a *HSF4* gén a tizenegyedik kromoszómán lokalizálódik (Fujimoto and Nakai, 2010). A *HSF1* és *HSF2* hőstressz nélküli időszakban is működik, a gametogenezis folyamatában kulcsfontosságú szerepet tölt be (Abane and Mezger, 2010).

A *HSF1*, *HSF2* és *HSF4* faktorokat elsőként zebradánióban karakterizálták és izolálták (Yeh et al., 2006; Swan et al., 2012). A *HSF1* túltermeltetése egerek esetében a spermium termelés szignifikáns csökkenését eredményezte (Nakai et al., 2000), a *HSF2* expressziójának zavara pedig csökkent méretű herét és kevesebb spermiumszámot eredményezett (Kallio et al., 2002). A két faktor együttes defektusa sterilitást eredményezett egerek esetében (Wang et al., 2004). A *HSF1-t*, *HSF2-t* és *HSF3-at* egér HSF1-el történő kereszthibridizálással izolálták házityúkból (Nakai and Morimoto, 1993). Saju és munkatársai 2018-ban találtak egy 5. *HSF*-et zebradánióban, mely az ötödik kromoszómán helyezkedik el. A *HSF5* szerepét CRISPR technikával vizsgálták. A *HSF5* génkiütött egerek terméketlennek bizonyultak, drasztikus

spermiumszám csökkenés volt megfigyelhető, valamint az, hogy ezeknek a spermiumoknak megnövekedett a feji része és abnormális fark struktúrája volt (Saju et al., 2018).

Molekulatömeg alapján 6 nagy családra osztható a hőszokkfehérjék csoportja (kis *HSP*, *HSP40*, *HSP60*, *HSP70*, *HSP90* és *HSP100*) (Feder and Hofmann, 1999). A *HSP70* és *HSP90* egy erősen ATP-függő molekula chaperon, ami nélkülözhetetlen az eukarióta rendszerek stresszválaszában (Genest et al., 2019). A hőtüréssel legjobban a *HSP70* korrelál az összes hőszokk fehérje közül (Li and Mak, 2009). A *HSP90* baktériumokban és az összes eukarióta szervezetben megtalálható. Megfigyelték a *HSP90* és a *HSP70* chaperon rendszer együttműködését fehérjék előállítására és aktivációjára során (Taipale et al., 2010; Johnson, 2012; Stankiewicz and Mayer, 2012).

3.1.3. Hőkezelés és hőstressz hatásának kimutatása *HSF* és *HSP* expressziók mérésével

Cedraz és munkatársai a *HSP70*, *HSP90* és *HSF1*, *HSF3* expressziót vizsgálták hőkezelést követően három különböző fajtában (Paleco és Caneluda, melyek helyi őshonos fajták, valamint Cobb 500-as broiler fajtában). Vizsgálataikban a nagy mellizomban történő molekuláris változásokat mutatták ki. A 39 °C-os környezeti hőstressz alatt az őshonos fajták és a broiler fajta között szignifikáns különbséget tudtak kimutatni (Cedraz et al., 2017). Japán fürj myocardialis szöveteiben megemelkedett *HSP70* szintet figyeltek meg sötétben, erős hanghatás után, valamint hűvös körülmények között (Hoekstra et al., 1998). Zhang és munkatársai két kínai házityúk fajtát (Lingshan és White Recessive Rock) hőkezelték és a *HSF3*, valamint *HSP70* expressziót vizsgálták különböző szövetekben. Két órával a hőkezelés után a *HSF3* expressziója szignifikánsan magasabb volt a Lingshan fajta agy és lábizom szövetében, mint a White Recessive Rock fajtánál. A *HSP70* esetében ugyancsak szignifikánsan magasabb expressziót mértek az első fajtánál a szív és a máj szövetében (Zhang et al., 2014). Egérnél a *HSF1* expressziója magas volt májban a hőkezelés után, míg a szívben nem lehetett expressziót kimutatni (Islam et al., 2013). A *HSP70* és *HSF1* expressziós szintje a hőkezelés első napján volt a legmagasabb majd folyamatosan csökkent tengeri koralloknál (Nakamura et al., 2012). Brojler csirke májában a *HSP90α*, *HSP90β*, *HSP70* és *HSP60* expressziója drasztikus mértékben megemelkedett közvetlen hőkezelés után, majd 3 óra után a *HSP60* expressziós szintje fokozatosan csökkenni kezdett (Gabriel et al., 1996; Mahmoud et al., 2004; Zhang et al., 2014). RNS profil (transzkriptom) technológiát alkalmazva megvizsgálták a brojler csirkének a máját, hogy akut és krónikus hőstresszre hogyan reagál és

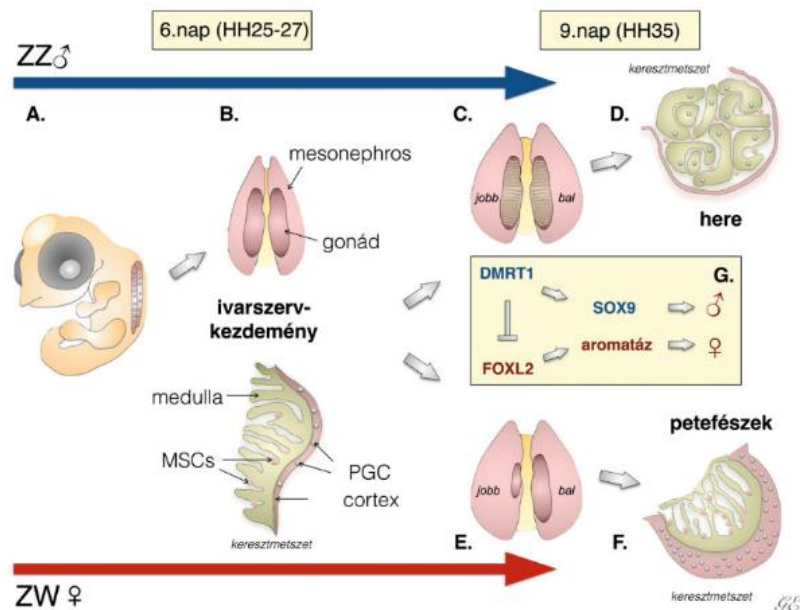
sok különbséget találtak az alapvetően igen nagy hőtoleranciával rendelkező egyiptomi Fayoumi fajtánál (Lan et al., 2016)

3.1.4. Házityúk ivarszervekben végbemenő *HSP* és *HSP* változások hőkezelés hatására

Az állandó magas hőmérséklet a madarak reprodukciós tulajdonságaira is negatív hatást gyakorol (Cheng et al., 2015). Wang és munkatársai egy tajvani házityúk fajtán vizsgálták a magasabb környezeti hőmérséklet hatását hím ivarszervben. A kakasokat 38 °C-os hőmérsékletnek tették ki 4 órán keresztül, majd vizsgálták a herében a *HSP25*, *HSP90AA1*, *HSPA2* (*HSP70*) mRNS expressziókat. Minden vizsgált gén esetében emelkedett szintet mértek real-time qPCR segítségével. Az akut hőhatás után 2 órával az apoptotikus sejtek száma szignifikánsan megemelkedett a kezelt csoportban a kontrollhoz képest (Wang et al., 2015). *HSP70* emelkedett expressziós szintjét mutatták ki házityúk kakasok ivarszerveiből izolált spermiumokban, hőstressz ideje alatt. A spermiumokat extrém magas 44-46 °C közötti hőmérsékleten tartva két órán keresztül magasabb *HSP70* expressziót mértek (Mezquita et al., 2001). Cheng és munkatársai a tojó állatok ivarszervében a kis sárga tüszőkben bekövetkező molekuláris biológiai változásokat vizsgálták akut hőstressz hatására. A *HSP25*, ami egy kis molekulatömegű hőszokkfehérje magas expressziós értéket mutatott a *PTRF*, *SOGA3* és *MYOC* génekkel együtt (Cheng et al., 2015). Házityúk ivarszervben bebizonyították real-time qPCR segítségével, hogy fontos szerepet játszanak akut hőstressz esetén a *HSP70*, *HSP90AA1*, *BAG3*, *TAGLN* markerek, majd ezt microarray módszerrel is megerősítették. Azt találták, hogy a *BAG3* expressziója drámaian megemelkedik az antiapoptotikus hatása mellett hőstressz esetén (Wang et al., 2013). A *HSP25* együttműködését mutatták ki más chaperonokkal, normál környezeti hőmérséklet mellett (Ehrnsperger et al., 1997).

3.2. Ivarszervek morfológiai jellemzése

A madarak ivarkészülékei aszimmetrikus fejlődést mutatnak, mind méretben, mind a benne elhelyezkedő ősvarsejtek mennyiségében. A hím madarak esetében két herét találunk, melyek méretben nagyon hasonlóak, míg a tojó madarak ivarszerveinek fejlődése aszimmetrikus (**1. ábra**). A jobb oldali petefészkek a legtöbb madárfaj esetében regresszál, nem funkcionál ivarérett korban (Guioli et al., 2014; Intarapat and Stern, 2014).



1. ábra: A házityúk embrionális ivarszerv fejlődése (MSCs: Mezenchimális őssejtek), ősvarsejtek (PGC) differenciálódására ható faktorok és ivarszervben történő integrációjának pozícionálása (Gócza E. nyomán) (Toth et al., 2018).

3.2.1. Hímivar

A madaraknál a herék az emlősökétől eltérően a testüregben a vesék felett az *abdominalis* légzsákokban helyezkednek el. Viszonylag kis méretű mellékheréjük a here háti oldalához közepén csatlakozik. Az ondóvezető a mellékhere hátsó végéből ered, majd a kloákába torkollik (Péczely, 2013). Az embrionális fejlődés 7-14. napja között fejlődik ki a here strukturális szerkezete. A here állománya két fő részre különíthető el, a kanyarulatos csatornácskákra, valamint az *interstitialis* térre. A herék *corticalis* része elvékonyodik, szemben a jól fejlett *medullaris* régióval, mely tartalmazza a kanyarulatos csatornácskákat. Az ivarszerv fejlődésében androgén hormonok, valamint a *DMRT1* gén magas expressziója játszik szerepet, mely direkt vagy indirekt módon aktivál hím ivarra jellemző faktorokat, pl. *HEMGN*, *SOX9* és *AMH* (Estermann et al., 2021).

Az ivarszervbe az embrionális fejlődés 10. és 13. napja között vándorolnak be az ősvarsejtek az embrionális vérkeringésből. Az ősvarsejtek nagyobb arányban a bal oldali herébe integrálódnak (Péczely, 2013). A spermátogén sejtek a kanyarulatos here csatornácskákbán, a Sertoli sejtek köré rendeződve helyezkednek el (Péczely, 2013).

A páرزószerv egyedisége, hogy a kloáka egyes részei látják el a feladatokat. Víziszárnyasok esetében a hím páرزószerv (*phallus*) hosszan kiölthető (*protrudens*), míg más madarakat a nem kiölthető (*non-protrudens*) *phallus* jellemez (Péczely, 2013).

3.2.2. Nőivar

A női ivarban kezdetben két egyenlő mértékben fejlődő ivarszerv található. A petefészek differenciálódása az embrionális fejlődés 6. napján kezdődik. Az embrionális fejlődés 12. napján a petefészek kilencszer több FSH receptort és 6x több LH receptort tartalmaz, mint a here (Akazome et al., 2002). Egyes madárfajok kivételével (pl.: sólyomalkatúak, kivi, sasok, keselyűk) csak a bal oldali petefészek fejlődik funkcionálisan aktív ivarszervvé. Esetenként megfigyelték pl. sirályoknál és galamboknál, valamint verébféléknél is a megjelenő jobb oldali ivarszervet (Péczely, 1987). A petefészek kialakulása során a *corticalis* rész fejlődik ki, míg a *medullaris* szerkezet jelentősen elcsökevényesedik. Az ivarérett madarak petefészkének kéregállománya erősen lebonyozott, benne különböző fejlődési fázisban lévő fehér és sárga tüszők találhatók (Péczely, 2013).

A jobb oldali petefészekben hasonló folyamatok zajlanak le, mint a herékben, aminek következményeképp *meiotikusan* fejlődő oociták nem, vagy csak nagyon kis számban alakulnak ki (Péczely, 2013).

A madarak ivarszervének másik érdekessége a spermiumtároló képesség. Ezt a jelenséget a petevezető és az *infundibulum* határán elhelyezkedő spermium tároló tubulusok (SST) teszik lehetővé (Péczely, 2013). Ezt más taxonokban is megfigyelhetjük, mint pl. elevenlélő halakban, gyíkokban, kígyókban, de emlősöknél is előfordul denevéreknél. A spermium tároló tubulusokban a spermiumok akár 15 hét után is megőrzik termékenyítőképességüket a madár belső testhőmérsékletén (Matsuzaki and Sasanami, 2017). Az SST-k száma 500 és 20000 db között változik madárfajtól függően (Birkhead and Moller, 1992). Házityúk esetében 2-3000 db található (Matsuzaki and Sasanami, 2017). A kopuláció során összesen a spermiumok 1-2 %-a jut be tojó állatok tubulusaiba, innen is látszik a nagyfokú szelekciós hatás (Bakst et al., 1994).

3.3. Kísérletekben használt őshonos magyar házityúk fajták bemutatása

3.3.1. Kendermagos erdélyi kopasznyakú fajta

A hőkezelési kísérletben részt vett házityúk fajta a kendermagos erdélyi kopasznyakú volt (**2. ábra**). Ennek az Erdélyből származó fajtának jellemzője a csontfehér csőr, narancsvörös szemek és hússzínű láb. Tollazatának alapszíne kékesszürke, sötét fekete tónusú keskeny keresztávokkal. Tollatlan, hosszú és izmos nyak jellemzi. A tollatlan nyakért egyetlen *autosomalis* gén felelős, mely a tollazott nyakkal szemben részlegesen domináns. A XX. század első felében az erdélyi kopasznyakú tyúkokat még elsődleges tyúkfajtaként tartották számon. Gyors fejlődésük és tollasodásuk előnyös tulajdonság volt a kimondottan erős és ellenálló testük mellett. Tojástermelésük a számukra kedvező környezeti feltételek mellett igen jónak minősül, nem ritkán tojásaik tömege meghaladhatja a 70 grammot is. Kotlási hajlama viszont nem túl jó (Szalay, 2015).



2. ábra: Erdélyi kendermagos kopasznyakú magyar tyúk (www.genmegorzes.hu)

3.3.2. Fogolyszínű magyar fajta

Tollazata igen színes. A kakas esetében a nyak és nyeregtollak aranysárgás színűek a fej narancsvörös, míg a mell, has és combok tollai feketék (**3. ábra**). Ezzel párhuzamosan a kifejlett tojó tollazata jóval egyszerűbb. Alapszíne barna, evező és faroktollai fekete színűek. Szeme általában narancsvörös, csőre fehér, de lehet sárga, vagy akár hússzínű is. Hússzínű lába van. A kakasok 2,5 – 3,0 kg, míg a tojók 2,0 – 2,3 kg közötti tömegűek. Egyik legjobb növekedési potenciállal rendelkező őshonos házityúk fajtánk. Ezt a fajtát főként a Dunántúli tájegységen, valamint erdősebb területe részekén tartották. Tojásainak színe a legtöbb magyar

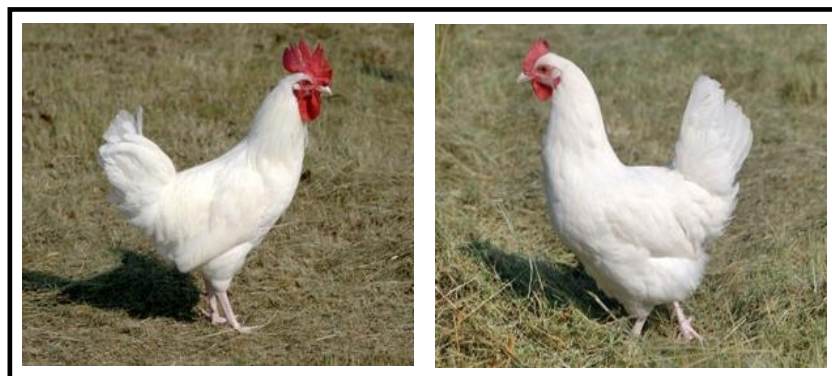
házi tyúk fajtaival egyetemesen barna vagy világosbarna. A csibék pehelytollazata közép barna, a háti részen hosszanti sötétebb és világosabb sávokkal tarkított (Szalay, 2015).



3. ábra: Fogolyszínű magyar tyúk (www.genmegorzes.hu)

3.3.3. Fehér magyar fajta

Tollazata mindkét ivar esetében teljesen egyöntetű fehér, ezüstös zománcú (**4. ábra**). Szeme narancsvörös, míg csőre csontfehér színű. Tojásaik általában világosbarnák, de krémszínűek is lehetnek. Naposcsibe korban sárgásfehér pehelytollazatúak. Lába és lábujjai fiatal korban hússzínűek, míg ez idősebb korokra csontfehérré módosul. Ez a fajta főképp az Alföld és a Duna-Tisza közti régió leggyakrabban tartott fajtája volt, mivel fehér színével a legjobban tűrte az árnyék nélküli tartást (Szalay, 2015).



4. ábra: Fehér magyar tyúk (www.genmegorzes.hu)

3.3.4. Sárga magyar fajta

Tollazata egyöntetű sárga, fiatalok esetében élénksárga, idősebb korokra kicsit veszíthet színéből (**5. ábra**). Az elsődleges evezőtollak sötétebbek, míg faroktollai barnásfekete színezetűek. Csőre sárga, szeme narancsvöröses színű. A kakas tollazatának alapszíne valamivel markánsabb. A naposcsibék egyszínű világosbarnák. Főként az Alföldön, a Duna-Tisza közti területen és a Dunántúlon tartották. Egyik legjobb tojástermelési potenciállal rendelkező magyar fajtánk (Szalay, 2015).



5. ábra: Sárga magyar tyúk (www.genmegorzes.hu)

3.4. Házityúk embriófejlődés

A házityúk embriófejlődésére mind exogén, mind endogén faktorok hatással vannak (Tong et al., 2013). Kelési ideje 21 napra tehető, mely időszak alatt az embrionális fejlődés befejeződik. A madarak embrionális fejlődését két nevezéktan segítségével írhatjuk le. Eyal-Giladi és Kochav által (Eyal-Giladi and Kochav, 1976) rendszerezett embrionális fejlődés a tojó állat testén belül fejlődésnek indult embrió stádiumait mutatja be a megtermékenyítéstől a primitív csík megjelenéséig. A stádiumokat római számokkal jelölték I-XIV-ig. A másik nevezéktan az embriófejlődést a primitív csík megjelenésének pillanatától számolja. Ezt Viktor Hamburger és Howard Hamilton (HH stádiumok) 1951-ben (Hamburger and Hamilton, 1992) közölte elsőként. Munkájuk a mai napig legjobban rendszerezett embriófejlődési táblázatnak tekinthető. A stádiumokat 2 és 46 közötti számokkal jelölték az embrió morfológiája alapján. A tojásrakás pillanatában az embrió az Eyal-Giladi és Kochav-féle nevezéktan X. stádiumában található.

Az embriófejlődés a megtermékenyítés pillanatától kezdődik. Az érett petesejt 15 percet tölt a petevezető tölcser részében (*infundibulum*). A petevezető fehérjetermelő szakaszában (*magnum*) a fehérjeszokrécio megtörténik, mely 3 órán keresztül tart. A szorosnak nevezett (*isthmus*) részen a héjhártyák és a jégzsinór alakul ki 1,5 óra alatt. A méhben (*uterus*) 19-20 órát tölt a tojás, ebben az időszakban szintetizálódik a meszes héj a tojás köré. Hozzávetőlegesen az egész folyamat 24 órát vesz igénybe (Péczely et al., 2007).

Madarak esetében a párosodástól számítva eltelhet 10 nap, míg a megtermékenyülés megtörténik. Extrém esetekben (pulykáknál) akár 40 nap is lehet ez az időszak. Az emlősöktől eltérően, ahol a párzást követő 24-72 órában megtörténik a termékenyülés (Péczely, 2013). Emlősöknél funkcionális monospermia alakult ki, míg madaraknál minden esetben polispermias megtermékenyítést láthatunk (Olszanska and Stepinska, 2008; Mizushima, 2012; Iwao, 2014). Ennek pontos mechanizmusa még nem ismert, viszont azt tudjuk, hogy a *zona pellucida* fehérjék és a perivitellinális membrán fontos szerepet játszanak a spermium-petesejt interakcióban, melynek következtében aktiválják a spermiumok akroszóma reakcióját (Ichikawa et al., 2016).

3.5. Ősivarsejtek (PGC) szerepe az ivarszervben

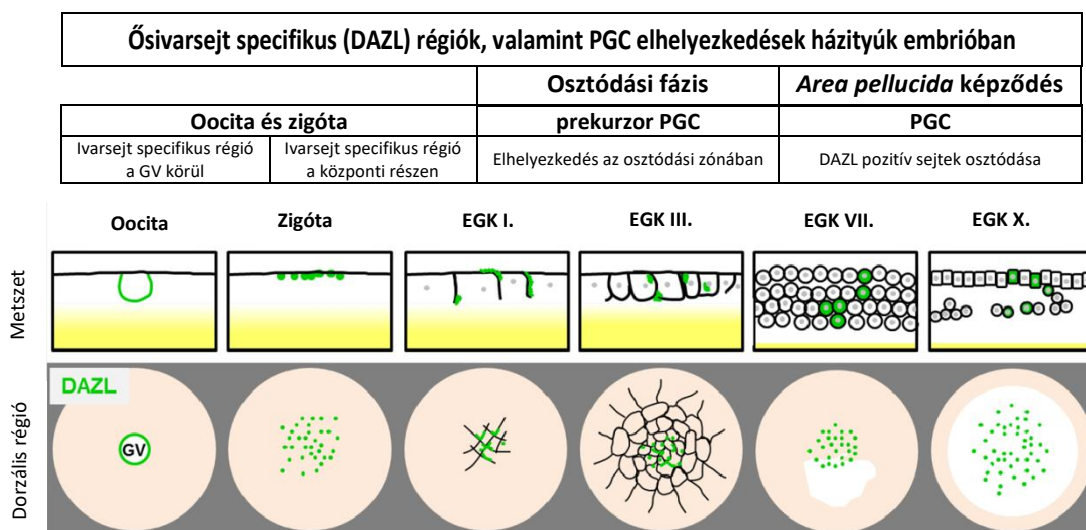
3.5.1. PGC eredet és vándorlás

Az ivarsejt az egyetlen olyan sejtípus, mely az egész örökítőanyagot képes átadni a következő generációnak. Az ivarsejtek progenitor sejtjei az ősivarsejtek (PGC), melyeket elsőként 1870-ben azonosítottak (Wilhelm, 1870). Már egy korai stádiumban (HH3), még a primitív csík megjelenése előtt megtalálhatók az ősivarsejtek (Clawson and Domm, 1969). Meyer egy hisztokémiai festést követően bebizonyította, hogy az ősivarsejtek a kezdeti embrionális fejlődés során festődnek perjódsav-Schiff (PAS) reakcióban (Meyer, 1960). Clawson és Domm a HH4-5 stádiumban már 100-250 PGC-t azonosított PAS festés segítségével (Clawson and Domm, 1969; Fujimoto et al., 1976). A PGC-k nagy méretű (10-20 μm), nagy, kerek sejtmaggal rendelkező sejtek. Swift leírása szerint a szomszédos sejtektől könnyedén megkülönböztethetők méretük alapján, valamint a citoplazmában felhalmozódott nagy mennyiségű glikogén *granulumok* alapján (Swift, 1914). Egy másik hisztokémiai festési eljárást is kidolgoztak, mely az SSEA1 (Stage-specific embryonic antigen 1 és EMA 1 (embryonic mouse antigen 1) jelölésen alapul (Karagenç et al., 1996). Ezek a jelölési módszerek nagyon hatékonyak, viszont

az embrionális fejlődés korai szakaszában adhatnak fals eredményt a PGC-k számát illetően, mivel néhány pluripotens őssejt is képes expresszálni az SSEA1 markert (Pain et al., 1996).

A jelenleg ismert, legjobban működő PGC detektálási módszer a CVH-val (Chicken Vasa Homologue) történő jelölés. Ezt a módszert elsőként Lasko és Ashburner fedezte fel *Drosophila melanogaster* fajban (Lasko and Ashburner, 1988). A gén homológját viszont házityúkban is felfedezték 2000-ben (Tsunekawa et al., 2000). A CVH expresszió a PGC-k életében végig fennmarad, fehérjéje mindkét ivar esetében a citoplazmában megtalálható. Később Lee és munkatársai azonosítottak *deleted in azoospermia-like* (DAZL) expresszióját PGC-kben (Lee et al., 2016). Ezzel már két ősvarsejt specifikus marker képes biztosan azonosítani az ősvarsejteket (**6. ábra**).

Az ősvarsejtek sikeres azonosítását követően lehetőség nyílt a PGC-k nyomon követésére maturációjuk során. A frissen lerakott tojásban (EG stage X) ezek a sejtek az *area pellucida* centrális régiójában az epiblaszt ventrális részén találhatók, számuk 30-130 közöttire tehető. Első vándorlási periódusuk erről a területről (epiblaszt) az embrió *anterior* végén elhelyezkedő úgynevezett germinális félhold területére (hypoblaszt) központosul, mely egy extraembrionális régió (Karagenç et al., 1996). A második nap elején (HH10, ami a keltetést követő 33-38. órában aktuális) a PGC-k elkezdik vándorlásukat az extraembrionális vérkeringésbe (Kuwana and Fujimoto, 1984). A vérben keringő ősvarsejtek speciálisan a madarakra, valamint néhány hüllőre jellemzőek. Ezeket a sejteket gyakran a nemzetközi irodalom cPGC-ként jelöli, mellyel a cirkuláló PGC-kre utalnak. Legnagyobb sikerrel az embrionális fejlődés 2. napján (inkubáció utáni 50-53 óra) a HH14-es stádiumban lévő embrió véreből lehet őket izolálni, mivel ebben az időszakban érik el maximális koncentrációjukat a vérben (Tajima et al., 1999). A keringésből kilépő PGC-k a *dorsalis mesenterium* mentén folytatják vándorlásukat, majd belépnek a fejlődő ivarszervtelepekbe és kolonizálják azokat (Fujimoto et al., 1976). A PGC-k helyváltoztató mozgásával kapcsolatos ismereteink még hiányosak, ami viszont tisztázott, hogy több extracelluláris molekula jelen van térben és időben a PGC-k vándorlása során (Urven et al., 1989).



6. ábra: Ősivarsejt specifikus régiók, valamint ősivarsejtek fejlődése háziyúk embrióban. Zöld színnel jelölve a DAZL pozitív részeket. **GV:** germinális vezikulum; **EGK:** Eyal-Gilaldi és Kochav nevezéktan szerinti stádium. (Lee és munkatársai 2016-os cikke alapján módosítva (Lee et al., 2016)).

3.5.2. Ivasejtek érése

Az ősivarsejteket az ivarszerekbe történő belépésük után már gPGC (gonadal PGC) vagy GGC-ként (gonadal germ cell) is említik. Az ivarszervbe történő integráció után a hím ősivarsejtek osztódása szünetel (Méndez et al., 2005) és csak a nőivarú egyedek bal oldali petefészkében figyelhető meg osztódási aktivitás. A jobb oldali petefészekbe integrálódott PGC-k a kikelés idejéig apoptózissal eliminálódnak az ivarszervből. Az embrionális fejlődés 9. és 17. napja között a bal oldali ivarszerv *corticalis* részében lévő PGC-k huszonötszörös mennyiségre képesek osztódni. Ez hozzávetőlegesen napi 30%-os számbeli növekedést jelent (Hughes, 1963). A PGC osztódásban jelentős szereppel bír a retinaldehid dehidrogenáz enzimes család (RALDH1, RALDH2, RALDH3) (Smith et al., 2008). Háziyúk esetében a RALDH2-nek van a legnagyobb szerepe a retinsav szintézisében (Tagami et al., 2017).

3.5.3. Ősivarsejtek hosszú távú fenntartása

Az ősivarsejtek *in vivo* és *in vitro* körülmények között történő vizsgálatához létfontosságú a hosszú távú fenntartása ezen sejteknek. Ehhez szükséges volt egy megfelelő médium kifejlesztése (Whyte et al., 2015). Az első tápoldat tartalmazott ivarszervekből izolált *stroma* sejteket, melyek egy *feeder* sejtréteggel segítették elő a PGC-k életben maradását (Chang et al.,

1995). A tenyésztőmédiüm tartalmazott különböző növekedést segítő faktorokat (IGF, FGF és LIF), valamint házityúk szérumot. 2006-ban Van de Lavoire és munkatársai (van de Lavoire et al., 2006) állították elő elsőként azt a tápoldatot, melyben hosszú távon megfelelő osztódás mellett fent lehetett tartani a PGC-eket. Ám a nőstény ivarú PG sejttenyészetek nem tudtak 77 nap után ivarsejtet képezni, így ez a médium sem volt teljesen tökéletesnek tekinthető. Ez a médium is tartalmazott tápláló sejteket. Ezek után egyre alaposabban megismerték a különböző molekuláris jelátviteli utakat, melyek segítségével a tápláló sejt nélküli médium kifejlészthetővé vált (Macdonald et al., 2010). 2015-ben a skóciai Roslin Intézetben kidolgozták az eddig legjobban működő táplálósejt mentes tenyésztőmédiümot, mely alkalmas a nőstény ivarú PGC tenyészetek hosszú távú fenntartására (Whyte et al., 2015). Újdonság a tápoldat alacsony ozmolaritása (250 osmol/kg) és alacsony kalcium koncentrációja (0,15 mM) mely elősegítette, hogy az ősvarsejtek biztonságosan fenntarthatók legyenek.

3.5.4. Transzgénikus ősvarsejt vonalak előállítása

Az élő szervezetek genomjának módosítása egy teljesen új szintre emelte a biotechnológiát. Miután a genomban működő gének szabályozási mechanizmusait egyre jobban megismerték, a következő lépés az volt, hogy hogyan lehet ezeket módosítani. Az első kezdeményezések már az ókori időkre visszanyúltak, ahol a jobb termékenységű, vagy magasabb hozamú szervezetekre végeztek szelekciót. Ennek a mesterséges szelekciós módszernek a hátránya, hogy viszonylag hosszú idő alatt lehetett előállítani a kívánt fajtát (Andersson and Georges, 2004). Miután egyre jobban megismertük az élő szervezetek genetikai anyagát ezzel párhuzamosan fejlődött az a képesség is, hogy azt, hogyan lehetne módosítani. Esetlegesen egy gén csendesítés (Hammond et al., 2001), vagy egy túltermeltetése (Hao et al., 2012; Sid and Schusser, 2018), vagy konkrét DNS szakasz beépítése a genomba (McGrew et al., 2004; van de Lavoire et al., 2012; Chojnacka-Puchta et al., 2015). Az első genetikailag módosított, transzgénikus házityúk Salter és kutatócsoportja nevéhez kapcsolható, ahol egy retrovírus alapú mikroinjektálást végeztek EGK X-es stádiumban lévő embriók szubgerminális üregébe. Az ilyen típusú transzgenézisről elmondható, hogy kis hatékonyságú, nem célzott genomszerkesztési eljárás, így a jövőben ennek a technikának kis figyelmet szenteltek. Az ősvarsejtek hosszú távú tenyésztésének köszönhetően lehetőség nyílt madaraknál olyan genomi módosítást létrehozni, mellyel az F2 generációra is átadódott a kívánt módosulás. Első ilyen házityúkban elvégzett kísérletekben PiggyBac, illetve Tol2 transzpozon vektorokat

alkalmazták (Macdonald et al., 2012; Park and Han, 2012). A transzfektálást lipofektaminnal, valamint elektroporálással végezték.

A napjainkban elterjedt precíziós genomszerkesztési eljárások három nagy csoportra bonthatók: A cink ujj nukleázok (ZFN, zink-finger nuclease), a TALEN (transcription activator-like effector nuclease) valamint a legmodernebb a CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats). Madarak esetében a TALEN és CRISPR alkalmazásával számos egyed hoztak már létre. Park és munkatársai 2014-ben írták le először TALEN módszerrel sikeresen megvalósított házityúk eredményeiket (Park et al., 2014). CRISPR genommodosítási eljárással elsőként Oishi és munkatársai közöltek sikeres génszerkesztést, melyben az ovalbumin és ovomucoid gének célzott kiütését publikálták (Oishi et al., 2016).

A genetikai módosításnak jelenleg a leggyorsabb módja a közvetlen spermium transzfektálás (STAGE). Ebben az esetben a madárspermiumban lévő genetikai anyag CRISPR/CAS rendszerrel történő módosításával egy generációnyi időt lehet spórolni, mert már az F1 generációban lehet vizsgálni a transzgén működését heterozigóta formában (Cooper et al., 2017).

3.5.5. Ivarszervi kiméra egyedek előállítása GFP-PGC visszainjektálásával

A jelölt ősvarsejtek visszainjektálása recipiens fajta embriójába jelentősen megkönnyíti később a PGC-k vizsgálatát. Van de Lavoie és munkatársai gyöngytyúk és házityúk keresztezést végeztek, melyben GFP-vel jelölt házityúk ősvarsejteket injektáltak gyöngytyúk embrióba. Összesen 141 gyöngytyúk embrióba injektáltak házityúk GFP-PGC és 12 ivarszervi kimérát (8,51%) kaptak. Ross 308 brojler fajtába injektáltak GFP-t expresszáló PGC-t Chojnacka-Puchta és munkatársai, melyeknél a géntaszferát vizsgálták. Összesen 50 embriót használtak fel és az életben maradási arány 80% feletti volt (Chojnacka-Puchta et al., 2015). Park és munkatársai ivarszervből izoláltak PGC-eket (gPGC), majd azokat piggyBac transzpozon rendszerrel transzfektálták, így kaptak GFP-t expresszáló ősvarsejt vonalat. Összesen 459 embrióba injektáltak PGC-eket, melyből 228 (52,2%) transzgénikus kiméra egyed kaptak (Park and Han, 2012).

3.5.6. Ideális recipiens fajta jelentősége

Egy ideális recipiens fajta különösen fontos számos kísérletben. Génmegőrzési kísérletekben a recipiens fajta toleranciája sokat javíthat az alapítási arányon. Yi és munkatársai kínai Meiling házityúk fajtából alapított PGC vonalat, majd azt karakterizálta és injektálta vissza recipiens embrióba. Hozzávetőlegesen 200 db PGC-t injektáltak bele a recipiens embrió dorzális aortáján keresztül az embrióba. 13 embrióból 8 embrió érte el az ivarérett kort, majd ezek tesztkeresztezésével bizonyították a kakasok heréibe integrálódott PGC-k jelenlétét. Átlagosan 12,6 %-os donor eredetű fajtát kaptak vissza (Yu et al., 2019). Lázár és munkatársai fekete kopasznyakú fajtába injektáltak vissza fogolyszínű magyar fajtából származó ősvarsejteket, majd az F1 generáció ivarérett korban történő visszakeresztezésével igazolták a PGC-k integrációját a recipiens fajta ivarszervébe. A feltételezett ivarszervi kimérák száma 13 kakas és 11 tyúk volt. A tesztkeresztezésből 340 csibe kelt ki, melyből 16 (5%) volt tisztán fogolyszínű fajta. Egy tyúk 3 kakassal történő visszakeresztezéséből 24 (16,6%) feltételezett ivarszervi kiméra kelt ki (Lázár et al., 2021).

4. ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

4.1. Kísérleti állatok és engedélyek

A kísérletekben használt őshonos magyar házityúk fajták tartása, és a hőkezelési kísérletek a Nemzeti Biodiverzitás és Génmegőrzési Központ – Haszonállat Génmegőrzési Intézet (NBGK-HGI) gödöllői telephelyén történtek (Engedély szám: PE/EA197-4/2016). Az MBK (később NAIK) utód intézményeként a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem – Genetika és Biotechnológiai (MATE-GBI) Intézetének zárt rendszerben végzett géntechnológiai eljárások engedélyének a száma: 106685/4/2005.

4.2. Hőhatások

4.2.1. Hőkezelés

A tojások keltetése egy MIDI F500S típusú keltetőben történt (PL Maschine Kft., Tárnok, Magyarország) kikelésig 37,8 °C-on 60%-os páratartalom mellett. Kikelést követően a kendermagos erdélyi kopasznyakú csibéket 24 óráig infralámpa alatt 32 °C-os hőmérsékleten tartották, *ad libitum* takarmány és ivóvíz állt rendelkezésre. A hőkezelés 38,5 °C-on, két órán keresztül tartott. Az első kísérleti periódusban a hőkezelést követően a csibék ivarérett korig lettek felnevelve, majd a termelési paraméterek lettek vizsgálva. A második kísérletben, a hőkezelt, valamint kontroll csibékből véletlenszerűen kiválasztottam 15-15 csibét, és azokból megtörtént a mintavétel. A többi csibe felnevelése ivarérett korig tartott.

4.2.2. Hőstressz

Az első hőkezelési kísérletben ivarérett korig nevelt erdélyi kopasznyakú magyar fajta egyedek 30 °C-os hőmérsékleten tartották 12 hétig. A hőstressz időszaka alatt az állatoknak *ad libitum* takarmány és ivóvíz állt rendelkezésére 16 órás megvilágítás és óránkénti 10 perces ventilláció mellett. 31-31 tojó 3-3 kakassal volt együtt a hőkezelt és kontroll csoportban egyaránt a reprodukciós vizsgálatok miatt. A hőstressz után a hőkezelt és hőstresszelt, valamint hőkezelt, de nem hőstresszelt csoportból is megtörtént a mintavételezés. A spermatológiai vizsgálatok során 10 – 10 kakas volt egyedi ketrecben ugyanabban a teremben.

4.3. Hőkezelési kísérletekből származó szöveti minták gyűjtése, elemzése

4.3.1. Szervek izolálása, tárolása

A hőkezelési kísérlet alkalmával a hőkezelt erdélyi kendermagos kopasznyakú fajta csibéiből 30 állatot kezelünk, míg ugyancsak 30 állatot kontrollként használtunk, ezek nem kaptak hőkezelést. Közvetlenül a 12 órás hőkezelést követően mind a hőkezelt, mind a kontroll állatokból, 15-15 csibéből történt meg a mintavétel. Az állatoktól öt szövetszövetmintát vettem. Az első az agy hipotalamikus régiójából származott, majd a májból, végül a két ivarszervből külön-külön. Tojók esetében csak a bal oldali petefészek lett eltávolítva, még akkor is, ha a jobb oldali petefészek nem fejlődött vissza teljesen. Végül a combizom szövetéből történt két minta tárolása. A minták a boncolást követően RNAlater® (Thermo Fisher Scientific, 145 Waltham, MA, USA) oldatba kerültek, mellyel szobahőmérsékleten is megóvható a rendkívül sérülékeny RNS épsége. Az izomszövetből gyűjtött másik mintát egy 1,5 ml-es Eppendorf csőben tároltam – 20 °C-on a későbbi DNS vizsgálatok elvégzéséig.

A további 15-15 csibét ivarérett korukig felneveltük, majd a 24. életükben ezektől az állatoktól is megtörtént a mintavétel. A szövetszövetmintákat ugyanabból a régióból voltak izolálva, mint a csibéknél. Az RNAlater®-be helyezett minták tárolása 4-5 napig 4 °C-os hűtőben történt, majd egyesével steril csipesz segítségével steril fülke alatt 500 µl TRIzol™ Reagensbe (Thermo Fisher Scientific, 145 Waltham, MA, USA) helyeztem át. Tíz perc szobahőmérsékletű inkubációt követően - 80 °C-os fagyasztóban voltak tárolva az RNS izolálásig.

4.3.2. Ivarszervek izolálása

Az állatokból az ivarszervek eltávolítása egy olló és csipesz segítségével történt. A fiatal két napos korú csibék ivarszervét egyben izoláltam és helyeztem RNAlater®-be. Az ivarérett állatok ivarszervének eltávolítása ugyancsak egészben történt. Az ivarszervek először egy műanyag petri csészébe kerültek, majd onnan történt az ivarszervekből a megfelelő méretű darab kivágása. A kakasok heréjét középen kettévágtam, és mind a külső, mind a belső részből vettem egy keresztmetszeti mintát, amit ugyancsak fagyasztócsőben tárolt RNAlater®-be helyeztet. A tojóknál kissé nehezebb volt az izolálás. Ebben az esetben a fehér tüszők melletti részből történt a mintavétel, hogy a petefészek benne legyen. A minta itt is RNAlater®-be került. Három nappal az izolálás után a minták átkerültek TRIzol™ Reagensbe, majd azokat mínusz 80 °C-os fagyasztóban tároltam a későbbi kísérletekig.

4.3.3. RNS izolálás szövetmintákból

A TRIzol™-ban – 80 °C-on tárolt szervekből az RNS izolálás menete: A felolvasztási idő alatt 2-3 darab ZrO₂ gyöngy hozzáadásával 1,5 ml-es Eppendorf safe-lock csövekbe pipetta segítségével kerültek a szövetdarabok TRIzol™-al együtt. Miután megtörtént a fagyasztócsövekből az Eppendorf csövekbe az áthelyezés homogenizátor (Bullet Blender Storm 24, BBY24M-CE, USA) segítségével a szövetet 2 percen keresztül homogenizáltam. Ezt követően 100 µl kloroform hozzáadásával erőteljesen összeráztam a cső tartalmát. Következő lépésként a minták 10 percig történő inkubálása következett szobahőmérsékleten, majd centrifugálás 12000 rpm-en 15 percig. A felülúszót új, feliratozott csőbe pipetázva - 20 °C-on tárolt izopropanolból adtam hozzá 150 µl-t. A pellet későbbi láthatósága végett 0,75 µl Glyco Blue Reagens-t (Thermo Fisher Scientific, 145 Waltham, MA, USA, AM9515) adtam hozzá, ami hozzákötődik a nukleinsavhoz, így láthatóvá teszi a kis méretű pelletet is. Ehhez a reakcióhoz fél óra - 20 °C-on történő inkubálás szükséges. Ezt követően ismét centrifugálni kell a mintákat 12000 rpm és 10 percig. A centrifugálás után a felülúszóra nincs szükség, a cső aljára tapadt pellet mosása 500 µl 75 %-os etanollal történt. A mosást háromszor ismételt meg, melyek között minden alkalommal a mintákat centrifugába helyeztem 12000 rpm-re 5 percig. Az utolsó centrifugálás után nagyon alaposan kellett eltávolítani az alkoholt, majd steril fülke levegőjével addig szárítottam a pelletet, amíg az alkohol teljesen el nem illan. A pellet méretétől függően, 20-30 µl nukleáz mentes vízben került feloldásra. A visszaoldódás elősegítésére a mintákat 37 °C-ra előmelegített asztali melegítő készülékbe helyeztem. Az izolálás utolsó lépéseként a koncentrációt, valamint az RNS minőségét NanoDrop One Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, 145 Waltham, MA, USA) segítségével mértem meg. Az RNS mintákat - 80 °C-os fagyasztóban voltak tárolva későbbi felhasználásig.

4.3.4. cDNS írás és génextpressziós vizsgálatok kvantitatív real-time qPCR-rel

A cDNS íráshoz High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit-tel dolgoztam (Applied Biosystems, Life Technologies, Carlsbad, US) a gyártó által meghatározott protokoll alapján. A szintetizált complemter-DNS-t -20 °C-on tároltam. A kvantitatív real-time PCR összemérése előtt egy részletes plate-tervet készítettem, melyen kijelölésre került, hogy melyik lyukban, milyen génre és melyik mintán kellett vizsgálni az expressziót. Minden gén esetében három parallel mérést végeztem. A reakcióhoz SYBR Green PCR Master Mix-et (Applied Biosystems, Life Technologies Carlsbad, US) használtam, amely egy kettős szálú fluoreszcens

DNS kötő festéket tartalmaz. A kapott Ct-értékeket exportáltam, majd a továbbiakban a GenEx (7.0) (MultiD, Analysis AB, Göteborg, Sveden) szoftver segítségével relatív expressziós értéket számoltam, melyet a GAPDH génhez, mint referencia génhez, illetve a házityúk embrionális fibroblasztból (CEF) származó kontroll mintához viszonyítottam. Minden qPCR futás plate-jén szerepelt minden génre a CEF, mely biztosította a különböző futások összehasonlítását. A hőhatás kapcsolt primerek Xie és munkatársainak (Xie et al., 2014) 2014-ben megjelent cikke alapján lettek beszerezve. A primer párok szekvenciáját, illetve jellemzőit a **1. táblázat**-ban tüntettem fel.

1. táblázat: Hőkezelési kísérletben használt primerek szekvenciái és jellemzői.

Primer elnevezés	Referencia szám	Primer szekvencia (5' - 3')	Termék méret (bp)
β-aktin	NM_205518.1	F: 5'-ACCTGAGCGCAAGTACTCTGTCT-3' R: 5'-CATCGTACTCCTGCTTGCTGAT-3'	95
GAPDH	NM_204305.1	F: 5'-CTTTGGCATTGTGGAGGGTC-3' R: 5'-ACGCTGGGATGATGTTCTGG-3'	128
HSF1	L06098.1	F: 5'-CAGGGAAGCAGTTGGTTCACTACACG-3' R: 5'-CCTTGGGTTTGGGTTGCTCAGTC-3'	192
HSF2	NM_001167764.1	F: 5'-CGCTGCTCGCATTCCT-3' R: 5'-TGTGGCCTCACTTGCTTCT-3'	194
HSF3	XM_420166.3	F: 5'-TCCACCTCTCCTCTCGGAAG-3' R: 5'-CAACAGGACTGAGGAGCAGG-3'	71
HSF4	NM_001172374.1	F: 5'-TGCCAGCCTTCCTAACCAAG-3' R: 5'-TGGTGCCATTCGTACTCCAG-3'	84
HSPA2 (Hsp70)	NM_001006685	F: 5'-CGTCAGTGCTGTGGACAAGAGTA-3' R: 5'-CCTATCTCTGTTGGCTTCATCCT-3'	145
HSP90AA1 (Hsp90)	NM_001109785.1	F: 5'-GAGTTTGACTGACCCGAGCA-3' R: 5'-TCCCTATGCCGGTATCCACA-3'	107

4.3.5. DNS izolálás izomszövetből

A hőkezelési kísérletből származó másik izomszövet – 20 °C-on volt tárolva DNS izolálásig. A szövetek feltáráshoz első lépésben egy lízis (**2. táblázat**) Proteináz K oldatot adtam hozzá 100 µl-es mennyiségben. A szövetet vortexeltem és 55 °C-ra előmelegített asztali melegítőben emésztettem 3 órán keresztül. Ezek után centrifugát használtam (12000 rpm 5 perc), hogy a meg nem emésztett szöveti struktúrák a cső aljára kerüljenek. Az asztali melegítőt 99 °C-ra állítottam a Proteináz K inaktiválásához. A megadott hőmérséklet elérését követően 10 percig inkubáltam a mintákat asztali thermomixerbe (Eppendorf, Germany), majd újra

centrifugáltam őket (12000 rpm. 1 perc). Az így feltárt mintákat – 20 °C-on tároltam a DNS kinyeréséig. A feltárt mintákhoz 50 µl fenolt és 50 µl kloroformot adtam hozzá. A cső tartalmát határozott mozdulattal összeráztam, majd centrifugába helyeztem 13000 rpm és 10 perces beállítások mellett. A szétvált fázisok közül a felső réteget egy új 1,5 ml-es feliratozott Eppendorf csőbe pipettáztam át. A - 20 °C-on tárolt tömény izopropanolból 150 µl -t adtam hozzá az átpipettázott mintákhoz, majd ismét a centrifugát használtam (13000 rpm, 5 perc). A felülúszót óvatosan eltávolítottam figyelve a cső alján összegyűlt pelletre. A pelletet 500 µl 75%-os etanollal mostam, majd ismét centrifugába helyeztem a csöveket (13000 rpm. 5 perc). A centrifugálás után óvatosan eltávolítottam pipettával az alkoholt, majd a csövekben lévő pelletet steril fülke levegőjével szárítottam, amíg a megmaradt kis mennyiségű alkohol is el nem illant. A száraz pelletet nukleáz mentes vízben oldottam vissza a pellet méretétől függően (30-40 µl). A DNS visszaoldódását elősegítve 37 °C-os asztali thermomixerbe (Eppendorf, Germany) helyeztem a mintákat 5 percre. A DNS minőségét és mennyiségét NanoDrop One Spektrophotometer segítségével határoztam meg. A tömény DNS-eket mínusz 150 °C-on tároltam, mivel a későbbiekben epigenetikai vizsgálatokat is szeretnénk végezni.

2. táblázat: Állati szövetek emésztéséhez szükséges lízis oldat összetevői.

	50 ml összeméréséhez	Törzs oldatok
0,1 M Tris (pH: 8,5)	5 ml	1 M Tris
5 mM EDTA	0,5 ml	0,5 M EDTA
0,2 M NaCl	2 ml	5 M NaCl
0,2% SDS	0,5 ml	20 % SDS
H ₂ O (MQ)	42 ml	H ₂ O (MQ)

4.3.6. Ivarmeghatározás (szex PCR)

Az izolált DNS-ből az ivarmeghatározást a GFP-PGC-k esetében *P2-P8*-as primerpárral (Griffiths et al., 1998), míg a hőkezelési kísérletnél a *CHDI*-es primerpár (Wang et al., 2007) segítségével végeztem (**3. Táblázat**). A tömény DNS-t egységnyi koncentrációra hígítottam (25 ng/µl). A koncentrációkat visszaellenőriztem NanoDrop One Spektrophotometer segítségével. Miután a minták koncentrációja megfelelő volt összemértem a PCR-t. A PCR összeméréséhez a hőkezelési kísérlet esetében minden mintához 6,75 µl MyTay Master mix-et használtam 0,5 µl forward és reverse *CHDI* primerrel, végül 4,25 µl steril vízzel egészítettem

ki a reakció elegyet 12 µl-re. Ehhez a végtérfogathoz adtam hozzá 1 µl 25 ng/µl-es koncentrációra hígított DNS-t, így a PCR összemérésem végtérfogata 13 µl lett.

A GFP-PGC-kból izolált DNS-ből az ivarmeghatározást *P2-P8* primerpárral végeztem, melynél 5 µl RedTaq Master mix-hez, 0,5 µl forward és reverse *P2-P8* primert, végül 3 µl steril vizet adtam hozzá. A végtérfogathoz 1 µl 25 ng/µl-es koncentrációra hígított DNS-t adtam hozzá.

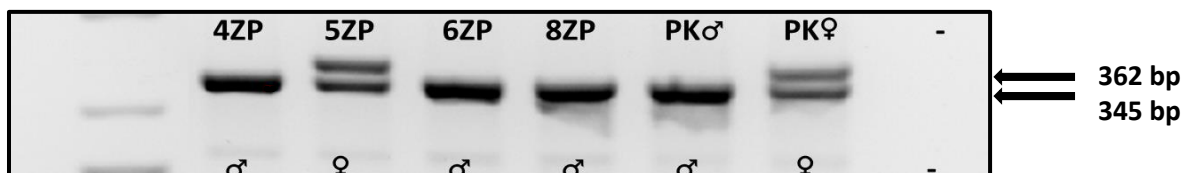
A PCR program *CHD1* primerpár esetében a következő volt: Első lépésben 95°C, 60 másodperc, majd 28 cikluson keresztül ismétlődve, 95 °C 15 mp, 48 °C 30 mp és 72 °C 10 mp. Végül egy 72 °C-os 5 perces inkubáció után 4 °C-on tartotta a mintákat. *P2-P8*-as primerpárnál kicsit módosított protokollal dolgoztam. Lépései: 94°C, 90 másodperc, majd 30 cikluson keresztül ismétlődve, 94 °C 45 mp, 48 °C 45 mp és 72 °C 30 mp. Végül egy 72 °C-os 5 perces inkubáció után 4 °C-on tartotta a mintákat a PCR készülék.

A PCR termékeket 1,5 %-os agaróz gélen futtattam meg *CHD1* esetében. A gél elektroforézisnél az első 10 percben 85 V-ra állítottam a feszültséget, majd ezt megemeltem 100 V-ra. A teljes futási időt 30 percben határoztam meg.

A *P2-P8*-as primerrel végzett ivarmeghatározásnál a PCR termékeket 3%-os agaróz gélen futtattam meg, hogy a band-ek jobban láthatóak legyenek. A kapott eredményt fotódokumentáltam (**7. ábra**).

3. táblázat: Ivarmeghatározáshoz használt primerek szekvenciái és jellemzői. Griffith et al. 1998-as és Wang et al. 2007-es cikke alapján.

Primer elnevezése	Referencia szám	Primer szekvencia (5' - 3')	Termék-méret (bp)
P2-Z	NC_006127.3	F: 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' R: 5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'	345
P8-W	NW_003766117.1	F: 5'-TCTGCATCGCTAAATCCTTT-3' R: 5'-CTCCCAAGGATGAGRAAYTG-3'	362
CHD1-Z	NC_006127.4	F: 5'-TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3' R: 5'-CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT-3'	461
CHD1-W	NC_006126.4	F: 5'-TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT-3' R: 5'-CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT-3'	322



7. ábra: GFP-t expresszáló PGC-k ivarmeghatározása P2-P8 primerpár segítségével.

4.4. Fluoreszcensen jelölt ősvarsejt (PGC) vonalak alapítása, karakterizálása

4.4.1. PGC vonalak alapítása

A skóciai Roslin Intézet által tervezett és használt zöld fluoreszcens (GFP) fehérjét expresszáló házityúk tojásait kaptam meg, melyeket 37,8 °C-os keltetőbe helyeztem, 60 %-os páratartalom mellett (keltetés 0. napja). A keltetés 2,5. napján (56-64 óra), amikor az embrió eléri a HH 14-15-ös stádiumot alkalmas időintervallum nyílik az ősvarsejtek izolálására. Az inkubátorból kivett tojást első lépésként letisztítottam 70%-os etanollal, majd egy kis lyukat ütöttem a tojás tompa végén, a léghólyagnál, hogy az embrió eltávolodjon a héjhártyától. Ezt követően egy nagyobb lyukat ütöttem a tojás felső részén, ahol az embrió elhelyezkedett. Egy szájpipettához rögzített üveg mikrokapilláris segítségével hozzávetőlegesen 1-1,5 µl vér szívható ki az embrióból, mely tartalmazza a PGC-eket. Ezt a vért egy előre kikészített sejtenyésző edénybe helyezem, amibe egy speciálisan PGC tenyésztésre alkalmas médium (4. Táblázat) volt (Whyte et al., 2015).

4. táblázat: Házityúk PGC specifikus médium összetevői. (Forrás:(Whyte et al., 2015)).

50 ml PGC médium összeméréséhez szükséges mennyiség	Összetevő	Katalógus szám	Gyártó
34,8 ml	Avian KODMEM	21068-028	Gibco
10,7 ml	Steril víz	15230-089	Gibco
464,5 µl	Pyruvate (100x)	11360070	Gibco
464,5 µl	MEM Vitamin Solution (100x)	11120052	Gibco
464,5 µl	MEM Amino Acids	M5550	Sigma
1 ml	B27 supplement (50x)	17504044	Gibco
0,5 ml	Glutamax (100x)	35050-038	Thermo Fisher
0,5 ml	NEAA (100x)	11140035	Gibco/Thermo Fisher
0,5 ml	Nucleotides (100 mM)	ES-008-D	Merck Millipore
0,2 ml	Pyruvate (100x)	11360070	Gibco/Thermo Fisher
0,1 ml	B-mercaptoethanol (50 mM)	31350-010	Thermo Fisher
0,1 ml	Pen/Strep (100x)	15070-063	Gibco
0,075 ml	CaCl ₂ (20 mM)	C4901-100G	Sigma
0,5 ml	Ovalbumin (20 %)	A5503-1G	Sigma
0,1 ml	Heparin Sulfate (50 mg/ml)	H3149-25KU	Sigma
100 µl	Házityúk szérum	C5405	Sigma
50 µl	h-ActivinA (25ng/mL)	PHC9564	Thermo Fisher
20 µl	h-FGF2 (25ng/µL)	13256-029	Thermo Fisher
25 µl	Ovotransferin (10mg/mL)	C7786	Sigma

4.4.2. PGC vonalak fenntartása, tenyésztése

Az izolátum tartalmazza a vér sejtjes elemeit, valamint az ősvarsejteket is. A tenyésztőmédium csupán a PGC-k osztódását segíti, a vér sejtjes elemei lassan kipusztulnak. A PGC-ket egy hónapig tenyésztettem CO₂ termosztátban 38 °C-on 5 %-os CO₂ szint mellett. Egy hónap elegendő arra, hogy a vérből származó sejtjes elemek teljesen eltűnjenek és a PGC-k stabil tenyésztévé fejlődjenek. Amelyik tenyészet ennyi idő alatt nem tudott legalább $1,0 \times 10^5$ sejtszámot elérni, azokkal nem dolgoztam tovább a későbbi kísérletekben. Az ősvarsejtek ebben a médiumban a tenyésztés folyamán nem tapadnak le a tenyésztő edény aljára, viszont nyugalmi állapotban a tenyésztőedény alján helyezkednek el. Minden második napon cseréltem médiumot a tenyészeteken, ügyelve arra, hogy a sejteket ne szívjam le, így a médium felső egyharmadát távolítottam el, melynek helyét friss előmelegített tenyésztőmédiummal töltöttem fel. Amennyiben „túlnő” egy tenyészet, abban az esetben felélik a tápmédiumban lévő faktorokat és tápanyag híján elkezdnek elhalni a sejtek. Ekkor szükséges összegyűjteni őket és egy asztali centrifugát használva 800 rpm-el 3 percig kicentrifugálni őket ebből a használt médiumból. A sejtek összegyűlnek a 1,5 ml-es Eppendorf cső alján, így a használt médiumot a sejttörmelékekkel biztonságosan el tudtam távolítani. Ezt követően teljesen új tenyésztőmédiumban felszuszpendáltam és egy új well-be kihígítva visszahelyeztem őket a termosztátba.

4.4.3. PGC tenyészetek mélyhűtése

Megfelelő mennyiségű PGC rendelkezésre állása esetén a sejteket mélyhűtve tároltam. A mélyhűtést egy speciális fagyasztómédiummal végeztem. A fagyasztómédium két alap alkotóeleme a DMEM (Gibco 21068-028) és a steril víz (Gibco 15230-089). Ezekhez adtam hozzá DMSO-t (Sigma D2650) úgy, hogy a végkoncentráció 8% legyen, 10% házityúk szérumot (Sigma C5405) és 0,75% 100 mM CaCl₂-t (Sigma C4901). A sejteket óvatosan felszuszpendáltam a tenyésztőedény aljáról, majd egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe gyűjtöttem össze azokat. Ezt követően centrifugába helyeztem és 3 percig 1600 rpm-en centrifugáltam a csöveket. Következő lépésként a használt médiumot óvatosan eltávolítottam ügyelve a pelletre, majd 250 µl DMSO mentes médiumban felszuszpendáltam a pelletet. Utolsó lépésként ehhez a 250 µl-es sejtsuszpenzióhoz csepegtettem hozzá nagyon lassan a DMSO-t tartalmazó fagyasztó médiumot. Miután végeztem Mr. Frosty freezing container-be (Sigma Aldrich, USA) helyeztem a sejteket, amit azonnal – 70 °C-os hűtőbe helyeztem, ezzel biztosítva volt a percenkénti 1 °C-os hűtési sebességet. Rövid idejű tárolás esetére a – 70 °C-os mélyhűtő is

alkalmas, de amennyiben hosszabb távú tárolás a cél, javasolt folyékony nitrogénbe helyezni, vagy mínusz 150 °C-os extra mélyhűtő berendezésbe.

4.4.4. DNS izolálás PG sejtekből

Az ősvarsejteket összegyűjtöttem a tenyésztőedényből egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd centrifugálás után a felülúszót eltávolítottam és 200 µl 1x PBS-ben szuszpendáltam a sejt pelletet. Hozzávetőlegesen 10^4 - 10^6 PGC-t gyűjtöttem össze, majd DNS-t izoláltam (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostic, US) a sejtekből. Első lépésként 200 µl Binding Buffert és 40 µl Proteináz K-t adtam a mintákhoz. Az összekeveréshez vortexet használtam, majd asztali melegítőben 10 percig 70 °C-on inkubáltam. Az inkubációs idő letelte után 100 µl tömény izopropanolt adtam hozzá, majd ismét vortexeltem. Az előre összeállított gyűjtőcsőbe helyezett filterre átpipettáztam a mintát, majd centrifugába helyeztem 1 percre 8000 rpm beállítás mellett. A centrifugálás után a filtert átraktam egy teljesen új gyűjtőcsőbe és rámértem a filterre 500 µl „inhibitor removal buffer” -t. Ismét centrifugáltam a csöveket 1 percre 8000 rpm-en. Végül két alkalommal egymás után 500 µl mosófolyadékkal mostam a filtert. Az előmelegített (70 °C) eluáló pufferből 80-100 µl közötti mennyiséget mértem a filterre és centrifuga segítségével ezzel mostam le a filterhez kötött nukleinsavat egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe. Az eluátumok koncentrációit Nanodrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével határoztam meg. A DNS-t egységnyi koncentrációra hígítottam és a 4.4.6-os pont szerint ivarmeghatározást végeztem belőlük.

4.4.5. RNS izolálás PG sejtekből

Az ősvarsejteken működő gének expressziós profiljának meghatározásában első lépés, hogy megfelelő tisztaságú RNS-ből induljunk ki. Ehhez az RNAqueous™ Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) izoláló Kit-et használtam. A PGC-eket összegyűjtést követően a gyártó által biztosított 100 µl Lysis oldatban szuszpendáltam fel. A sejtsuszpenziót vortex segítségével összekevertem, majd 50 µl abszolút etanol adtam hozzá. Átpipettáztam a sejtsuszpenziót az előre összeállított szűrős cső – gyűjtő cső filter részére. A csövet behelyeztem a centrifugába és 10 másodpercen keresztül maximális fordulatszámon centrifugáltam a folyadékot a szűrőn keresztül. Következő lépésként 3x mostam a KIT-ben található mosó oldattal, ugyancsak 10 másodperces centrifuga használatával, az utolsó lépésnél a centrifugát 1 percre állítottam és teljesen kiszárítottam maximális fordulatszám mellett a filtert. Végül az előre 75 °C-ra felmelegített eluáló oldatból 10 µl-t pipettáztam közvetlen a

filterre. A szűrő csövet átraktam egy 1,5 ml-es Eppendorf csőbe, majd ezt behelyeztem a centrifugába 30 másodpercre maximális fordulatszámon. Az eluált RNS koncentrációját Nanodrop Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific, USA) segítségével határoztam meg, további mintafeldolgozásig - 70 °C-on tároltam az RNS-eket.

4.4.6. PGC tenyészetek felolvasztása

A PGC tenyészetek felolvasztását 37 °C-os vízfürdőben végeztem. Figyelve arra, hogy ha folyékony nitrogénből történt a sejtek kiemelése ne azonnal kerüljenek a vízfürdőbe (mert elrepedhet, szétduzzanhat a fagyasztócső, ami a minták elvesztését eredményezi). Egy kis ideig szobahőmérsékleten kézben melegítettem, majd a vízfürdőben addig tartottam, amíg fel nem olvadt teljesen. Ezután gyorsan átpipettáztam 2 ml frissen előkészített ősvarsejt tenyésztő médiumot tartalmazó centrifuga csőbe, majd centrifugába helyeztem 3 percre 1600 rpm-re. Centrifugálás után eltávolítottam az összes felülúszót, majd a pelletet felfuszpendáltam PGC médiumban és kihelyeztem a sejteket tenyésztőedénybe.

4.4.7. PG sejtek immunhisztokémiai vizsgálata

A GFP-vel jelölt ősvarsejteket összegyűjtöttem immunhisztokémiai vizsgálatra (**5. táblázat**). Leszámoltam a sejteket, majd kicentrifugáltam a médiumból őket. 1x PBS-el mostam a sejteket, majd ismét egy centrifugálás következett (3 perc, 800 rpm). Az optimális sejtszámot beállítottam (10^5 PGC / ml), majd kicseppentettem egy tárgylemezre 20 μ l PBS-t, ami a sejteket tartalmazta. A sejteket rászárítottam a tárgylemezre, majd 4%-os PFA-val fixáltam a tárgylemez felületére azokat. A permeabilizáció és blokkolás során két különböző blokkoló oldatot használtam, annak megfelelően, hogy a sejtmagban vagy a sejtfelszínen található a kimutatni kívánt fehérje. A blokkoló oldat eltávolítása után elsődleges ellenanyagot tettem a sejtekre. Anti-nyúl CVH, anti – nyúl-P63, és anti-egér SSEA-1 elsődleges ellenanyagokat alkalmaztam (1:100). Az elsődleges ellenanyagban egy éjszakán át, 4⁰C-on inkubáltam a sejteket.

5. táblázat: Immunhisztokémiai jelölés lépései.

	Immunfestés lépése	Használt oldat	Inkubációs idő	Inkubáció hőmérséklete
1	PGC pellet felfuszpendálása	0,1% BSA-PBS	15 perc	Szobahőmérséklet
2	Fixálás	4%PFA	10 perc	Szobahőmérséklet
3	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet
4	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet
5	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet
6	Permeabilizálás, Blokkolás	Blokkoló oldat	45 perc	Szobahőmérséklet
7	Elsődleges ellenanyag (1st ab)	1st Ab in 0,1% BSA-PBS-ben	1 éjszaka	4C°
8	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet
9	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet
10	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet
11	Másodlagos ellenanyag (2st ab)	2st Ab 0,1% BSA-PBS-ben	60 perc	37°C
12	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet, sötétben
13	Sejtmag festés	To-PRO™ - 3 Iodide 0,01% BSA-PBS-ben	15 perc	Szobahőmérséklet, sötétben
14	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet, sötétben
15	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet, sötétben
16	Mosás	0,01% BSA-PBS	5 perc	Szobahőmérséklet, sötétben
17	Fedő oldat	ProLong® Gold Antifade beágyazó médium		Szobahőmérséklet, sötétben

A másodlagos ellenanyagokat (AlexaFluor555 számár-anti-nyúl IgG (H+L), illetve AlexaFluor488 számár-anti-egér-IgM (1:500) hozzáadása után sötétben, 60 percig, 37°C-on inkubáltam. A magfestéshez, TO-PRO™-3-at (1:500) alkalmaztam, 15 perces inkubációs idő mellett. A festést követően 10 µl ProLong® Gold Antifade beágyazó médiumot használva a mintákat lefedtem, mikroszkópos analízisig 4°C-on, sötétben tároltam.

4.4.8. PG sejtek proliferációs rátájának és apoptotikus PGC-k arányának meghatározása

A sejtvonalak proliferációs rátájának meghatározása az ImageXpress Pico EC (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA) automata fluoreszcens képkészítő és képelemző mikroszkóppal történt. Nagy felbontású, digitális konfokális képek készítését lehetővé tevő kamerával felszerelt fluoreszcens sejtszámoló funkciójának segítségével történt a tenyészés során a sejtszám meghatározása. Első lépésként a kiindulási sejtszám Arthur™ Cell Counter (NanoEntek, Waltham, MA 02451, USA) segítségével lett meghatározva. A mérés 0. napján 10000 - 10000 sejt lett kihelyezve 48 lukú plate-re, lyukanként. A mérés során minden well-ben 25-25 mezőn található sejtek számát határozta meg az ImageXpress Pico készülék. 4

párhuzamos well-analízisét követően számolt mérési adatából lett kikalkulálva az átlag sejtszám, illetve meghatározva a sejtenyészetek proliferációs rátája.

A tenyészeteken fluoreszcens festéssel lett lemérve az élő (Hoechst 33342), az apoptotikus (phosphatidyl-serine), a késői apoptotikus (EthD-I) sejtek aránya PromoKine Apoptotic/Necrotic/Healthy Cells Detection (PK-CA707-30018) kisset használva. Az apoptotikus sejtek könnyen felismerhetők, zöld fluoreszcens Annexin V ellenanyaggal festődnek. Az Ethidium Homodimer III egy erősen pozitívan töltött nukleinsav, amely nem tud bejutni az élő és korai apoptotikus sejtekbe. A membránon átdiffundáló Hoechst33342 a sejtmag DNS-éhez kapcsolódik és kék fluoreszcenciát mutat. Az egészséges sejteket csak a Hoechst 33342 festi, ami jelen van az apoptotikus és a nekrotikus sejtekben is. Az apoptózis késői szakaszában a sejtek zöld és piros színűek. Az élő, apoptotikus és késői apoptotikus sejtek arányát ArthurTM Cell Counter segítségével lett meghatározva.

4.4.9. Fluoreszcensen jelölt PG sejtek mikroinjektálása recipiens embrióba

A GFP-t expresszáló ősvarsejteket összegyűjtöttem a tenyésztő plate-ről, majd sejtszámláló géppel (ArturTM Cell Counter, Nanoentek AT1000) meghatároztam a pontos sejtszámot. Centrifugálás segítségével koncentráltam a sejteket a cső aljára. A felülúszót alaposan eltávolítottam, majd kiszámoltam, hogy milyen térfogatú folyadékban kell visszaszuszpendálnom a sejteket, hogy az optimális 3-5000 db/ μ l koncentrációt érjem el. A térfogat meghatározását követően 2:1 arányban DMEM és steril víz keverékében visszaszuszpendáltam a sejt pelletet. Az ősvarsejtek injektálásának optimális időszaka ugyanakkorra tehető, mint amikor izoláltam azokat. A tojást a keltetőből kivéve először alkoholos kendővel fertőtlenítettem. Az embrionális fejlődés 3. napján egy kis lyukat ütöttem a tojás tompa végén, a légkamránál, hogy az embrió eltávolodjon a héjtól, majd a tojás felső részén csipesszel egy ablakot nyitottam. Mikroszkóp alatt meghatároztam az embrió stádiumát és beállítottam a megfelelő fókusztávolságot. Óvatosan összekevertem a sejteket az Eppendorf csőben, majd egy szájpipettához csatlakoztatott üveg mikrokapilláris segítségével 1 μ l-t felszívtam a sejtes szuszpenzióból. Ezt a térfogatot közvetlen az embrió szívéen keresztül juttattam a vérkeringésbe, mivel ez az izmos szerv a legalkalmasabb az ilyen típusú kísérletre. A beavatkozást követően laboratóriumi parafilmmel és láng használatával lezártam a tojás felületén található nyílást, valamint a tompa végén ütött kis lyukat, majd visszahelyeztem a keltetőbe a tojást.

4.5. Ivarszervi vizsgálatok

4.5.1. Ivarszervekbe integrálódott PGC-k detektálása, ivarszerv fixálása

A GFP-vel jelölt ősvarsejtek injektálását követően az embrionális fejlődés 14. napján határoztam meg a bejuttatott sejtek integrációjának mértékét az ivarszervekbe. Az ivarszerveket eltávolítottam csipesz és olló segítségével, majd 1x PBS-be helyeztem. Minden embrióból szövetmintát gyűjtöttem az ivarok ellenőrzése céljából. Az ivarszerveket kezdetben a Leica konfokális mikroszkópjával (Leica TCS SP8, Leica Ltd., Germany), majd laborunk fluoreszcens Leica sztereomikroszkópjának (Leica M205 FCA, Leica Ltd., Germany) segítségével vizsgáltam. A GFP-t expresszáló sejteket is tartalmazó (pozitív) ivarszervekről fotódokumentációt készítettem. Az ivarszervek vizsgálatának végeztével azokat 4%-os PFA-ba fixáltam a szerveket. Egy éjszakás 4%-os PFA inkubációt követően steril PBS-be helyeztem át őket a későbbi kísérletek elvégzéséig és 4 °C-on tároltam őket.

4.5.2. Ivarszervek beágyazása

Az ivarszervek beágyazásának technikáját a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének Laboratóriumát vezető Dr. Nagy Nándor által kifejlesztett protokollja alapján végeztem. A – 20 °C-on tárolt 7,5 %-os zselatint előmelegített vízfürdőben felmelegítettem. Meleg zselatint öntöttem egy 5 ml-es mérőcsónakba, majd a 4 °C-on tárolt ivarszerveket átraktam PBS-ből a mérőcsónakba kimért, előmelegített zselatinba. A szerveket egy órán keresztül inkubáltam 37 °C-os termosztátban, hogy a zselatin átjárja a szövetet. Az inkubációs idő alatt egy másik mérőcsónakot félig feltöltöttem meleg zselatinnal és hagytam, hogy megszilárduljon. Az egy órás inkubációs idő után a szervet átraktam a már megszilárdult zselatinra és pontosan bepozicionáltam, majd vártam öt percet. Az öt perces várakozásra azért volt szükséges, hogy a második réteg meleg zselatin ráöntése után a szerv ne emelkedjen fel a folyadék tetejére. Megvártam, míg a két zselatinréteg megszilárdul közrefogva a szervet. Miután megszilárdult a zselatin filctollal pontosan bejelöltem az ivarszerv helyzetét és a metszésnek a helyes irányát attól függően, hogy hossz- vagy keresztmetszetet szeretnék majd készíteni. A bejelölés után egy éles ollóval kivágtam egy 1x1 centiméteres zselatin kockát, ami közrefogta a szervet, majd az éleit szikepengével egyenesre igazítottam. Az így kapott zselatinkockát fagyasztottam. A fagyasztáshoz – 20 °C-on tárolt 100 %-os izopentánt, valamint folyékony nitrogént használtam. A pontos hőmérséklet mérésére egy - 150 °C-ig kalibrált digitális hőmérőt használtam. Egy polisztirol dobozba öntöttem folyékony nitrogént, majd az izopentánból 200 ml-t öntöttem egy műanyag mérőpohárba. Egy hosszú csipesszel a

mérőpoharat a folyékony nitrogénbe mártottam és a hőmérővel folyamatosan ellenőrizve, - 50 °C-ig hűtöttem. Ha hidegebbre hűtöm akkor a zselatin kocka megreped. Az optimális fagyasztási hőmérsékleti tartomány – 45 és - 40 °C közé esik. Ekkor egy percig hagytam az izopentánban a zselatin kockát. Ez alatt az idő alatt egy 50 ml-es falcon centrifuga csövet feliratoztam és beleraktam a folyékony nitrogénbe lehűlni. Egy perc után a teljesen kifehéredett zselatinblokkokat beleraktam a lehűtött centrifugacsőbe. Amennyiben 3-4 napon belül lemetszettem a szerveket elegendő – 20 °C-ra eltenni viszont, ha később történt a metszés – 80 °C-on tároltam.

4.5.3. Ivarszervek metszése

Amennyiben hosszú ideje – 80 °C-on volt tárolva a zselatin kocka, akkor metszés előtt fél órával át kell helyezni – 20 °C-ra, így a metszőgép nem fogja törni és a metszéshez optimális hőmérsékletű lesz a zselatin. A zselatin kockát PolyFreeze cryomatrix (Sigma Aldrich, 039K1626, USA) segítségével rögzítettem a kriosztát tárgyasztalára (MicroM GmbH D-6900 Heidelberg, Germany). A mozgató motorral beállítottam hozzávetőlegesen a metszés síkját, továbbá a metszetek vastagságát (10 - 15µm) is beállítottam. A metszés kezdésekor figyeltem, hogy a vágás során a kés nehorog letörje a ráragasztott zselatin blokkot a tárgyasztalról. Miután elértem a zselatin kocka belsejében található szervet minden harmadik metszetet leszedtem tárgylemezre. Mindig figyeltem a mikrotóm (MicroM GmbH D-6900 Heidelberg, Germany) belső hőmérsékletét, valamint a tárgyasztal hőmérsékletét is, hogy optimális legyen. Egy tárgylemezre 3 metszetet helyeztem el. A metszés végeztével a tárgylemezeket először 4 °C-os hűtőbe helyeztem, majd, ha nem azonnal végeztem rajta immunhisztokémiai vizsgálatot, akkor – 20 °C-on tároltam.

4.5.4. Immunhisztokémiai vizsgálatok kiméra ivarszervben

Az ivarszerv metszetek immunhisztokémiai vizsgálatát egy rehidrációs lépéssel kezdtem, ahol kézzel hőmérsékletű 1x PBS-be mártottam a tárgylemezeket, melynek hatására a rászáradt zselatin leoldódott. A tárgylemezen maradt metszetet körberajzoltam PAP pen-el, amely hidrofób tulajdonságú, így a metszetre mért cseppek nem folytak szét a tárgylemezen. A részletes protokoll a **5. táblázatban** látható. A megfestett metszeteket Leica (TCS SP8, Leica Ltd., Germany) konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk meg és készítettünk nagy felbontású képeket.

4.5.5. Statisztikai módszerek

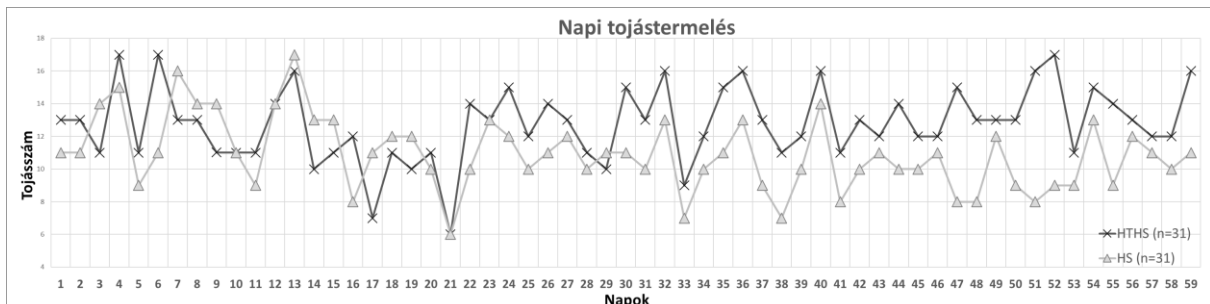
A kapott adatok ábrázolása és elemzése az RStudio (1.0.136), R (R-3.2.2), Genex 7.0 (MultiD Analysis AB, Göteborg, Sveden) és Excel (MS Office) szoftverek segítségével történt. A target gének expressziós változásait összehasonlítottam a referencia gén (GAPDH) expressziójával a standard $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel, ahol a $Ct =$ ciklus treshold; $\Delta Ct = Ct$ (target gén) — Ct (referencia gén) és $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$ (test minta) — ΔCt (kontrol minta). A középértékek összehasonlítása minden esetben t-próbával történt. A hőkezelési kísérlet során χ^2 -próbákat alkalmaztam a kategóriák elemzésére. Az injektálási adatok feldolgozása logisztikus regressziós modellek segítségével történt, melyekben függő változóként használtam az ivarszervekbe történt integrációt, illetve az embriók túlélését, magyarázó változóként pedig az alkalmazott fajtákat. A csoportok közötti különbségek további elemzése Tukey kontrasztokkal történt. (*P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001).

5. EREDMÉNYEK

5.1. Szaporodásbiológiai vizsgálatok eredményei (előzetes kísérletek)

5.1.1. Tojástermelés és termékenység vizsgálata

Kísérleteim megkezdése előtt már álltak rendelkezésre előzetes kísérletekből származó adatok, melyeknek eredményeit ebben az alfejezetben szemléltetem. Tojók esetében két paramétert vizsgáltak az NBGK-HGI munkatársai 2015 – 2016 években. A napi tojástermelést hasonlították össze az előzetesen hőkezelt állatok és a hőkezelést nem kapott tojótyúkok között. Azt kapták, hogy az előzetesen hőkezelt tyúkok szignifikánsan magasabb tojástermelést tudtak produkálni, mint a kontroll csoport. Összesen 1654 tojást vizsgáltak. A hőkezelt tojók magasabb környezeti hőmérsékleten 890 (54%) tojást produkáltak, míg a kontroll állatok 764 (46%) tojást tojtak (**8. ábra**). Az inkubáció 7. napján történt tojáslámpázás után az előzetesen hőkezelést kapott tyúkok tojásainak 6,18%-át (55 tojás), míg a kontroll tyúkok tojásainak 5,46 %-át (42 tojás) kellett eltávolítani, mert nem indult meg az embrionális fejlődés. A tojások további vizsgálatából kiderült, hogy a hőkezelt tyúkok tojásainak 10,91%-a, míg a kontroll tojók tojásainak 42,86%-a bizonyult terméketlennek (Anand et al., 2016; Tóth et al., 2021).

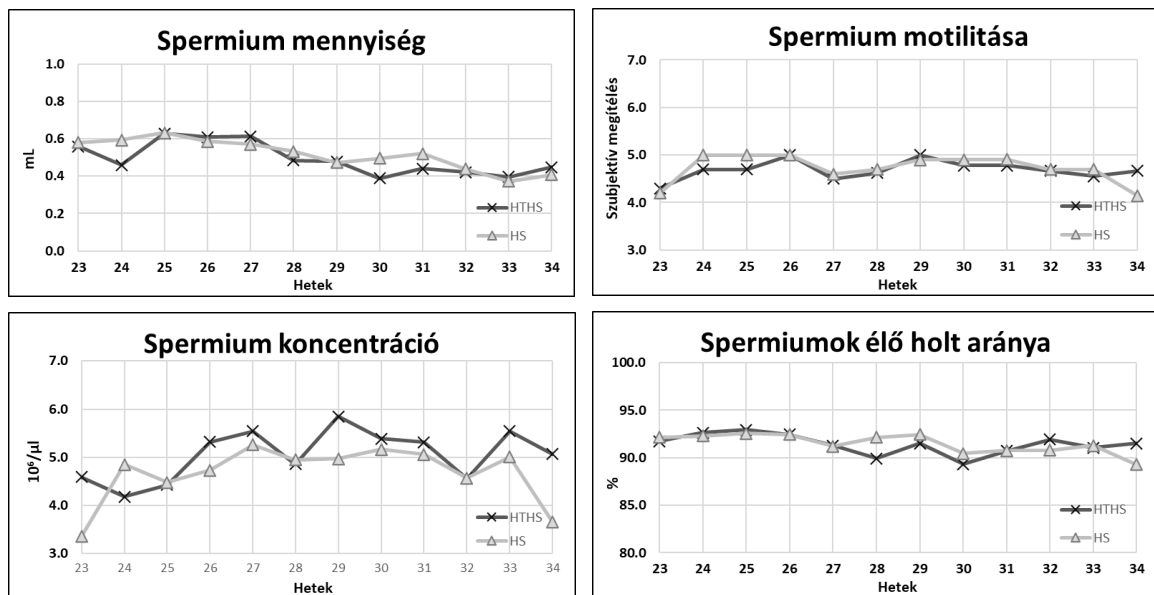


8. ábra: A hőkezelés hatására megváltozott napi tojásszám ábrázolása a hőstresszelt állományban. HS: Hőstresszelt állatok, HTHS: Előzetesen hőkezelt és hőstresszelt állatok (Tóth et al., 2021).

5.1.2. Spermológiai vizsgálat

A kakasok spermológiai vizsgálatának eredményei nagy hasonlóságot mutatnak az előzetesen hőkezelést kapott és a kontroll állatok teljesítménye között. Tíz, hőkezelésen átesett kakas és tíz kontroll kakas (**M2 melléklet A.**) termékenységi eredményei lettek elemezve négy paraméter alapján (minőség, koncentráció, motilitás és élő-holt arány) (**9. ábra**). Az ejakulátum mennyiségének mérése pipettával történt, ahol nem volt detektálható szignifikáns különbség a két csoport között ($p=0,5075$). A spermium koncentráció esetében sem volt különbség, az előzetesen kezelt és a kontroll csoport között ($p=0,1077$), ahogyan a motilitásnál sem volt kimutatható különbség ($p=0,6972$). Végül a két csoport élő-holt spermium arányának

meghatározásában sem volt szignifikáns változás ($p=0,8816$). Összefoglalva a spermológiai eredmények azt mutatják, hogy az előzetes hőkezelés nem volt hatással a kakasok termelékenységére és spermológiai paramétereire.



9. ábra: Előzetes hőkezelés hatása hőstressz esetén háztyúk kakasok spermológiai paramétereire. HS: Hőstresszelt állatok, HTHS: Előzetesen hőkezelt és hőstresszelt állatok (Tóth et al., 2021).

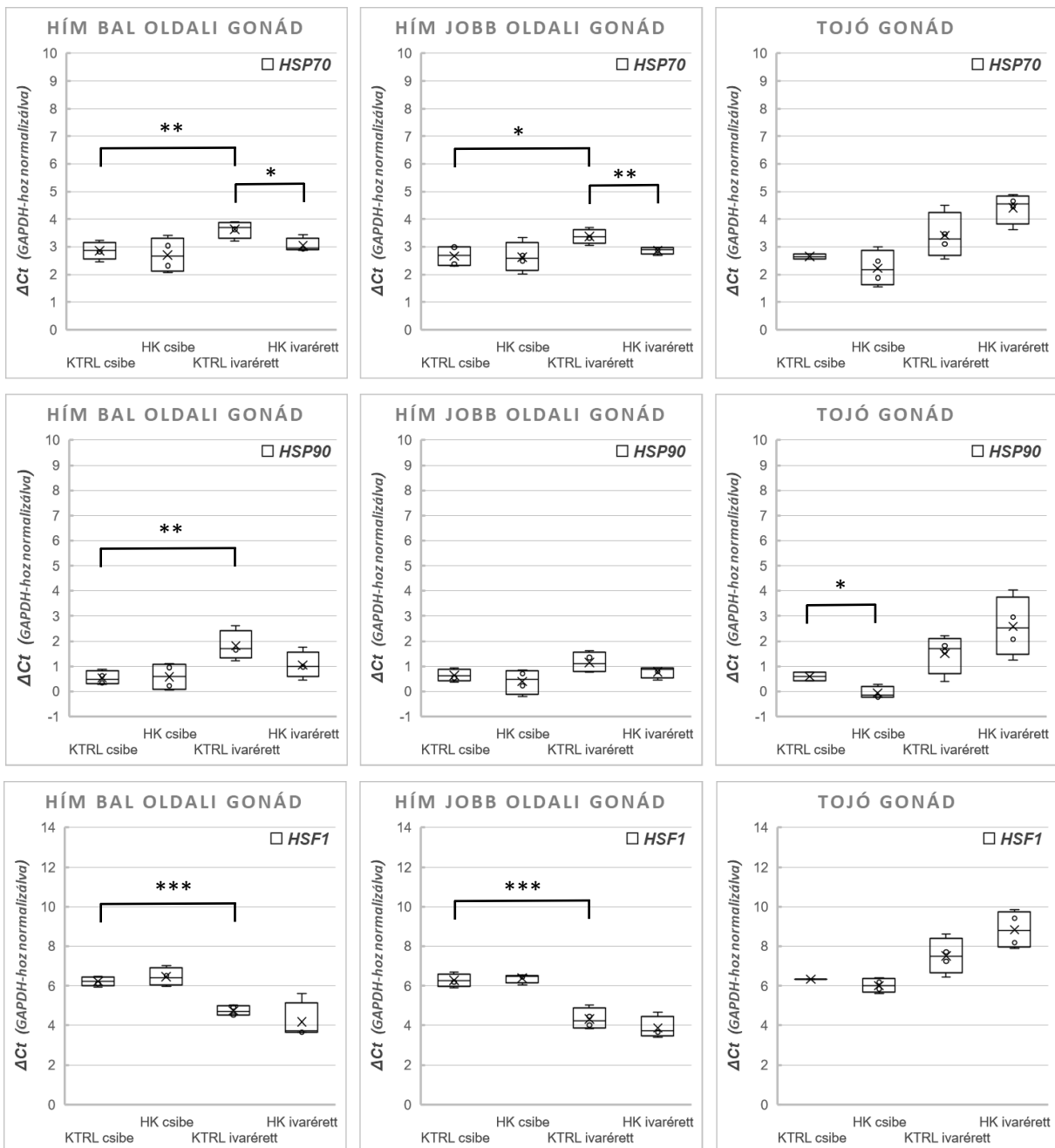
5.2. A hőkezelés molekuláris biológiai hatásának vizsgálata

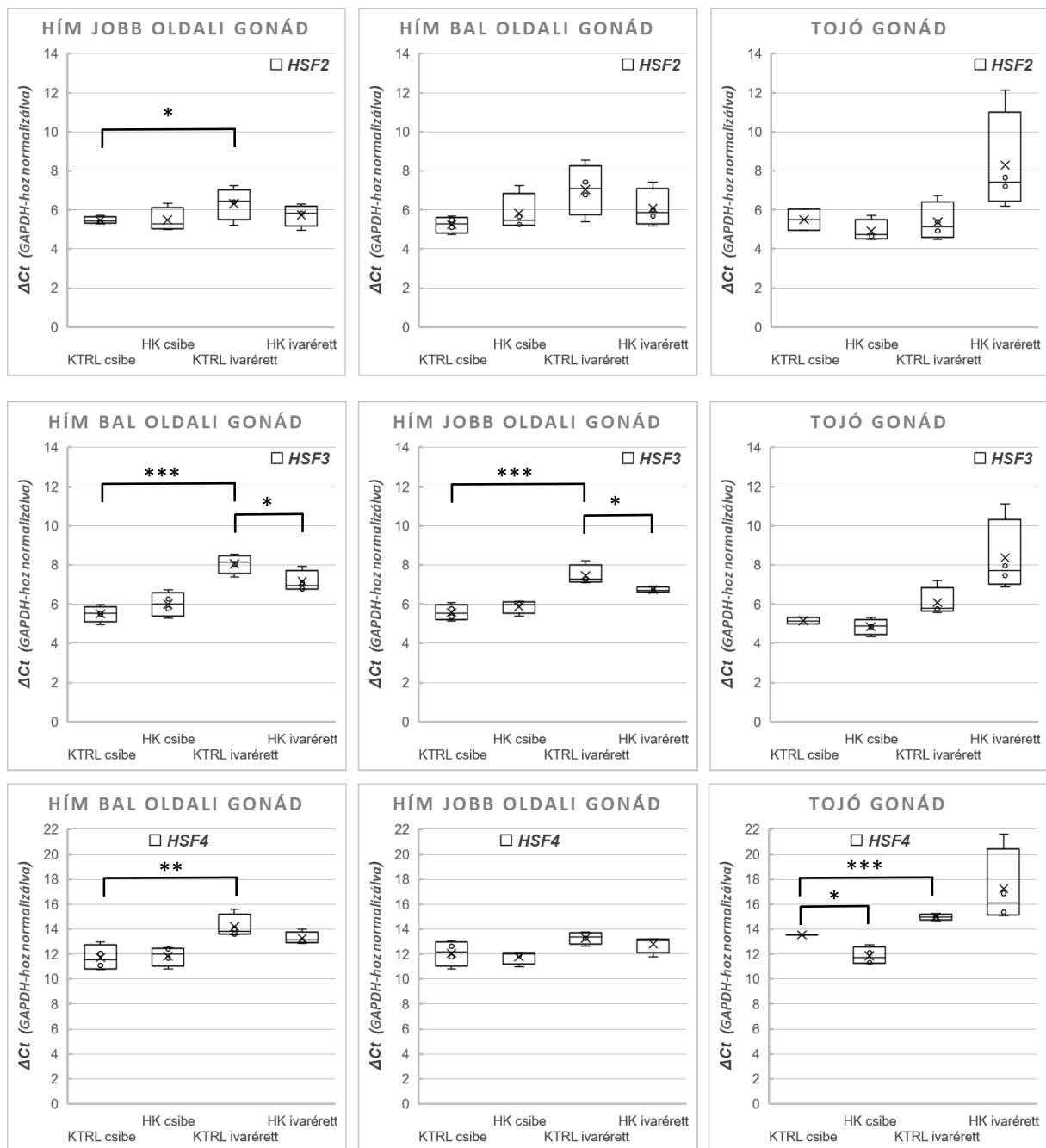
5.2.1. HSP és HSF Delta Ct értékeinek összehasonlítása

A II. hőkezelési kísérletnél 30 – 30 állat vizsgálatát végeztük el. Az első 30 állat előzetesen hőkezelve lett, míg a másik 30 átlagos környezeti hőmérsékleten volt tartva. Közvetlenül a hőkezelés után 15 – 15 állatot kiválasztottam véletlenszerűen (**M2 melléklet, B1**), melyekből megtörtént a mintavételezés, a többi állatot ivarérett korig neveltük. Összesen hat csoportot határoztam meg. Ivar szerinti (kakas, tyúk), korcsoport szerinti (csibe, ivarérett) és kezelés szerinti (hőkezelt, kontroll) besorolásban. Minden csoport legalább 4 egyedet tartalmazott (**M2 melléklet, B2**). A csoportokban szereplő egyedek RNS mintáit egyedileg is vizsgáltam, valamint azonos arányban össze is kevertem a csoporton belüli egyedek RNS-eit, így készítve egy csoport pool-t. Az egyedileg mért értékek átlaga, valamint a pool-ozott minták eredményei nagy hasonlóságot mutattak (**M3 melléklet**). A delta Ct értékek összehasonlítását az egyedi adatokból számoltam ki (**10. ábra**). Szignifikáns különbséget találtam *HSP70* ($p=0,0289$) és *HSF3* ($p=0,0482$) delta Ct értékben a hőkezelt és kontroll csoport között, a hím bal oldali ivarszervek esetében, ivarérett korban. A csibe és az ivarérett csoportok között a hím bal oldali ivarszervben, mind a hat gén szignifikáns eltérést mutatott. A hím jobb oldali

ivarszervben ugyancsak a *HSP70* ($p= 0,0136$) és *HSF3* ($p= 0,0349$) delta Ct értékeinél találtam szignifikáns különbséget az ivarérett példányoknál. A kontroll kakasok jobb oldali ivarszervének *HSP70* ($p= 0,023$), *HSF1* ($p=0,0007$) és *HSF3* ($p= 0,0013$) expressziós profilja szignifikánsan különbözött a csibék és ivarérett egyedek között.

Tojók esetében a *HSP90* ($p= 0,0355$) és a *HSF4* ($p= 0,0342$) delta Ct értékében találtam szignifikáns különbséget közvetlenül hőkezelés után csibe korban, a kontroll és hőkezelt egyedek között. Egyedül a *HSF4* ($p=0,0016$) expressziós értéke növekedett meg szignifikáns mértékben a kontroll csibe és kontroll ivarérett példányok között.



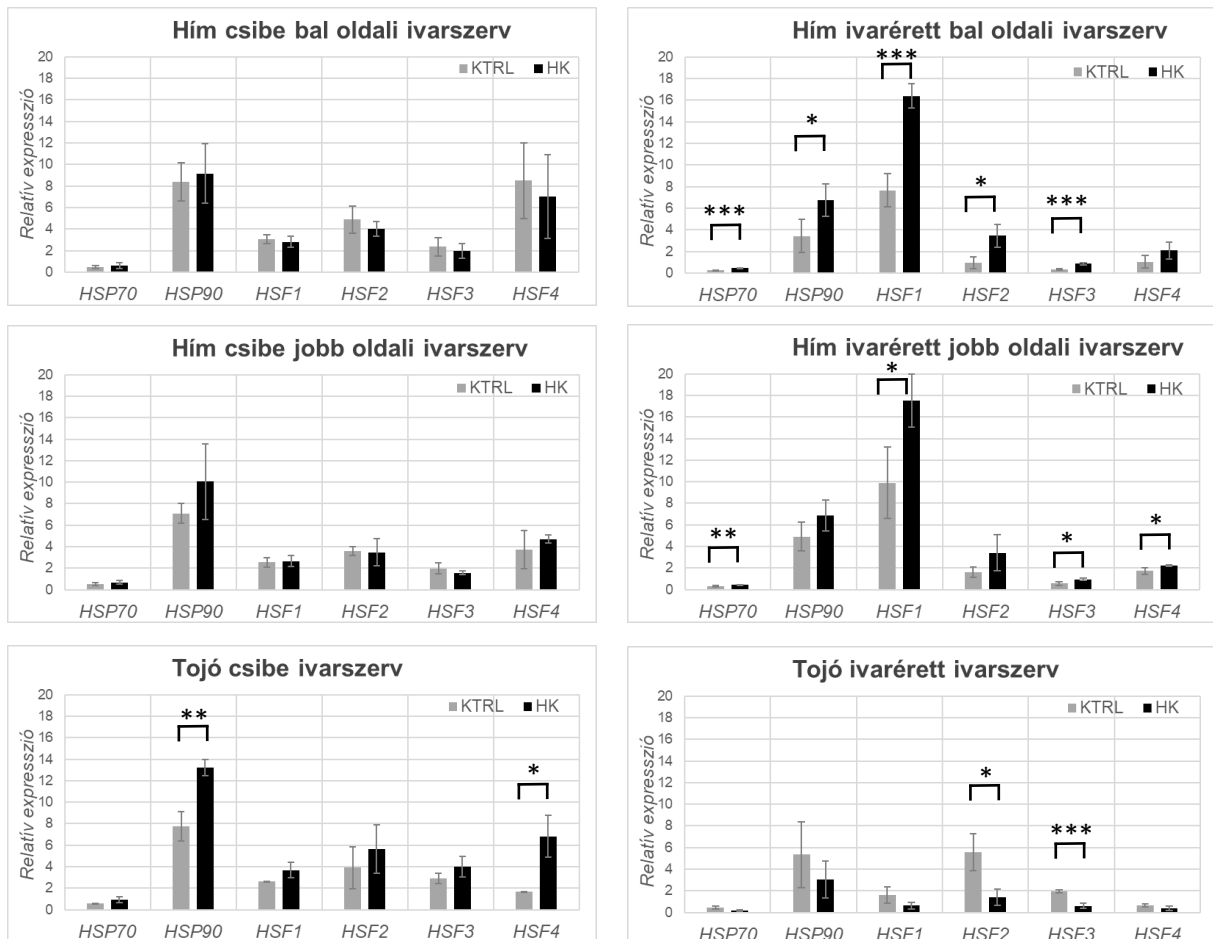


10. ábra: ΔCt értékek az előzetesen hőkezelt és kontroll tojók, valamint hím állatok ivarszerveiben. Minden esetben a *GAPDH* referencia génhez lettek normalizálva a ΔCt értékek. * < 0.05 ; ** < 0.01 ; *** < 0.001 .

5.2.2. HSP és HSF relatív expressziós értékek összehasonlítása

Annak érdekében, hogy teljesebb képet kapjak a hősokk fehérje (HSP) és hősokk faktor (HSF) gének expressziós változásairól, relatív expressziós értékeket számoltam, *GAPDH* referencia génhez normalizálva (**11. ábra**). A számoláshoz a Genex (7.0) szoftvert (MultiD Analyses AB, Göteborg, Sveden) használtam. Közvetlenül a hőkezelés után csibe korban

csupán a tojó állatoknál találtam szignifikánsan magasabb relatív expressziós szintet a *HSP90* ($p= 0,0094$) és *HSF4* ($p= 0,0387$) géneknél. Összehasonlítva az ivarérett példányokkal, ellentétes összefüggés figyelhető meg. Az előzetesen hőkezelt állatoknál az összes hősokk kapcsolt gén expressziós szintje alacsonyabb, mint a kontroll állatoké. *HSF2* ($p= 0,0181$) és *HSF3* ($p= 0,0094$) gének esetében a különbség szignifikáns. Kakasok esetében közvetlenül hőkezelés után nem volt szignifikáns különbség kimutatható az ivarszervekben. Ivarérett korban a bal oldali ivarszervben a *HSF4* kivételével az összes gén relatív expressziós értéke szignifikánsan megemelkedett. A jobb oldali ivarszerv esetében a *HSP70* ($p= 0,0052$), *HSF1* ($p= 0,0333$), *HSF3* ($p= 0,0332$) és *HSF4* ($p= 0,0498$) relatív expressziójában volt szignifikánsan magasabb érték kimutatható.



11. ábra: Relatív expressziós értékek hím és tojó állatokban. Az összehasonlítás alapját házttyúk embrionális fibroblaszt (CEF) sejtek adták minden hősokkfehérje (*HSP70*; *HSP90*) és hősokkfaktor (*HSF1*; *HSF2*; *HSF3*; *HSF4*) gén expressziója esetében. A változások a bal és jobb oldali ivarszervben, közvetlenül hőkezelés (csibe korban) után és ivarérett korban lettek vizsgálva. * < 0.05; ** < 0.01; *** < 0.001.

5.3. Fluoreszcensen jelölt házityúk ősvarsejtek alapítása

A GFP-t expresszáló ősvarsejt tenyészeteket a Roslin Intézet által készített GFP-s konstrukciót tartalmazó házityúk embrióiból alapítottam. Összesen 19 embrióból izoláltam vért, melyből 10 stabil ősvarsejt tenyészetet sikerült létrehoznom (**6. táblázat**). Az alapítás célja az volt, hogy legalább egy hím és egy nőstény ivarú stabil osztódási képességgel rendelkező PGC vonalat tudjak alapítani. A tenyészetet akkor fogadtam el stabil vonalként, hogyha izolálást követően maximum másfél hónappal legalább 1×10^6 db PGC volt jelen a tenyésztőedényben, majd ezeket a sejteket mélyhűtöttem.

6. táblázat: GFP-t expresszáló ősvarsejt vonalak alapítása.

GFP-t expresszáló tenyészetek alapítása	db	%
Kiindulási tenyészetek	19	100.00
Izolált ZW tenyészet	6	31.58
Izolált ZZ tenyészet	13	68.42
Fagyasztott tenyészetek	10	52.63

5.4. Fluoreszcensen jelölt ősvarsejt tenyészetek *in vitro* jellemzése

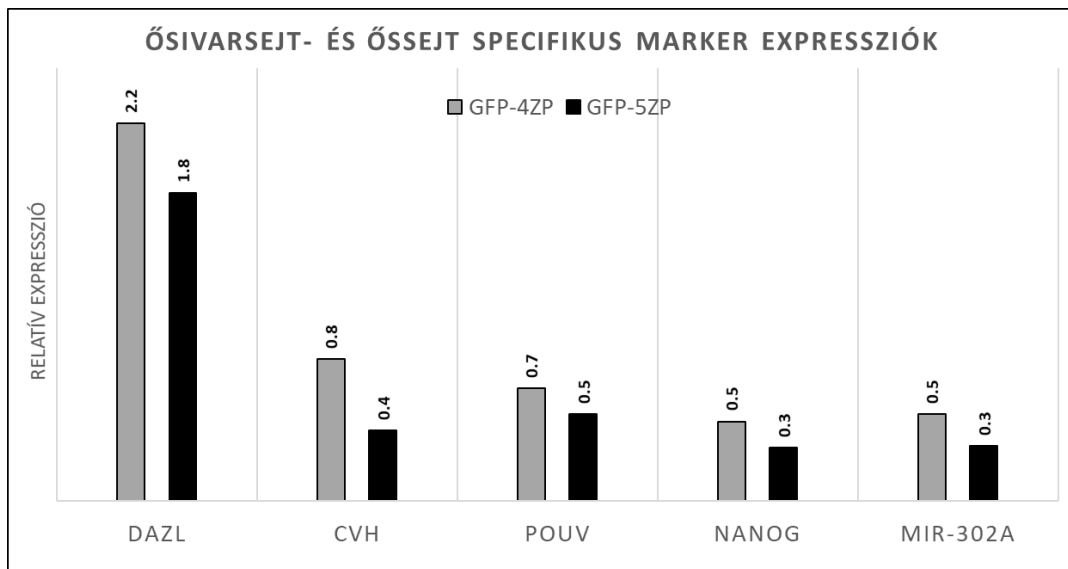
5.4.1. A tenyészetek ivarmeghatározása

Minden izolálás alkalmával szövetmintát gyűjtöttem az embriókból, amikből meghatároztam az ivarokat. Az összesen 19 izolált szövetmintából 6 (31,6%) bizonyult nőivarúnak és 13 (68,4%) hím ivarúnak (**6. táblázat**). A stabil tenyészetek ivari eloszlása szerint 8 (80%) hím és 2 (20%) nőstény vonalat sikerült alapítanom. Az alapítás után 2 hónappal, mikor már megfelelő mennyiségű sejt állt rendelkezésemre, a sejtvonalakból is visszaellenőriztem az ivarokat. A stabil tenyészetek ivari eloszlásából azt a konzekvenciát vonhatjuk le, hogy a PGC specifikus médium még egyelőre nem ugyanolyan hatékony mind a két ivar esetében.

5.4.2. Génexpressziós vizsgálatok eredményei

Kiválasztottam 2 nőstény és 2 hím ivarú ősvarsejt tenyészetet, melyen real-time qPCR segítségével lemértem az őssejt (*cPOUV*, *NANOG*, miR302a) és ősvarsejt (*CVH*, *DAZL*)

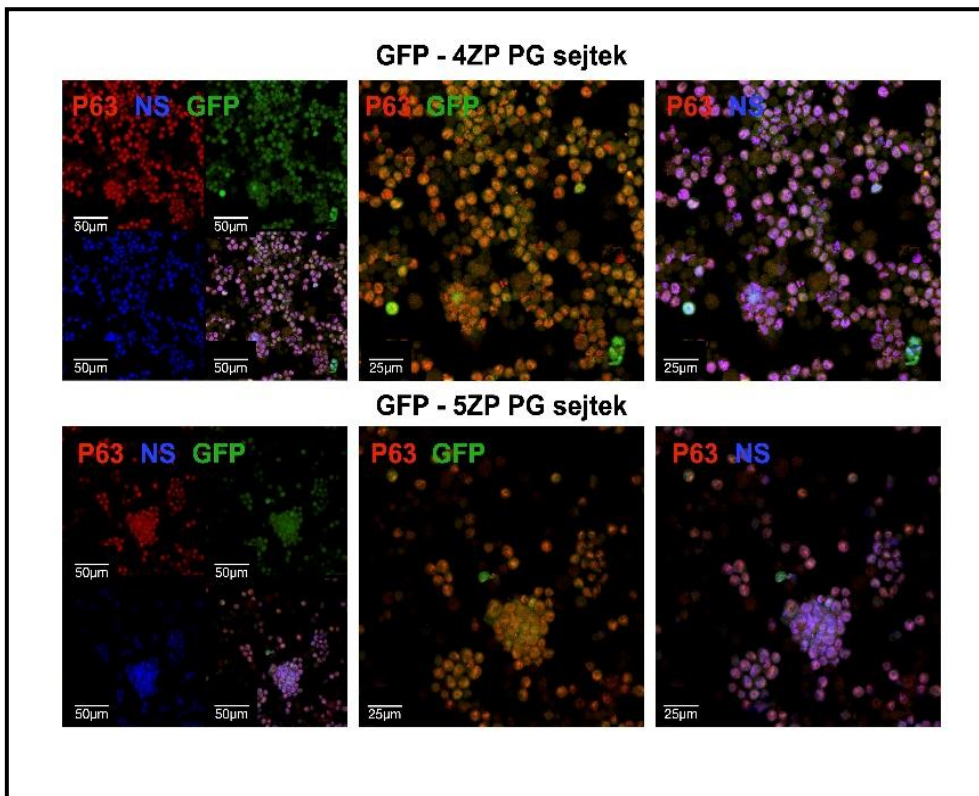
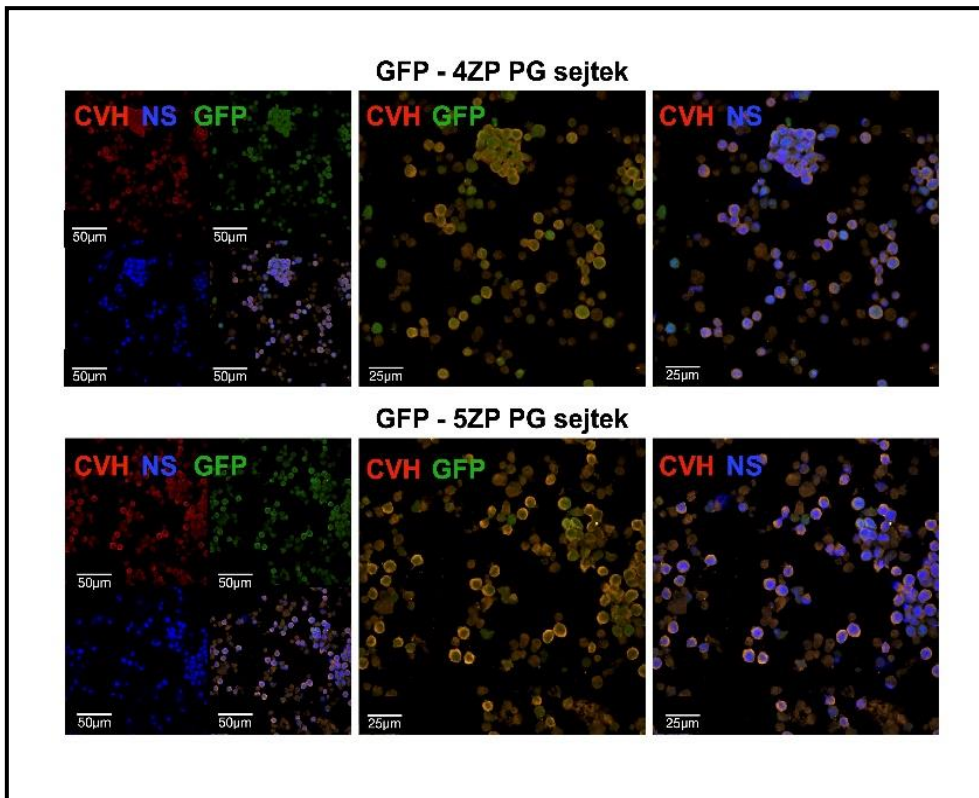
specifikus markerek expresszióját (**12. ábra**). Mind a négy sejtvonaltól esetében az összes marker relatív expressziós szintje magasnak bizonyult. A relatív expressziós értékek összehasonlításakor a *GAPDH*-t használtam referencia génként. Minden qPCR mérés része volt egy házityúk embrionális fibroblaszt (CEF) minta is, amely a plate-k eredményeinek összehasonlíthatóságát szolgálta. Minden markerre lemértem a CEF mintát is, viszont ezen markerek expressziós szintje jóval alacsonyabb volt, mint az ősvarsejt tenyészetekben. Referencia mintaként a 8ZP elnevezésű GFP-t expresszáló ősvarsejt vonal volt használva.



12. ábra: GFP-t expresszáló ősvarsejt tenyészetek kvantitatív real-time PCR-el mért relatív expressziós értékeinek ábrázolása. Referenciaminta a 8ZP GFP-PGC vonal volt.

5.4.3. Immunhisztokémiai vizsgálatok

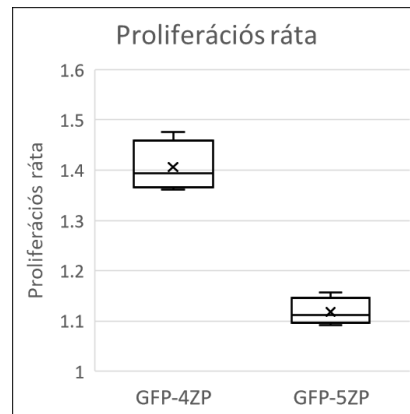
Két ősvarsejt vonalat választottam ki (4ZP= hím; 5ZP= nőstény), főképp az osztódási sebességük alapján, és ezeken immunhisztokémiai vizsgálatokat végeztem. Mindkét vonal esetében ősvarsejt (*CVH*, *P63*) és őssejt (*SSEA1*) specifikus festést végeztem, ahol mindkét tenyészet pozitív festődést mutatott (**13. ábra**). A *CVH* a citoplazmában expresszál, míg az *SSEA1* a sejtfelszínen található. Az immunhisztokémiai vizsgálatokat csak több lépésben tudtam elvégezni, mivel az ősvarsejtek expresszálják a GFP-t, így a zöld másodlagos ellenanyagot mellőznöm kellett, csak pirossal tudtam dolgozni. Ebből következően nem lehetett egy lépésben festeni mindkét fehérjét. Sejtmag festésként ToPro[®]-3 sejtmagfestéket használtam, ami a képeken kék színű.



13. ábra: A GFP-PGC injektálási kísérletben használt hím (4ZP) és nőstény (5ZP) ivarú ősvarsejt tenyészetek *CVH* (VASA) (felső képösszeállítás) és *P63* ősvarsejt specifikus (alsó képösszeállítás) ellenanyaggal való immunhisztokémiai jelölése.

5.4.4. Proliferációs vizsgálatok

A GFP-t expresszáló ősvarsejtek közül négy stabil vonal (4 ZP; 5 ZP; 6 ZP és 8ZP) proliferációs rátája lett meghatározva. A sejtek osztódási rátája jól reprezentálta az ősvarsejtekre jellemző értékeket. Fontos kiemelni, hogy a 4 ZP hím ivarú tenyészet kiemelkedően jó osztódási sebességgel rendelkezett. A **14. ábrán** láthatóak a proliferációs értékek.



14. ábra: 4ZP és 5ZP GFP-PGC proliferációs rátájának ábrázolása.

5.5. Fluoreszcensen jelölt ősvarsejt tenyészetek *in vivo* jellemzése

5.5.1. Visszainjektált ősvarsejtek integrációs hatékonysága embrióban

Három recipiens fajtát (sárga magyar, fehér magyar, fogolyszínű magyar) választottam ki, melyeknél vizsgáltam a bejuttatott GFP-t expresszáló ősvarsejtek integrációs hatékonyságát. Összesen 30 injektálási kísérletet végeztem. Minden fajta esetében 5-5 injektálási kísérlet történt 4 ZP (hím) és 5 ZP (nőstény) GFP-t expresszáló ősvarsejtekkel. Az injektálási kísérletekhez összesen 365 embriót használtam fel, melyből 241 (66,03%) élt túl. Nőstény ivarú (5ZP) GFP PGC-t 198 (54,25%) embrióba juttattam be, melyekből 132 (66,67%) embrió maradt életben. Összesen 58 (43,94%) ivarszervben találtam integrációt, ebből 26 (44,83%) hím ivarú és 32 (55,17%) nőivarú recipiens embrió volt. Az embriók ivarszervébe történő integrációs hatékonyságot az embrionális fejlődés 14. napján vizsgáltam.

Hím ivarú ősvarsejt (4ZP) esetében összesen 167 (45,75%) embrióba végeztem injektálást, melyekből 109 (65,27%) túlélte a beavatkozást. Az integráció sikerességét 58 embriónál tudtam meghatározni, ebből 28 (48,28%) hím embriónak és 30 (51,72%) tojó recipiens embriónak bizonyult. A részletes fajtákra lebontott adatokat az **7. táblázatban** szemléltetem. Szignifikánsan magasabb integrációs értéket kaptam a fogolyszínű magyar fajta esetében a

másik két fajttal szemben (Fogolyszínű-Fehér $p=0,0144$; Fogolyszínű-Sárga $p=0,0260$), amikor az 5 ZP nőstény sejt vonalat injektáltam (**16. ábra**). Az injektált embriók között a sárga magyar fajta túlélési rátája szignifikánsan alacsonyabb volt ($p=0,0176$), mint a fehér magyar fajtáé (**17. ábra**).

Említést érdemel, hogy a GFP-4ZP sejt vonal esetében igazolva lett, hogy képes gyöngytyúk ivarszervébe is integrálódni (Molnár et al., 2019).

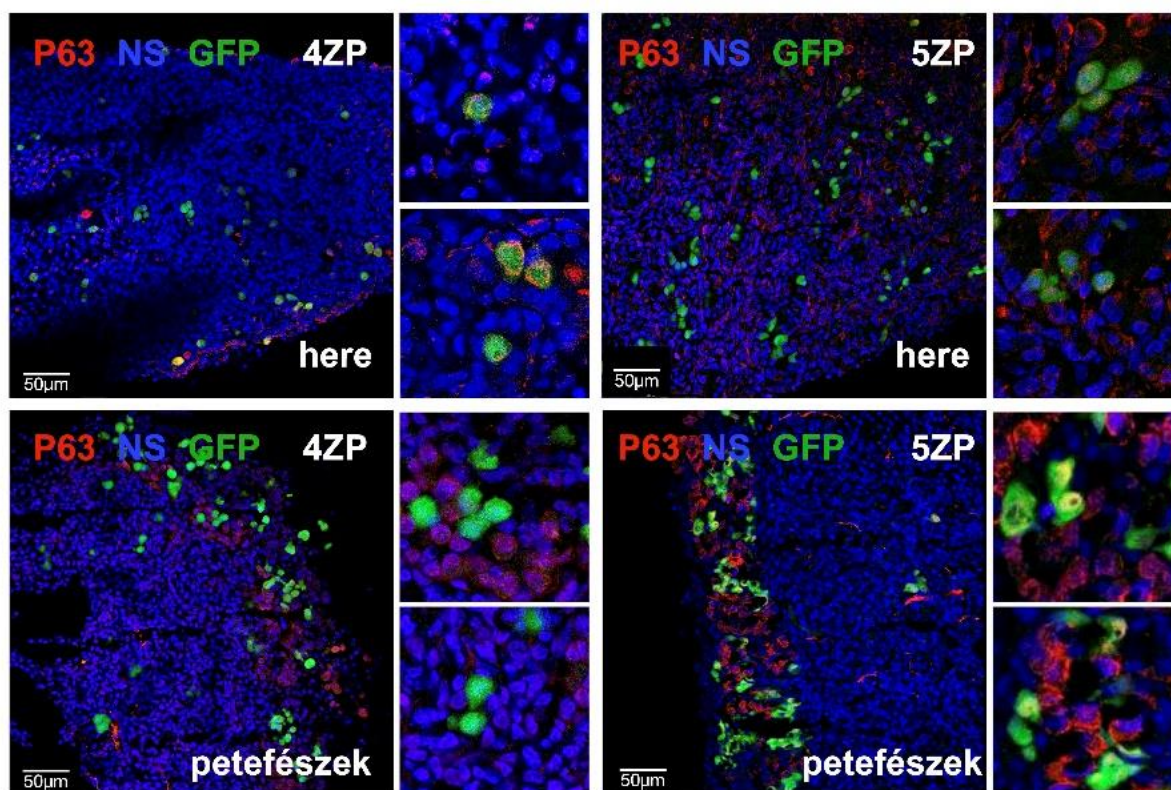
7. táblázat: Nőstény (5ZP) és hím (4ZP) GFP-t expresszáló ősvarsejt vonalak integrációs képességének vizsgálata. Recipientsnek három magyar fajtát használtam.

5 ZP PGC injektálása	Injektált embrió	Élő embriók száma	Kiméra ivarszervek	Hím recipiens	Nőstény recipiens
Fehér magyar	72	55 (76,39%)	19 (34,54%)	7	12
Fogolyszínű magyar	74	48 (64,86%)	30 (62,5%)	14	16
Sárga magyar	52	29 (55,77%)	9 (31,03%)	5	4
ÖSSZESEN	198	132 (66,67%)	58 (43,93%)	26	32

4 ZP PGC injektálása	Injektált embrió	Élő embriók száma	Kiméra ivarszervek	Hím recipiens	Nőstény recipiens
Fehér magyar	54	39 (72,22%)	21 (53,84%)	11	10
Fogolyszínű magyar	64	44 (68,75%)	22 (50,0%)	8	14
Sárga magyar	49	26 (53,06%)	15 (57,69%)	9	6
ÖSSZESEN	167	109 (65,27%)	58 (53,21%)	28	30

Mindkét ivarban tudtam igazolni immunhisztokémiai vizsgálatokkal az integrálódott GFP-PGC jelenlétét, továbbá a recipiens fajta ivarszervében lévő PGC-k festésével ősvarsejt arányokat is tudtam vizsgálni. Két ősvarsejt specifikus antitestet használtam (CVH, P63). A **15. ábrán** jól látható, hogy a petefészekben a PGC-k főként a *corticalis* részen található meg, míg herében a PGC integráció a *medullaris*, belső részen található herecsatornácskákban lokalizálódik.

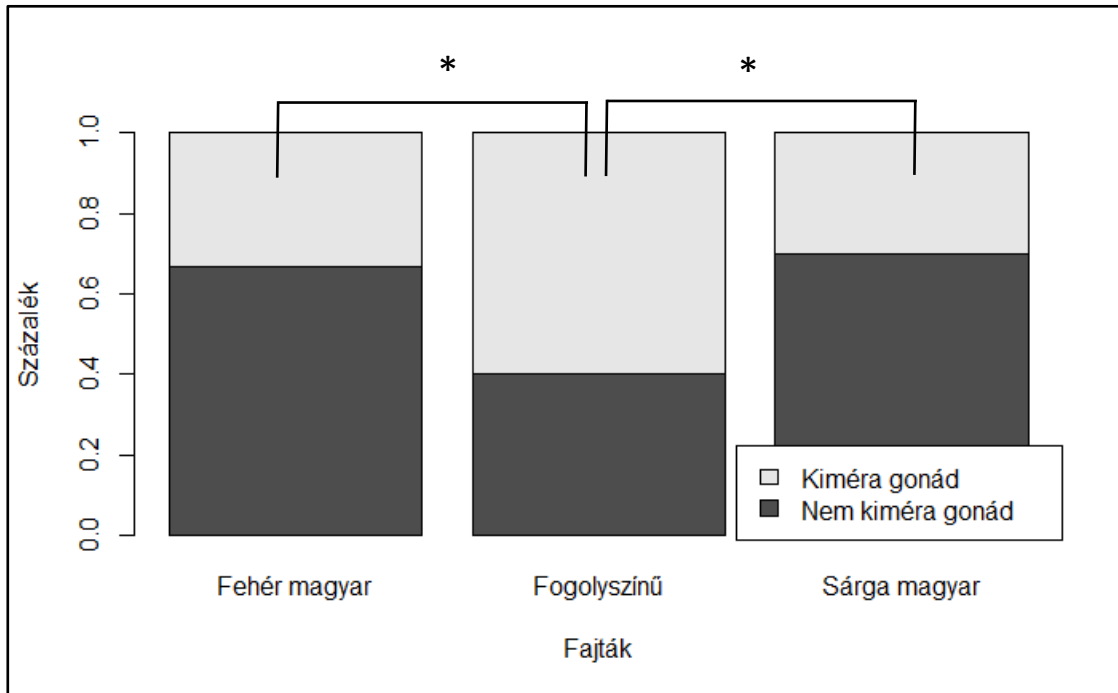
14 napos embriók ivarszerv metszetei



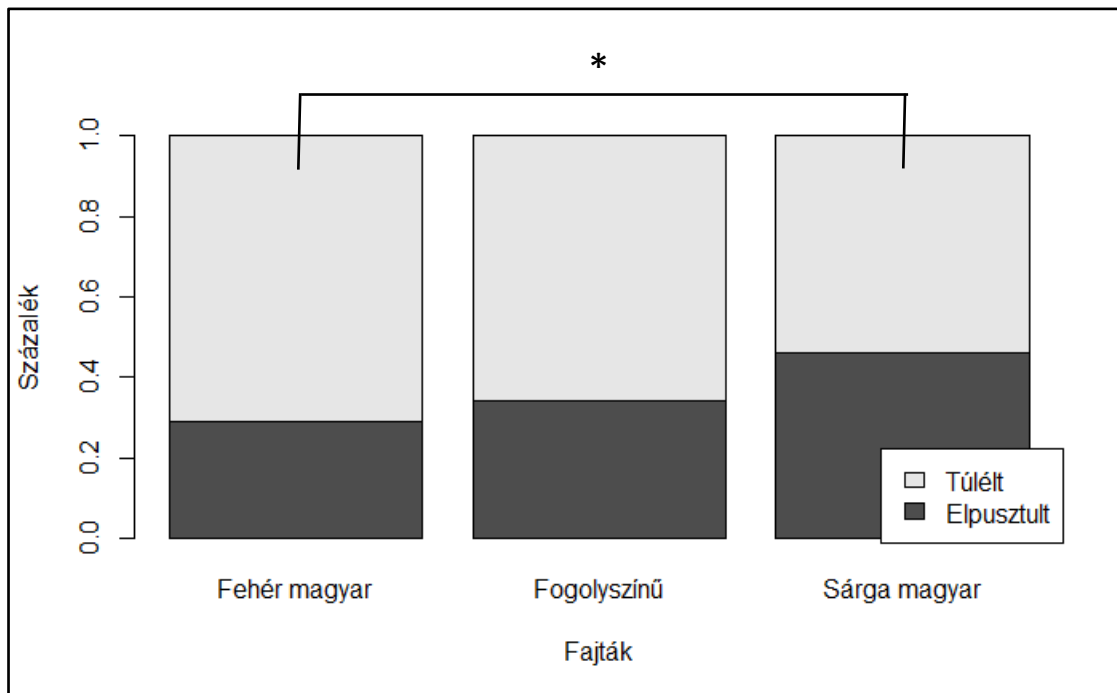
15. ábra: Az embrionális fejlődés 14. napján vizsgált házityúk embriók ivarszervében (here-petefészek) található GFP-PGC integráció immunhisztokémiai jelölése. Zöld színnel a GFP-PGC, pirossal P63 összejt specifikus antitest, késsel a sejtmagfestés (ToPro®-3) látható.

5.5.2. Visszainjektált ősvarsejtek integrációs hatékonysága kikelt csibében

Várhatóan a fehér magyar és fogolyszínű magyar fajtából egészséges, fenotípusosan semmilyen defektusban nem szenvedő állatok bújnak ki a tojásból. Mivel a transzgénikus organizmusokra vonatkozó szigorú engedélyekkel az Intézet nem rendelkezik, így kibújást követően 6 órával az állatokból kíméletes eutanáziával megtörtént az ivarszervek boncolása. Fehér magyar fajtából 5 csibét hím ivarú GFP-PGC-vel (4ZP) injektáltam és 4 csibét nőstény GFP-PGC-vel (5ZP), míg a fogolyszínű magyar fajtából 3 csibét engedünk kikelni, melyekbe nőstény ivarú GFP-PGC-t injektáltam. A **8. táblázatban** láthatók a kelési arányok, valamint a kiméra ivarszervvel rendelkező egyedek száma. Fehér magyar esetében hím ivarú PGC-vel történő injektálásakor 4 csibe bújt ki, nőstény PGC injektálásakor 2. Mind a két esetben kaptam kiméra ivarszervet. Fogolyszínű magyar fajtánál 3 csibét engedünk kikelni, ebből kettő kibújt a tojásból a harmadik, közvetlen kibújás előtt elhalt, viszont mind a három ivarszerv tartalmazta a GFP-t expresszáló ősvarsejteket.



16. ábra: Nőstény ivarú (5ZP) ősvarsejtek integrációjának vizsgálata, fehér magyar, fogolyszínű magyar és sárga magyar fajta esetében. Fogolyszínű magyar fajtánál szignifikánsabb több kiméra egyedeket kaptam, mint a másik két fajtánál. * < 0.05.

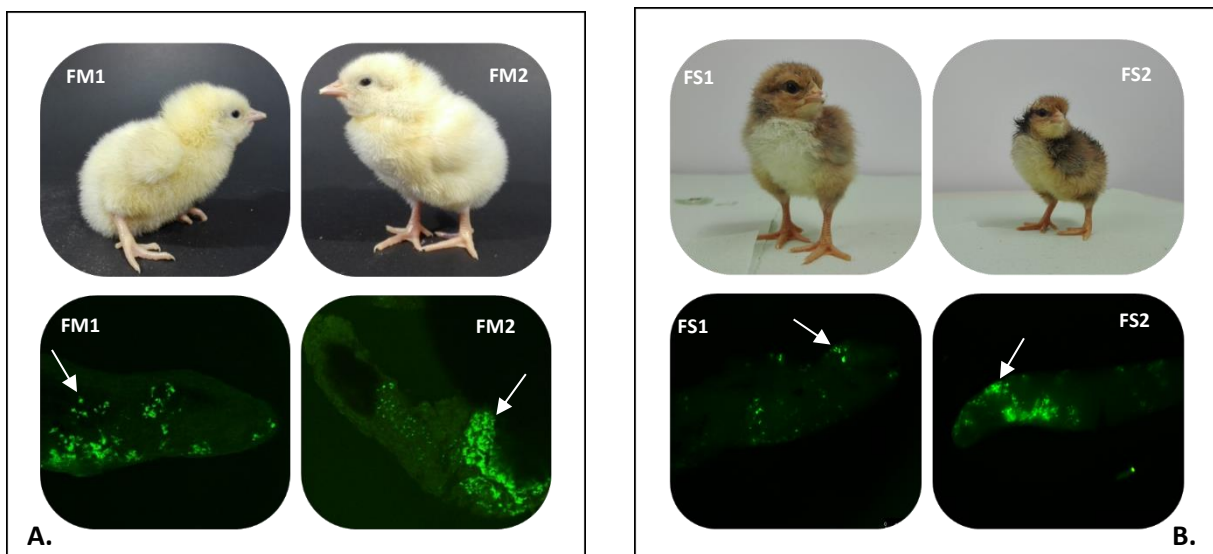


17. ábra: A GFP-PGC injektálást követő embrió túlélés három fajta esetében. A fehér magyar fajta szignifikánsan magasabb túlélési rátával rendelkezett, mint a sárga magyar fajta. * < 0.05.

8. táblázat: Kikelésig engedett fehér magyar és fogolyszínű magyar házityúk csibébe történt GFP-PGC injektálás eredményei.

	4ZP	5ZP	
Fajta	Fehér magyar	Fehér magyar	Fogolyszínű magyar
Kikelésig engedve	5	4	3
Kikelt csibe	4	2	2
Kiméra ivarszerv	1	1	3
Nőstény	1	0	1
Hím	0	1	2

A kikelt csibéken semmilyen fenotípusos defektust nem volt megfigyelhető. Összesen 5 ivarszervi kiméra csibe bújt ki a tojásból (**18. ábra**). 2 tojó és 3 hím ivarú recipiens. Nőstény ivarú GFP-PGC 1 nőstény (5ZP) és 3 hím recipiens ivarlécébe integrálódott, míg hím ivarú (4ZP) GFP-PGC esetén egy nőivarú recipienst kaptam.



18. ábra: Kikelt fehér magyar (A.) és fogolyszínű magyar (B.) házityúk csibék. Alsó sorban láthatók az integrálódott GFP-PGC-k nyilakkal jelölve, a recipiens ivarszervekben, a felső sorban a recipiens fajta 1 napos csibéje.

5.6 Új tudományos eredmények

- Megállapítottam, hogy az előzetesen hőkezelt tojó ivarú házityúk csibék ivarszervében a *HSP90* és a *HSF4* szignifikánsan erősebben expresszált a kezelést követően, mint a kontroll állatoknál, ellenben ivarérett korban a *HSF2* és *HSF3* expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kontroll állatoknál.
- Bizonyítottam, hogy ivarérett kakasok mindkét oldali ivarszervének esetében a *HSP70*, *HSF1* és *HSF3* expressziós szintje szignifikáns mértékben megemelkedett a hőkezelt állatokban a kontroll kakasokhoz viszonyítva.
- Hazánkban először sikeresen alapítottam GFP-t expresszáló házityúk embriókból ősvarsejt vonalakat, valamint igazoltam, hogy mind őssejt- mind pedig ősvarsejt specifikus markereket expresszálnak és ivarszervi kimérák létrehozására is alkalmasak.
- Megállapítottam, hogy az injektált GFP- 4ZP PGC-k integrációs aránya a vizsgált őshonos fajták esetében nem tért el. A fehér magyar és sárga magyar fajta esetében a 5ZP integrációs hatékonysága szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a fogolyszínű magyar fajtánál.
- PGC injektálást követően a sárga magyar fajta embriók esetében szignifikánsan alacsonyabb túlélési arányt kaptam, mint a fehér magyar fajta esetében.
- A 4ZP PGC injektálást követően közel azonos arányban kaptunk hím és nőivarú kiméra ivarszervet tartalmazó embriókat, viszont a GFP-5ZP PGC-k injektálása esetében a kiméra ivarszervet tartalmazó nőivarú embriók aránya magasabb volt. Fehér magyar recipiens esetében ez a különbség jelentős volt.
- Igazoltam, hogy mind a GFP-4ZP hím-, mind pedig a GFP-5ZP nőivarú PG sejtek a nőivarú és a hímivarú ivarszervbe is képesek integrálódni. A nőivarú GFP-5ZP PG sejtek nagy része a nőivarú recipiens gonádjában a funkció képes PGC-kre jellemző P63 expressziót mutatott

6. KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK

Napjaink egyik legjelentősebb problémája a globális felmelegedés. Ezen az emberiségre is nagy hatást gyakorló környezeti problémán sajnos csak hosszú idő alatt tudunk segíteni. Addig, amíg nem tudja az emberiség megállítani az évi középhőmérséklet emelkedését, majd vissza nem tudja fordítani az optimális tartományba, meg kell próbálni alkalmazkodni az extrém időjárási körülményekhez. Az extrém hőmérséklet nem csak az ember, hanem haszonnövények és a haszonállatok életét is megnehezíti. Túl a komfortzónán a termelékenység csökken, valamint az állat *fitness*-e is csökkenni kezd (Babinszky et al., 2011; Rath et al., 2015; Vandana et al., 2021). Ezeknek a negatív folyamatoknak az alaposabb megismerése lehetőséget teremt, hogy közvetett úton tudjuk védeni állatainkat, növényeinket a negatív hatástól. Számos tanulmány igazolta, hogy a hőstressz negatív hatást gyakorol a tojástermelésre, tojástömegre és a tojás minőségére (Emery et al., 1984; Magdi et al., 2004; Star et al., 2008).

Dolgozatomban ivarszerv vizsgálatokat végeztem házityúkon. Kendermagos erdélyi kopasznyakú fajta egyedeit hőkezeltük és az ivarszervekben bekövetkező változásokat vizsgáltam. Két fő csoportot, a hősokk fehérjék és hősokk faktorok expressziós szintjét mértem meg. Az ivarszervekben lévő ősvarsejtek utódsejtjei az érett ivarsejtek, melyek képesek átadni a következő generációnak az állatra jellemző teljes genetikai információt, így ezt a sejtípust is alaposabban megvizsgáltam.

A jelenlegi Haszonállat Génmegőrzési Intézetben már az 1990-es években végeztek hőkezelési kutatásokat (Molnár, 1990) Dr. Molnár Andrea és Dr. Liptói Krisztina vezetésével, mind liba, mind pedig kacsá vonatkozásában. Ezeknek a hőkezelési, hőkondicionálási eljárásoknak a tökéletesítése, más madárfajokra történő optimalizálására tett kísérleteket több tudományos folyóiratban (Liptói et al., Wang and Edens, 1998) és konferenciaközleményben már publikálták a HGI kutatói. A dolgozatomban ezen eljárások közül az egyik leghatékonyabbat vizsgáltam meg. A módszer hatására a génexpresszióban bekövetkező változások még nem kutattak. Eddig még nem vizsgálták ezen kezelés hatásának az utód generációkba történő átörökíthetőségét, így ezt is igazolni szeretnénk.

A hőkezelési kísérlethez alapul vettem Xie és munkatársai 2014-ben megjelent cikkét (Xie et al., 2014). Akut és krónikus hőkezelést végeztek brojler házityúkon. A hőhatások után két hősokk fehérjének és négy hősokk faktornak az expressziós szintjét mérték meg a szívizomban, a vázizomban és a májban. Akut hőstressz után mind a négy hősokk faktor expressziós szintje szignifikánsan megnövekedett a szívben. A *HSF1* expressziója nem változott a májban,

szemben a többi hősokk faktoral, amiknek kiemelkedően magas expressziójuk volt. A vázizomban a *HSF1* és *HSF4* expressziója alacsony volt, a másik két hősokkfaktor szintje nem emelkedett. A kezelt és kontroll állomány között nem tudtak szignifikáns különbséget detektálni egyik szervben sem a nyolc hetes krónikus hőstresszt követően.

Mashaly és munkatársai a hőstressz hatására megváltozó produktivitási paramétereket, valamint az immunválaszt vizsgálták. Három kezelési csoport paramétereit mérték le. Az első csoportban átlagos hőmérsékleten tartották az állatokat átlagos páratartalom mellett, a másodikban a napi ciklusnak megfelelően változtatták a hőmérsékletet és a páratartalmat is, a harmadik csoportba tartozó házityúkokat magas hőmérsékleten (35 °C) és alacsony páratartalom mellett tartották. A tojástermelésre, a tojásméretre és a tojánhéj vastagságra szignifikánsan rosszabb eredmény jött ki a hőstressznek kitett állatok esetében (Magdi et al., 2004). Az ivarérett kakasok heréjében megemelkedett hősokkfehérje és hősokkfaktor expressziót mutattak ki Wang és munkatársai Tajvanon honos házityúk fajtán (Wang et al., 2013). Az akut hőkezelést kapott kakasokat három csoportra osztották. Az első esetben a négy órás hőkezelés után közvetlenül vettek mintát az állatoktól, a második csoportban 2 óra pihentetés után, majd a harmadik csoport 6 óra rehabilitációs időt kapott mintavétel előtt. Microarray segítségével több mint 300 gén működését vizsgálták meg. Eredményeik alapján, 169 gén túlműködött, míg 140 gén expressziója csökkent.

Kang és munkatársai brojler csirkék előzetes hőkezelés eredményét vizsgálták ivarérett korban hőstressz esetén. Három csoportot különítettek el. A kontroll csoport nem kapott se hőkezelést, se hőstresszt. A második csoport csak 21 napos korban lett kitéve 35 °C-nak két héten keresztül, míg a harmadik csoport 5 naposan egy 24 órás 40 °C-os előzetes hőkezelést kapott, majd 21 napos korában ezt a csoportot is kitétték a 35 °C-os két hetes hőstressznek. A hősokk fehérjék expresszióját a szárnyvénából vett vérből, valamint májból állapították meg. A két hőstresszelt csoportnak az eredményei a *GAPDH* referencia génhez lettek normalizálva. *HSP70* és *HSP27* esetén találtak szignifikánsan magasabb expressziót az előzetesen hőkezelt és hőstresszelt csoportban a kontrollhoz viszonyítva, továbbá a *HSP70* expressziója szignifikánsan magasabb volt, mint a csak hőstresszt kapott állatoknál. A *HSP60* és *HSF3* expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a hőstresszt kapott állatoknál, mint a kontroll csoportban (Kang et al., 2019).

Tamzil és munkatársai három házityúk fajta több genotípusán vizsgálták a hőstressz okozta változásokat. Kampong házityúkból 7 genotípust (Malajziai őshonos fajta), Arab házityúkból 6 genotípust és négy brojler vonalat hasonlítottak össze. A legmagasabb *HSP70* expressziót (emellett, kortikoszteron koncentrációt is) az őshonos fajta egyik genotípusában mérték, míg a

legalacsonyabbnak az arab fajta egyik genotípusa bizonyult. A házityúk lihegését (hiperventillációját) is mérték, mely során azt kapták, hogy az őshonos fajta zihálása volt a leglassabb, míg az arab fajta lihegett a legjobban (Tamzil et al., 2013).

Anand és munkatársai kendermagos erdélyi kopasznyakú állományt hőkezelték. Három csoportban vizsgálták a hőkezelés eredményét. A kontroll csoportot átlagos környezeti hőmérsékleten tartották, a hőkezelt csoport 38,5 °C-on két napos korban 12 órán keresztül, majd ivarérett korban 30 °C-os hőstressznek volt kitéve 12 héten keresztül. A harmadik csoport nem kapott előzetes hőkondicionálást, csak a 30 °C-os 12 héten keresztül tartó hőstresszt. Az F2 generáció embrióiból vérvétellel PGC tenyészeteket alapítottak, valamint az embrionális fejlődés 10. napján az ivarszerveket kiboncolták és abból *HSP70* expressziós mintázatot vizsgáltak. Az előzetesen hőkezelt és hőstresszelt, valamint a csak hőstressznek kitétt állatokból származó ivarszervekben magasabb *HSP70* expressziót mutattak ki mint a kontroll csoportban, de ez nem minősült szignifikáns eredménynek (Anand et al., 2016).

Az ősvarsejtek alaposabb tanulmányozása Van de Lavoir és munkatársai által kifejlesztett tenyésztőmédiüm létrehozását követően vált kiemelt jelentőségű kutatási témává (van de Lavoir et al., 2012). Az előző évtizedben számos publikáció megjelent az ősvarsejtek alapításával, tenyésztésével és karakterizálásával kapcsolatban (Rikimaru et al., 2011; Tonus et al., 2016; Wang et al., 2017; Yu et al., 2019). A jelenleg használatban lévő legjobb tenyésztőmédiüm, mely a nőstény ivarú PGC tenyészetek fenntartását is támogatja tápláló sejtek nélkül Whyte és munkatársai nevéhez fűződik (Whyte et al., 2015).

Yu és munkatársai kínai meiling házityúk fajtából izolált ősvarsejteket, valamint jellemezte őket immunhisztokémiai festéssel. A HH14-16 közötti fejlődési stádiumban lévő embriókból izolált vérből Nycodenz gradiens centrifugálást követően kitisztították az ősvarsejteket, majd ezekből alapítottak sejtvonalat. Az ősvarsejt vonalakon real-time PCR segítségével ősvarsejt specifikus marker expressziós szinteket vizsgáltak (*DAZZL*, *CVH*). A karakterizált ősvarsejteket PKH26 festékkel jelölték, majd visszainjektálták recipiens brojler fajta dorzális aortájába. Négy ivarérett kakast hoztak létre, melyeket visszakereszteztek az eredeti meiling fajtával. Összesen 12,6 %-ban kaptak eredeti donor fajtájú utódokat (Yu et al., 2019).

A recipiens fajtába történő integráció jobb nyomon követhetősége érdekében fluoreszcensen jelölt ősvarsejt vonalakat állítottak elő. Ezekkel a világító ősvarsejtekkel lehetett jobban vizsgálni a bejuttatott PGC-k integrációját az ivarszervbe. Park és munkatársai piggyBac transzpozon konstrukcióval transzfektáltak ősvarsejteket házityúk és fűrj fajban. Az előállított sejtvonalak karakterizálása után a GFP-t expresszáló PGC-ket visszainjektálták recipiens

fajtába. Összesen az F2 generációban 459 kikelt csibe közül 228 (52,2%) állat expresszáta a GFP-t (Park and Han, 2012). Macdonald és munkatársai ősvarsejteket izoláltak GFP-t expresszáló embriókból, majd ezeket visszainjektálták recipiens fajta vérkeringésébe. Összesen 26 embrióba injektáltak hím ivarú GFP-t expresszáló ősvarsejtekkel, melyből 12 (46,15%) embrió élte túl a beavatkozást. A transzgénikus túlélő kakasokat felnevelték, majd vizsgálták a spermatológiai tulajdonságaikat. A hím transzgénikus kakasok visszakeresztése nem transzgénikus tyúkokkal 2-16 % közötti transzgénikus utódot eredményezett. A tojó transzgénikus tyúkokat visszakeresztették nem transzgénikus kakasokkal és 0%-ban kaptak transzgénikus utódokat. Az ivarszervek vizsgálata után a petefészekben nem találtak GFP pozitív sejteket. Ebből arra a következtetésre jutottak, hogy a hím ivarú PGC-k hím recipiensben funkcionálisan aktívak maradnak, míg tojó állatoknál az oogenezis folyamán eliminálódnak a petefészekből (Macdonald et al., 2010).

A nőstény ivarú PGC-k visszainjektálását Tagami és munkatársai végezték el. White Leghorn fajtából izoláltak PGC-t és ezeket juttatták vissza Barred Plymouth Rock fajtába, valamint fordítva is. A kimérák előállítására 4,9 és 77,6% közötti hatékonysággal sikerült. Kevert ivarú ősvarsejteket injektáltak vissza a recipiens fajtába, majd a kibújt csibék közül a kakasokat kiválogatták és spermatológiai vizsgálatot végeztek rajtuk. Egy W-kromoszóma szekvenciára specifikus régiót találtak Southern-hibridizáció segítségével a kiméra kakasok spermiumai között. Ez arra enged következtetni, hogy nőstény ivarú PGC-k hím ivarú recipiens fajta ivarszervében képesek a spermatogenezis folyamatába bekapcsolódni s érett spermiumokat termelni, ám a legtöbb nőivarú PGC nem képes spermatozoává differenciálódni (Tagami et al., 1997).

A dolgozatban leírt hőkezelési eljárás pozitív hatást váltott ki kendermagos erdélyi kopasznyakú fajta esetében, melyet igazoltam molekuláris biológiai módszerekkel. A HSP és HSF expressziós értékek összehasonlítását nem tudtam elvégezni, mert irodalmi adatok nem állnak rendelkezésre. Előzetes hőkezelés nélkül hőstressznek kitett házityúkoknál az ivarszervekben végbemenő molekuláris változásokat több kutatócsoport is vizsgálta (Xie et al., 2014; Zhang et al., 2014; Kang et al., 2019). Eredményeik jól összevethetők az általam kapott közvetlen hőkezelés után történő vizsgálatok eredményeivel.

A GFP-t expresszáló ősvarsejtek alapítási rátája 52,62% volt, ami jól megfeleltethető az irodalomban fellelhető PGC alapítási eredményekkel (Vantress heritage fajta: 40-56%; White Leghorn fajta: 49-82%; sárga magyar fajta: 50%; fehér magyar fajta 47,6%) (Nandi et al., 2016; Woodcock et al., 2019; Lázár et al., 2021). Az alapított sejt vonalakat ősvarsejt specifikus és őssejt specifikus markerekkel (*SSEA1*, *CVH*, *DAZL*, *P63*) történő karakterizálási eljárással

elemeztem, melyek az irodalomban fellelhető eredményekkel jó egyezést mutatnak (Tonus et al., 2016; Lázár et al., 2018, 2021; Yu et al., 2019).

A GFP-t expresszáló ősvarsejtek injektálási eredményei mind túlélésben, mind ivarszervi kiméra előállításban tükrözik az irodalomban megtalálható adatokat (Macdonald et al., 2012; Park and Han, 2012). Az általam injektált hím és nőstény ivarú GFP-PG sejtek integrációja hím és tojó recipiens embrióban hasonló eredményeket adott, mint amire Macdonald és munkatársai, valamint Tagami és munkatársai jutottak. Mind a két ivar esetében találtam integrációt, és immunhisztokémiai vizsgálatokkal az embrionális fejlődés 14. napján az ivarszervben meg tudtam határozni azokat a PG sejteket, melyek valószínűsíthetően az ivarérett állat ivarsejtjeinek képzésére alkalmasak lesznek. A házityúk génszerkesztési eljárások területén csoportunk a közelmúltban kezdte meg a szükséges technikák és tudás elsajátítását. Másfél évvel ezelőtt volt szerencsém egy ERASMUS ösztöndíj támogatásával kiutazni Németországba, Wilfried Kues professzor laboratóriumába, ahol megtanulhattam transzgénikus technikák alkalmazását. A „Sleeping Beauty” transzpozon/transzpozáz rendszert alkalmazva házityúk ősvarsejtbe Vénusz riporter gént vittünk be. Ezen felül CRISPR/Cas9 vektort terveztünk a Dmrt1 gén kiütésére, így lehetőségem volt ennek a genomszerkesztési eljárásnak az elsajátítására is. Hazatérve sikerült a megszerzett tudás alkalmazásával Vénusz pozitív PGC-eket létrehoznom. A továbbiakban tervezzük, hogy bevezetjük az ősvarsejtben a genomeditálás módszerének rutin szintű alkalmazását. A hőkezeléshez kapcsolódóan egyelőre nem tervezzük a genom módosítási technikát alkalmazni.

6.1 Javaslatok

A hőkezelési eljárásokkal általánosan javítható az állatok hőtoleranciája. A dolgozatomban leírt hőkezelési eljárás sikerrel alkalmazható lehet nagyüzemi gazdaságok számára, hogy a nyári kánikulában a napi tojástermelés, valamint a termékenység ráta ne csökkenjen.

Kutatásomban széles körben vizsgáltam a házityúk ivarszervre ható faktorok expressziós szintjét real-time qPCR-t alkalmazva. Közvetlenül hőkezelést követően a házityúk ivarszervében a hősokk fehérjék (HSP) és hősokk faktorok (HSF) expressziós szintje megváltozik. Ezeknek a változásoknak a meglétét igyekeztem igazolni ivarérett házityúkoknál. Az ivarszervben található ősvarsejtben a megmaradó változások, melyek erősen konzerválódtak a genomban, átadódnak az utód generáció számára is. Erre az információ átadásra az ősvarsejt, vagy PGC-k képesek, ezért fontosnak tartottam ezeknek a sejteknek a részletesebb megismerését. A dolgozatban alkalmazott hőkezelési eljárás és az előzetes kísérleti

eredmények egy sikeres francia magyar TÉT pályázat elindítását tették lehetővé témavezetőm Dr. Gócza Elen és az NBGK-HGI tudományos főmunkatársai Dr. Liptói Krisztina és Dr. Várkonyi Eszter részvételével. A pályázat keretében a hőkezelési kísérletből származó PGC tenyészetek epigenetikai és RNS szekvenálási elemzésére kerül sor

Ha a kapott RNS szekvenálási eredményeinket sikerül qPCR vizsgálatokkal is megerősíteni, akkor a hőkezelés hatására megváltozott RNS expressziót mutató gének esetében érdemes lesz western blottal, illetve immunfestéssel is igazolni, hogy fehérje szinten is megjelent-e ez a változás. Esetleg fehérje aktivitási vizsgálatokat is lehetne végezni ezekben az esetekben.

A PGC vonalaink epigenetikai vizsgálata is folyamatban van a lyoni INSERM munkatársaival együttműködve. Amennyiben bebizonyosodik az, hogy PGC-ken keresztül átörökíthető lesz ez a szerzett tulajdonság, ez valószínűleg felkelti a nagyüzemi állattartók figyelmét is. Minél forróbbak a nyarak, annál nagyobb jelentősége lesz ezeknek az egyszerű előzetes hőkezelési eljárásoknak, mert nem csak produktivitási, de *fitness* növekedési hatással is bír. Ennek segítségével az extrém magas környezeti hőmérsékletet is el tudják viselni az állatok.

A házityúk ősvarsejtek tenyésztése napjainkban már megoldott. Az optimális recipiens fajta megtalálása a jövő fontos feladata, segítségével az injektálás során a mortalitás csökkenhet, továbbá magasabb integrációs arány érhető el, amely akár veszélyeztetett fajok, fajták egyedeinek visszanyerésében is segíthet. További fontos cél, hogy egy adott genetikai módosulás (pl. hőtolerancia) az ősvarsejtekkel sikeresen átadható legyen egy recipiens fajtának, így annak utódait keresztezve olyan egyedek jöhetnek létre, melynek sejtjei tartalmazzák a kívánt módosulást.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A XXI. század derekán már jól érezhető az emberi tevékenység hatása a Földön. Klímánk állapota jelentősen romlott, az átlagos évi középhőmérséklet már lassan 1,5 °C-al meghaladja a XX. század elején mért átlagos középhőmérsékletet. Használatainknak meg kell küzdeniük ezzel a negatív hatással, ami produktivitásuk csökkenését is okozza. Dolgozatomban egy előzetesen kidolgozott hőkezelési eljárást alkalmaztam, kendermagos erdélyi kopasznyakú házityúk fajtán. Az előzetesen rendelkezésre álló házityúk termelési eredményeket hasonlítottam össze a hőkezelés hatására aktiválódó hősokk fehérjék (HSP) és hősokk faktorok (HSF) expressziós szintjének változásával az ivarszervben. Megállapítottam, hogy közvetlenül hőkezelés után a kezelt nőivarú csibék *HSP90* és *HSF4* expressziós szintje szignifikánsan magasabb volt, mint kontroll társaiké. Bebizonyítottam, hogy az ivarérett előzetes hőkezelésen átesett tojók petefészkében a *HSF2* és *HSF3* markerek expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb, mint a kontroll tojóknál. A kakasok esetében közvetlenül hőkezelés után nem tudtam kimutatni változást, viszont ivarérett egyedek heréjében a *HSP70*, *HSF1* és *HSF3* expressziós szintje szignifikáns emelkedést mutatott a kontroll kakasokhoz viszonyítva. Az ivarszervben bekövetkezett változások miatt, az ősvarsejtek részletes megismerését is fontos feladatommak tartottam, mivel ezek prekursor sejtjei az érett ivarsejteknek, melyek képesek az egész genetikai anyag átadására a következő generációnak. Napjainkban az ősvarsejtek izolálása, hosszú távú fenntartása már megoldott. Az ideális recipiens fajta megtalálására irányuló kutatások még igényelnek további kísérleteket. Ebből kiindulva sikeresen alapítottam GFP-t expresszáló embrióból 10 ősvarsejt tenyészetet, melyeket real-time qPCR és immunhisztokémiai módszer segítségével is karakterizáltam. Az integrációs képességet három őshonos magyar fajtán teszteltem (fehér magyar, fogolyszínű magyar és sárga magyar). Eredményeim alapján elmondhatom, hogy az injektálást szignifikánsan jobban tolerálta a fehér magyar fajta, mint a sárga magyar. Ezzel párhuzamosan a fogolyszínű magyar fajta esetében szignifikánsan magasabb arányban kaptam transzgénikus kiméra ivarszervvel rendelkező embriókat, nőivarú GFP-t expresszáló ősvarsejtek injektálása alkalmával, mint sárga magyar vagy fehér magyar fajta esetében. Eredményeim alapján ideális recipiens házityúk fajtának a fogolyszínű magyar fajtát javasolnám, az injektálási módszer fejlesztése mellett, valamint a kopasznyakú magyar fajták bevonása a keresésbe hasznos adatokat szolgáltatna a legjobb recipiens házityúk megtalálásához.

8. SUMMARY

At the beginning of the XXI. century the anthropogenic effects are very drastic on Earth. The status of the climate is in danger and the yearly average temperature have been rising. Right now, it is almost 2 °C warmer than in 1910. This negative effect is a stressor for the agriculture and the animal husbandry too. In my thesis, I used heat treatment in case of the Transylvanian Naked-neck chicken breed, because previous experiments showed positive results of heat treatment (HT) and heat treatment combined with heat stress (HTHS) on egg production and on spermatological parameters. In my research, I used the same heat treatment on two days old chickens. Directly after heat treatment and in adult chickens, I determined the heat shock protein (HSP) and heat shock factor (HSF) expression levels, both in control and in heat treated gonads. I found that the *HSP90* and *HSF4* expression levels are significantly higher in the heat-treated group compared to control in case of female chicks. I showed that the ovary of the adult female chickens had significantly lower *HSF2* and *HSF3* expression than the control counterpart. In case of roosters, directly after heat treatment I couldn't find any difference between the two investigated groups. However, in adult birds the *HSP70*, *HSF1* and *HSF3* expression in the testes were significantly higher in heat-treated groups than in control. Alterations which happen in the gonads might pass on to the next generation through the primordial germ cells (PGCs) because these cells are the precursors of the gametes. Nowadays, the isolation and long-term cultivation of PGCs are already solved, nevertheless additional experiments are needed to find the ideal recipient breed. I determined the integration rate of GFP-expressing PGC in three different native Hungarian poultry breeds (White Hungarian, Partridge-colour Hungarian and Yellow Hungarian). At the beginning of the research, I successfully established GFP-expressing PGC lines and I characterized them *in vitro* and *in vivo*. The results showed that the White Hungarian breed had significantly higher tolerance for the injection than the Yellow Hungarian breed. I had significantly higher ratio of transgenic gonadal chimera embryos in case of the Partridge-colour breed when I injected 5ZP female GFP-PGC line, than in the other two chicken breeds. Based on my results, I recommend the Partridge-colour Hungarian breed as an ideal host. The injection method needs to be further developed to be more precise. I also recommend to use in experiments the Naked-neck chicken breeds as recipient, as recently we could get gonadal chimera in this species.

9. MELLÉKLETEK

9.1 1.számú melléklet (M1)

Hivatkozás jegyzék

- Abane, R., and V. Mezger. 2010. Roles of heat shock factors in gametogenesis and development. *FEBS J.* 277:4150–4172 Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1742-4658.2010.07830.x> (verified 31 March 2022).
- Akazome, Y., T. Abe, and T. Mori. 2002. Differentiation of chicken gonad as an endocrine organ: Expression of LH receptor, FSH receptor, cytochrome P450c17 and aromatase genes. *Reproduction* 123:721–728 Available at <https://rep.bioscientifica.com/view/journals/rep/123/5/721.xml> (verified 27 March 2022).
- Åkerfelt, M., R. I. Morimoto, and L. Sistonen. 2010. Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:545–555 Available at </pmc/articles/PMC3402356/> (verified 30 March 2022).
- Al-Rubika, R. K., M. B. Al-Zghoul, W. Hananeh, M. Q. Al-Natour, and E. A. Abu-Basha. 2017. Thermal manipulation during late embryogenesis: Effect on body weight and temperature, thyroid hormones, and differential white blood cell counts in Broiler chickens. *Poult. Sci.* 96:234–240 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27587725-thermal-manipulation-during-late-embryogenesis-effect-on-body-weight-and-temperature-thyroid-hormones-and-differential-white-blood-cell-counts-in-broiler-chickens/>.
- Al-Zghoul, M. B., and S. M. El-Bahr. 2019. Thermal manipulation of the broilers embryos: Expression of muscle markers genes and weights of body and internal organs during embryonic and post-hatch days. *BMC Vet. Res.* 15.
- Al-zhgoul, M., S. Elhafeed, Abd Dalab, M. M. Ababneh, K. I. Jawasreh, A. Ahmed, Khalid Busadah, and Z. I. Bani. 2013. Research in veterinary science thermal manipulation during chicken embryogenesis results in enhanced Hsp70 gene expression and the acquisition of thermotolerance. *Res. Vet. Sci.* 95:502–507 Available at <http://dx.doi.org/10.1016/j.rvsc.2013.05.012>.
- Anand, M., R. Toth, K. S. Alayu, A. Nagy, B. Lázár, E. Patakine-Varkonyi, K. Liptói, and E. Gócza. 2016. Examination the Expression Pattern of HSP70 Heat Shock Protein in Chicken PGCs and Developing Genital Ridge. *Sci. Pap. Anim. Sci. Biotechnol.* 49:78–82 Available at https://www.researchgate.net/publication/304134338_Examination_the_Expression_Pattern_of_HSP70_Heat_Shock_Protein_in_Chicken_PGCs_and_Developing_Genital_Ridge (verified 26 March 2022).
- Andersson, L., and M. Georges. 2004. Domestic-animal genomics: Deciphering the genetics of complex traits. *Nat. Rev. Genet.* 5:202–212.
- Araya, A., P. V. V. Prasad, Z. Zambreski, P. H. Gowda, I. Ciampitti, Y. Assefa, and A. Girma. 2020. Spatial analysis of the impact of climate change factors and adaptation strategies on productivity of wheat in Ethiopia. *Sci. Total Environ.* 731:139094

Available at <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0048969720326115> (verified 19 May 2020).

- Arjona, A. A., D. M. Denbow, and W. D. Weaver. 1988. Effect of heat stress early in life on mortality of broilers exposed to high environmental temperatures just prior to marketing. *Poult. Sci.* 67:226–231 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3380769/> (verified 30 March 2022).
- Babinszky, L., V. Halas, and M. W.A. 2011. Impacts of climate change on animal production and quality of animal food products. In *Climate Change - Socioeconomic Effects*. InTech.
- Bakst, M. R., G. Wishart, and J.-P. Brillard. 1994. Oviducal sperm selection, transport, and storage in poultry. *Poult. Sci. Rev.* 5:117–143 Available at https://www.researchgate.net/profile/Murray_Bakst/publication/221962421_Oviducal_sperm_selection_transport_and_storage_in_poultry/links/56964ae808ae34f3cf1d8b23.pdf.
- Birkhead, T. R., and A. P. Moller. 1992. Numbers and size of sperm storage tubules and the duration of sperm storage in birds: a comparative study. *Biol. J. Linn. Soc.* 45:363–372 Available at <https://academic.oup.com/biolinnean/article-lookup/doi/10.1111/j.1095-8312.1992.tb00649.x> (verified 28 March 2022).
- Bordas, A., P. Mérat, D. Sergent, F. Ricard, G. Coquerelle, and G. Marche. 1978. Influence du gène Na (« Cou-nu ») sur la croissance, la consommation alimentaire et la composition corporelle du poulet selon la température ambiante. *Genet. Sel. Evol.* 10:209 Available at <http://www.gsejournal.org/content/10/2/209> (verified 31 March 2022).
- Cedraz, H., J. G. G. Gracielle, A. A. P. J. Garcia, R. V. F. Filho, T. M. Souza, E. de O. Ribeiro, E. de O. Bonfim, C. do N. Souza, C. Meneghetti, and A. A. Wenceslau. 2017. Heat stress induces expression of HSP genes in genetically divergent chickens. *PLoS One* 12 Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29020081>.
- 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 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7742779/> (verified 29 March 2022).
- Cheng, C. Y., W. L. Tu, S. H. Wang, P. C. Tang, C. F. Chen, H. H. Chen, Y. P. Lee, S. E. Chen, and S. Y. Huang. 2015. Annotation of differential gene expression in small yellow follicles of a broiler-type strain of Taiwan country chickens in response to acute heat stress. *PLoS One* 10 Available at <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0143418>.
- Chojnacka-Puchta, L., D. Sawicka, P. Lakota, G. Plucienniczak, M. Bednarczyk, and A. Plucienniczak. 2015. Obtaining chicken primordial germ cells used for gene transfer: in vitro and in vivo results. *J. Appl. Genet.* 56:493–504 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25737138/> (verified 30 March 2022).
- Clawson, R. C., and L. V. Domm. 1969. Origin and early migration of primordial germ cells in the chick embryo: A study of the stages definitive primitive streak through eight somites. *Am. J. Anat.* 125:87–111.
- Collin, A., M. Picard, and S. Yahav. 2005. The effect of duration of thermal manipulation during broiler chick embryogenesis on body weight and body temperature of post-hatched chicks. *Anim. Res.* 54:105–111 Available at <http://www.edpsciences.org/10.1051/animres:2005004> (verified 30 March 2022).

- 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 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27896535/> (verified 30 March 2022).
- Decuypere, E. 1984. Incubation temperature in relation to postnatal performance in chickens. undefined.
- Donald D. Bell; William, D. W. 2002. *Commercial Chicken Meat and Egg Production*. Springer US.
- Ehrnsperger, M., S. Gräber, M. Gaestel, and J. Buchner. 1997. Binding of non-native protein to Hsp25 during heat shock creates a reservoir of folding intermediates for reactivation. *EMBO J.* 16:221–229 Available at </pmc/articles/PMC1169629/?report=abstract> (verified 31 March 2022).
- Emery, D. A., P. Vohra, R. A. Ernst, and S. R. Morrison. 1984. The effect of cyclic and constant ambient temperatures on feed consumption, egg production, egg weight, and shell thickness of hens. *Poult. Sci.* 63:2027–2035 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6494103/> (verified 31 March 2022).
- Estermann, M. A., A. T. Major, and C. A. Smith. 2021. Genetic regulation of avian testis development. *Genes (Basel)*. 12 Available at </pmc/articles/PMC8470383/> (verified 27 March 2022).
- Eyal-Giladi, H., and S. Kochav. 1976. From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology. *Dev. Biol.* 49:321–37 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/944662> (verified 13 June 2017).
- Feder, M. E., and G. E. Hofmann. 1999. Heat-shock proteins, molecular chaperones, and the stress response: Evolutionary and Ecological Physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61:243–282 Available at http://www.jstor.org/stable/23496643?seq=1#page_scan_tab_contents (verified 19 May 2020).
- Fujimoto, M., and A. Nakai. 2010. The heat shock factor family and adaptation to proteotoxic stress. *FEBS J.* 277:4112–4125 Available at <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1742-4658.2010.07827.x>.
- 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 Available at <http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1091850203>.
- Gabriel, J. E., J. A. Ferro, R. M. P. Stefani, M. I. T. Ferro, S. L. Gomes, and M. Macari. 1996. Effect of acute heat stress on heat shock protein 70 messenger RNA and on heat shock protein expression in the liver of broilers. *Br. Poult. Sci.* 37:443–449 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8773853/> (verified 31 March 2022).
- Genest, O., S. Wickner, and S. M. Doyle. 2019. Hsp90 and Hsp70 chaperons: Collaborators in protein remodelling. *J. Biol. Chem.* 294 Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30401745>.
- Gitau Gicheha, M. 2021. The Effects of Heat Stress on Production, Reproduction, Health in Chicken and Its Dietary Amelioration. in *Advances in Poultry Nutrition Research*. IntechOpen.

- Gregory, N. G. 2010. How climatic changes could affect meat quality. *Food Res. Int.* 43:1866–1873.
- 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.
- Guioli, S., S. Nandi, D. Zhao, J. Burgess-Shannon, R. Lovell-Badge, and M. Clinton. 2014. Gonadal asymmetry and sex determination in birds. *Sex. Dev.* 8:227–242 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24577119>.
- Hamburger, V., and H. L. Hamilton. 1992. A series of normal stages in the development of the chick embryo. *Dev. Dyn.* 195:231–272 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1304821> (verified 13 June 2017).
- Hammond, S. M., A. A. Caudy, and G. J. Hannon. 2001. Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat. Rev. Genet.* 2:110–119 Available at <https://www.nature.com/articles/35052556> (verified 30 March 2022).
- Hao, Y., X. H. Gu, and X. L. Wang. 2012. Overexpression of heat shock protein 70 and its relationship to intestine under acute heat stress in broilers: 1. Intestinal structure and digestive function. *Poult. Sci.* 91:781–789.
- Hoekstra, K. A., G. K. Iwama, C. R. Nichols, D. V. Godin, and K. M. Cheng. 1998. Increased heat shock protein expression after stress in Japanese quail. *Stress* 2:265–272.
- Hughes, G. C. 1963. The Population of Germ Cells in the Developing Female Chick. *J. Embryol. Exp. Morphol.* 11:513–536.
- Ichikawa, Y., M. Matsuzaki, G. Hiyama, S. Mizushima, and T. Sasanami. 2016. Sperm-egg interaction during fertilization in birds. *J. Poult. Sci.* 53:173–180 Available at </pmc/articles/PMC7477134/> (verified 28 March 2022).
- Intarapat, S., and C. D. Stern. 2014. Left-Right Asymmetry in Chicken Embryonic Gonads. *J. Poult. Sci.* 51:352–358 Available at <http://free-journal.umm.ac.id/files/file/Left-Right Asymmetry in Chicken Embryonic Gonads.pdf> (verified 31 May 2017).
- Islam, A., P. Abraham, C. D. Hapner, P. A. Deuster, and Y. Chen. 2013. Tissue-specific upregulation of HSP72 in mice following short-term administration of alcohol. *Cell Stress Chaperones* 18:215–222 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23011927/> (verified 31 March 2022).
- Iwao, Y. 2014. Egg Activation in Polyspermy: Its Molecular Mechanisms and Evolution in Vertebrates. Pages 171–180 in *Sexual Reproduction in Animals and Plants*. Springer Japan.
- Johnson, J. L. 2012. Evolution and function of diverse Hsp90 homologs and cochaperone proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* 1823:607–613.
- Kallio, M., Y. Chang, M. Manuel, T. P. Alastalo, M. Rallu, Y. Gitton, L. Pirkkala, M. T. Loones, L. Paslaru, S. Larney, S. Hiard, M. Morange, L. Sistonen, and V. Mezger. 2002. Brain abnormalities, defective meiotic chromosome synapsis and female subfertility in HSF2 null mice. *EMBO J.* 21:2591–2601 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12032072/> (verified 30 March 2022).
- Kang, D., J. Park, and K. Shim. 2019. Heat Treatment at an Early Age Has Effects on the Resistance to Chronic Heat Stress on Broilers. *Animals* 9:1022 Available at

- <https://www.mdpi.com/2076-2615/9/12/1022> (verified 28 March 2022).
- Karagenç, L., Y. Cinnamon, M. Ginsburg, and J. N. Petite. 1996. Origin of primordial germ cells in the prestreak chick embryo. *Dev. Genet.* 19:290–301.
- 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 Available at <http://doi.wiley.com/10.1002/ar.1092090312>.
- Lan, X., J. C. F. Hsieh, C. J. Schmidt, Q. Zhu, and S. J. Lamont. 2016. Liver transcriptome response to hyperthermic stress in three distinct chicken lines. *BMC Genomics* 17:955 Available at <https://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12864-016-3291-0> (verified 31 March 2022).
- 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 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3140040>.
- van de Lavoie, M.-C., E. J. Collarini, P. A. Leighton, J. Fesler, D. R. Lu, W. D. Harriman, T. S. Thiyagasundaram, and R. J. Etches. 2012. Interspecific Germline Transmission of Cultured Primordial Germ Cells (O El-Maarri, Ed.). *PLoS One* 7:e35664 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22629301> (verified 19 March 2019).
- 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 Available at <http://www.nature.com/doi/10.1038/nature04831> (verified 15 June 2017).
- 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 Available at <https://www.hindawi.com/journals/sci/2018/1780679/> (verified 29 April 2019).
- Lázár, B., M. Molnár, N. Sztán, B. Végi, Á. Drobnyák, R. Tóth, N. Tokodyné Szabadi, M. J. McGrew, E. Gócza, and E. Patakiné Várkonyi. 2021. Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. *Poult. Sci.* 100:101207.
- Lee, H. C., H. J. Choi, H. G. Lee, J. M. Lim, T. Ono, and J. Y. Han. 2016. DAZL expression explains origin and central formation of primordial germ cells in chickens. *Stem Cells Dev.* 25:68–79 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26414995/> (verified 29 March 2022).
- Levin, M. 1998. Left–right asymmetry and the chick embryo. *Semin. Cell Dev. Biol.* 9:67–76 Available at <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1084952197901920> (verified 1 June 2017).
- Li, G. C., and J. Y. Mak. 2009. Re-induction of hsp70 synthesis: An assay for thermotolerance. *Int. J. Hyperth.* 25:249–257.
- Liptói, K., S. Zsuzsanna, B. Végi, É. Váradi, K. Molnár Andrea, V. Sándor, and J. Barna. A fiatalkori hőkezelés hatása a lúd szaporaságára a nyári termelési ciklus során. *Magy. Állatorvosok Lapja* 133:18–23.
- 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 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21124737/> (verified 29 March 2022).
- 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. U. S. A.* 109:8803.
- Magdi, M., H. GL, K. MA, G. Ahmed, A. AO, and P. PH. 2004. Effect of heat stress on production parameters and immune responses of commercial laying hens. *Poult. Sci.* 83:889–894 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15206614-effect-of-heat-stress-on-production-parameters-and-immune-responses-of-commercial-laying-hens/>.
- Mahmoud, K. Z., F. W. Edens, E. J. Eisen, and G. B. Havenstein. 2004. The effect of dietary phosphorus on heat shock protein mRNAs during acute heat stress in male broiler chickens (*Gallus gallus*). *Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol.* 137:11–18 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14984699/> (verified 31 March 2022).
- 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.
- McGrew, M. J., A. Sherman, F. M. Ellard, S. G. Lillico, H. J. Gilhooley, A. J. Kingsman, K. A. Mitrophanous, and H. Sang. 2004. Efficient production of germline transgenic chickens using lentiviral vectors. *EMBO Rep.* 5:728–733 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15192698> (verified 13 April 2019).
- 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.
- Mezquita, B., J. Mezquita, M. Durfort, and C. Mezquita. 2001. Constitutive and heat-shock induced expression of Hsp70 mRNA during chicken testicular development and regression. *J. Cell. Biochem.* 82:480–490 Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11500924>.
- Mizushima, S. 2012. Establishment of Intracytoplasmic Sperm Injection Technique in Japanese Quail and its Possible Application for Poultry Resources and Transgenic Birds. *J. Poult. Sci.* 49:225–230 Available at https://www.jstage.jst.go.jp/article/jpsa/49/4/49_0120042/_article (verified 28 March 2022).
- Molnár, A. 1990. A trópusi klíma hatása a ludak anyagcseréjére és tojástermelésére.
- 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 Available at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50763-3> (verified 26 March 2022).
- Murugesan, S. 2018. Heat shock protein and thermal stress in chicken. Pages 179–193 in *Heat*

Shock Proteins in Veterinary Medicine and Sciences.

- 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 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7861384/> (verified 29 March 2022).
- Nakai, A., and R. I. Morimoto. 1993. Characterization of a novel chicken heat shock transcription factor, heat shock factor 3, suggests a new regulatory pathway. *Mol. Cell. Biol.* 13:1983–1997.
- Nakai, A., M. Suzuki, and M. Tanabe. 2000. Arrest of spermatogenesis in mice expressing an active heat shock transcription factor 1. *EMBO J.* 19:1545–1554 Available at </pmc/articles/PMC310224/> (verified 30 March 2022).
- Nakamura, M., M. Morita, H. Kurihara, and S. Mitarai. 2012. Expression of hsp70, hsp90 and hsf1 in the reef coral *Acropora digitifera* under prospective acidified conditions over the next several decades. *Biol. Open* 1:75–81 Available at <https://journals.biologists.com/bio/article/1/2/75/815/Expression-of-hsp70-hsp90-and-hsf1-in-the-reef> (verified 31 March 2022).
- 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.
- Nawab, A., F. Ibtisham, G. Li, B. Kieser, J. Wu, W. Liu, Y. Zhao, Y. Nawab, K. Li, M. Xiao, and L. An. 2018. Heat stress in poultry production; Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry. *J. Therm. Biol.* 78:131–139 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30509629-heat-stress-in-poultry-production-mitigation-strategies-to-overcome-the-future-challenges-facing-the-global-poultry-industry/>.
- Oishi, I., K. Yoshii, D. Miyahara, H. Kagami, and T. Tagami. 2016. Targeted mutagenesis in chicken using CRISPR/Cas9 system. *Sci. Rep.* 6 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27050479/> (verified 30 March 2022).
- Olszanska, B., and U. Stepinska. 2008. Molecular aspects of avian oogenesis and fertilisation. *Int. J. Dev. Biol.* 52:187–194 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18311709/> (verified 28 March 2022).
- 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.
- 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. U. S. A.* 109:9337–9341 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22645326/> (verified 30 March 2022).
- 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 Available at www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1410555111 (verified 30 March 2022).
- Péczely. 1987. *A madarak szaporodásbiológiája.*
- Péczely, P. 2013. *Madár szaporodásbiológia.* Agroinform Kiadó, Budapest.

- Péczely, P., G. Réz, and G. Zboray. 2007. *Összehasonlító anatómiai praktikum II.* (G Zboray, Ed.). Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest.
- Rath, P., N. Behura, S. Sahoo, P. Panda, K. Mandal, and P. Panigrahi. 2015. Amelioration of Heat Stress for poultry welfare: A strategic approach. *Int. J. Livest. Res.* 5:1.
- 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.
- Romanoff, A. 1960. *The avian embryo, structural and functional development.* Macmillan, New York.
- Saju, J. M., M. S. Hossain, W. C. Liew, A. Pradhan, N. M. Thevasagayam, L. S. E. Tan, A. Anand, P. E. Olsson, and L. Orbán. 2018. Heat Shock Factor 5 is essential for spermatogenesis in zebrafish. *Cell Rep.* 25:3252-3261.e4 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30566854-heat-shock-factor-5-is-essential-for-spermatogenesis-in-zebrafish/> (verified 24 February 2020).
- Sid, H., and B. Schusser. 2018. Applications of gene editing in chickens: A new era is on the Horizon. *Front. Genet.* 9:456.
- 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 Available at <http://bmcdevbiol.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-213X-8-85> (verified 29 March 2022).
- Smith, C. A., and A. H. Sinclair. 2001. Sex determination in the chicken embryo. *J. Exp. Zool.* 290:691–699 Available at <http://doi.wiley.com/10.1002/jez.1119> (verified 12 June 2017).
- Smith, C. A., and A. H. Sinclair. 2004. Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays* 26:120–132 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745830> (verified 12 June 2017).
- Stankiewicz, M., and M. P. Mayer. 2012. The universe of Hsp90. *Biomol. Concepts* 3:79–97.
- Star, L., B. Kemp, I. Van Den Anker, and H. K. Parmentier. 2008. Effect of single or combined climatic and hygienic stress in four layer lines: 1. Performance. *Poult. Sci.* 87:1022–1030 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18492988/> (verified 31 March 2022).
- Sun, H., R. Jiang, S. Xu, Z. Zhang, G. Xu, J. Zheng, and L. Qu. 2015. Transcriptome responses to heat stress in hypothalamus of a meat-type chicken. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* 6:1–12 Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4359534/>.
- Swan, C. L., T. G. Evans, N. Sylvain, and P. H. Krone. 2012. Zebrafish HSF4: A novel protein that shares features of both HSF1 and HSF4 of mammals. *Cell Stress Chaperones* 17:623–637.
- Swift, C. H. 1914. Origin and early history of the primordial germ-cells in the chick. *Am. J. Anat.* 15:483–516 Available at <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/aja.1000150404> (verified 29 March 2022).
- Szalay, I. 2015. Régi magyar baromfifajták a XXI. században = Old Hungarian poultry in the

21st century. Mezőgazda Kiadó.

- Tagami, T., Y. Matsubara, H. Hanada, and M. Naito. 1997. Differentiation of female chicken primordial germ cells into spermatozoa in male gonads. *Dev. Growth Differ.* 39:267–71 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9227893> (verified 19 March 2019).
- 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.
- Taipale, M., D. F. Jarosz, and S. Lindquist. 2010. HSP90 at the hub of protein homeostasis: Emerging mechanistic insights. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11:515–528.
- 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 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10589506/> (verified 29 March 2022).
- 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 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16727334/> (verified 29 March 2022).
- Tamzil, M. H., R. R. Noor, P. S. Hardjosworo, W. Manalu, and C. Sumantri. 2013. Acute heat stress responses of three lines of chickens with different heat shock protein (HSP)-70 genotypes. *Int. J. Poult. Sci.* 12:264–272.
- The Intergovernmental Panel on Climate Change: 30 Years Informing Global Climate Action. 2018. IPCC Available at https://unfoundation.org/blog/post/intergovernmental-panel-climate-change-30-years-informing-global-climate-action/?gclid=CjwKCAjwuYWSBhByEiwAKd_n_sPqPMJrbLEnnaUhTtJwiZfwZV6nd-o-7TDrPmSMMn0bcwed9UQedRhoC5CMQAvD_BwE (verified 28 March 2022).
- Tong, Q., C. E. Romanini, V. Exadaktylos, C. Bahr, D. Berckmans, H. Bergoug, N. Eterradossi, N. Roulston, R. Verhelst, I. M. McGonnell, and T. Demmers. 2013. Embryonic development and the physiological factors that coordinate hatching in domestic chickens. *Poult. Sci.* 92:620–628.
- 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 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25482458/> (verified 1 April 2022).
- Toth, R., B. Lázár, and E. Gócza. 2018. A házityúk-ivarszerv kialakulásának érdekességei – Tyúkok, tojások, őssejtek | Természet Világa. *Természet Világa* 149:498–504 Available at <https://termvil.hu/2018/12/20/tyukok-tojasok-ossejtek/> (verified 31 March 2022).
- Tóth, R., N. Tokodyné Szabadi, B. Lázár, K. Buda, B. Végi, J. Barna, E. Patakiné Várkonyi, K. Liptói, B. Pain, and E. Gócza. 2021. Effect of Post-Hatch Heat-Treatment in Heat-Stressed Transylvanian Naked Neck Chicken. *Animals* 11:1575 Available at <https://www.mdpi.com/2076-2615/11/6/1575> (verified 26 March 2022).
- 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.

- 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 Available at <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2499221>.
- Vandana, G. D., V. Sejian, A. M. Lees, P. Pragna, M. V. Silpa, and S. K. Maloney. 2021. Heat stress and poultry production: impact and amelioration. *Int. J. Biometeorol.* 65:163–179 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33025116/> (verified 21 March 2022).
- Walstra, I., J. Ten Napel, B. Kemp, and H. van den Brand. 2010. Temperature manipulation during layer chick embryogenesis. *Poult. Sci.* 89:1502–1508.
- 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.
- Wang, L. C., C. T. Chen, H. Y. Lee, S. H. Li, J. T. Lir, S. C. Chin, C. E. Pu, and C. H. Wang. 2007. Sexing a wider range of avian species based on two CHD1 introns with a unified reaction condition. *Zoo Biol.* 26:425–431.
- Wang, S. H., C. Y. Cheng, P. C. Tang, C. F. Chen, H. H. Chen, Y. P. Lee, and S. Y. Huang. 2013. Differential gene expressions in testes of L2 strain Taiwan country chicken in response to acute heat stress. *Theriogenology* 79.
- Wang, S. H., C. Y. Cheng, P. C. Tang, C. F. Chen, H. H. Chen, Y. P. Lee, and S. Y. Huang. 2015. Acute heat stress induces differential gene expressions in the testes of a broiler-type strain of Taiwan country chickens. *PLoS One* 10.
- Wang, S., and F. W. Edens. 1998. Heat conditioning induces heat shock proteins in broiler chickens and turkey poults. *Poult. Sci.* 77:1636–1645 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9835337/>.
- Wang, G., Z. Ying, X. Jin, N. Tu, Y. Zhang, M. Phillips, D. Moskophidis, and N. F. Mivechi. 2004. Essential Requirement for Both hsf1 and hsf2 Transcriptional Activity in Spermatogenesis and Male Fertility. *Genesis* 38:66–80 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14994269/> (verified 30 March 2022).
- 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.
- Wilhelm, W. 1870. Eierstock und Ei. Available at <https://www.amazon.com/Eierstock-Heinrich-Wilhelm-Gottfried-Waldeyer-Hart/dp/1246123045> (verified 29 March 2022).
- Wolfenson, D., B. J. Lew, W. W. Thatcher, Y. Graber, and R. Meidan. 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Anim. Reprod. Sci.* 47:9–19 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9233502-seasonal-and-acute-heat-stress-effects-on-steroid-production-by-dominant-follicles-in-cows/> (verified 3 March 2020).
- 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.

- Xie, J., L. Tang, L. Lu, L. Zhang, X. Lin, H. Liu, J. Odle, and X. Luo. 2015. Effects of acute and chronic heat stress on plasma metabolites, hormones and oxidant status in restrictedly fed broiler breeders. *Poult. Sci.* 94:1635–1644 Available at <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25910904>.
- Xie, J., L. Tang, L. Lu, L. Zhang, L. Xi, H. Liu, J. Odle, and X. Luo. 2014. Differential expression of heat shock transcription factors and heat shock proteins after acute and chronic heat stress in laying chickens (*Gallus gallus*). *PLoS One* 9:16–18 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25072282-differential-expression-of-heat-shock-transcription-factors-and-heat-shock-proteins-after-acute-and-chronic-heat-stress-in-laying-chickens-gallus-gallus/>.
- Yahav, S., A. Collin, D. Shinder, and M. Picard. 2004. Thermal manipulations during broiler chick embryogenesis: Effects of timing and temperature. *Poult. Sci.* 83:1959–1963.
- Yeh, F. L., L. Y. Hsu, B. A. Lin, C. F. Chen, I. C. Li, S. H. Tsai, and T. Hsu. 2006. Cloning of zebrafish (*Danio rerio*) heat shock factor 2 (HSF2) and similar patterns of HSF2 and HSF1 mRNA expression in brain tissues. *Biochimie* 88:1983–1988.
- 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 Available at <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30203087-isolation-characterization-and-germline-chimera-preparation-of-primordial-germ-cells-from-the-chinese-meiling-chicken/> (verified 6 March 2020).
- Zaboli, G., X. Huang, X. Feng, and D. U. Ahn. 2019. How can heat stress affect chicken meat quality? - A review. *Poult. Sci.* 98:1551–1556.
- Zhang, W. W., L. N. Kong, X. Q. Zhang, and Q. B. Luo. 2014. Alteration of HSF3 and HSP70 mRNA expression in the tissues of two chicken breeds during acute heat stress. *Genet. Mol. Res.* 13:9787–9794.

9.2 2.számú melléklet (M2)

A:

Termelési paraméterek meghatározásához használt kakasok és tyúkok					
Spermium analízis		Tojástermelés			
HS	HTHS	HS		HTHS	
Kakas	Kakas	Kakas	Tyúk	Kakas	Tyúk
10	10	3	31	3	31

B1:

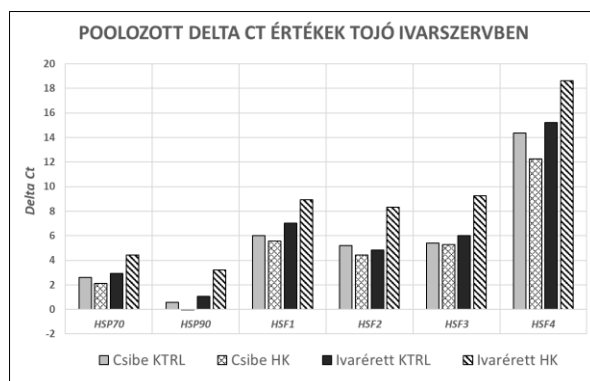
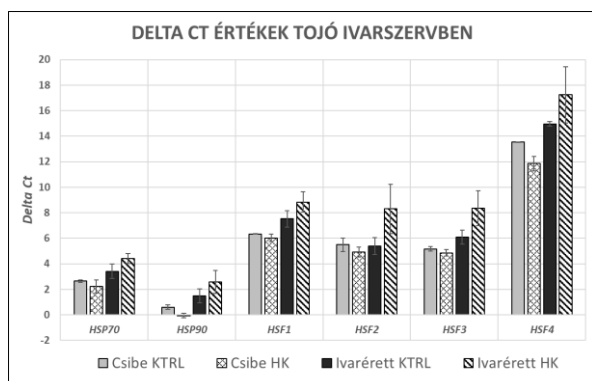
RNS expressziós vizsgálatokhoz használt csibe és ivarérett állatok száma (poolozott szinten)							
Csibe				Ivárett			
KTRL		HK		KTRL		HK	
Kakas	Tyúk	Kakas	Tyúk	Kakas	Tyúk	Kakas	Tyúk
13	2	9	6	5	4	8	4

B2:

RNS expressziós vizsgálatokhoz használt csibe és ivarérett állatok száma (egyedi szinten)							
Csibe				Ivárett			
KTRL		HK		KTRL		HK	
Kakas	Tyúk	Kakas	Tyúk	Kakas	Tyúk	Kakas	Tyúk
4	2	4	4	4	4	4	4

M2 ábra: Hőkezelési kísérletben használt állatok száma. **A:** A spermatológiai és tojástermelési paraméterek vizsgálatához használt kakasok és tyúkok száma. **B1:** A hőkezelési kísérletben használt előzetesen hőkezelt (HK) és kontroll (KTRL) házityúkok száma, melyekből RNS expressziós vizsgálatok lettek végezve poolozott szinten. **B2:** A hőkezelési kísérletben használt előzetesen hőkezelt (HK) és kontroll (KTRL) házityúkok száma, melyekből RNS expressziós vizsgálatok lettek végezve egyedi szinten.

9.3 3.számú melléklet (M3)



M3 ábra:

Az egyedi és a poolozott minták RNS expressziós mintázatának összehasonlítása tojó ivarszervben.

10. FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témájában megjelent impakt faktoral rendelkező tudományos cikkek:

- Lázár B., Tokodyné Szabadi N., Mahek A., **Tóth R.**, Ecker A., Urbán M., Maria Terese, S. A., Ganna S., Hegyi Z., Homolya L., Várkonyi E., Bertrand P., Gócza E. (2022): Effect of miR-302b MicroRNA inhibition on chicken primordial germ cell proliferation and apoptosis rate. *Genes*, 2022 13 (1) 82. <https://doi.org/10.3390/genes13010082>: **Q2** IF: **3.886** független idéző közlemények száma: **0**
- Lázár B., Molnár M., Sztán N., Végi B., Drobnyák Á., **Tóth R.**, Tokodyné Szabadi N., McGrew MJ., Gócza E., Patakiné Várkonyi E. (2021): Successful cryopreservation and regeneration of a partridge coloured Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. *Poultry Science* 2021 Aug;100(8):10120. *Animals Science and Zoology* 25/419: **D1**, IF: **2.752**, független idéző közlemények száma: **0**
- **Tóth R.**, Tokodyné Szabadi N., Lázár B., Buda K., Végi B., Barna J., Patakiné Várkonyi E., Liptói K., Pain B., Gócza E. (2021): Effect of Post-Hatch Heat-Treatment in Heat-Stressed Transylvanian Naked Neck Chicken, *ANIMALS* 11: (6) 1575. *Veterinary* 48/200 (**Q1**), IF:**2.70**, független idéző közlemények száma: **0**
- **Tóth, R.**, Lázár, B., Tokodyné Szabadi N., Patakiné Várkonyi E., Gócza Elen (2019): Őshonos magyar tyúkfajták, mint lehetséges univerzális recipiensek az ősvarsejt alapú génmegőrzésben. Indigenous Hungarian chicken breeds as universal recipients for primordial germ cell-based gene conservation, *MAGYAR ÁLLATORVOSOK LAPJA* 141(7), 439-447. *Veterinary (miscellaneous)* 180/192 (**Q4**), IF: **0.143**, független idéző közlemények száma: **0**
- Molnár, M., Lázár, B., Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., **Tóth, R.**, Liptói, K., Marosán, M., Gócza, E., Nandi, S., McGrew, M.J., Várkonyi, E.P. (2019): Investigation of the Guinea fowl and domestic fowl hybrids as potential surrogate hosts for avian cryopreservation programmes, *SCIENTIFIC REPORTS* 9(1) 14284, 2019 *Multidisciplinary* 9/138 (**D1**), IF: **4.011**, független idéző közlemények száma: **1**
- Anand, M., Lázár, B., **Tóth, R.**, Páll, E., Várkonyi, P.E., Liptói, K., Homolya, L., Hegyi, Z., Hidas, A., Gócza, E. (2018): Enhancement of chicken primordial germ cell in vitro maintenance using an automated cell image analyser, *ACTA VETERINARIA HUNGARICA* 66(4), 518-529, *Veterinary (miscellaneous)* 53/181, (**Q2**), IF: **1.059**, független idéző közlemények száma: **2**
- Lázár, B., Anand, M., **Tóth, R.**, Várkonyi, P.E., Liptói, K., Gócza, E. (2018): Comparison of the MicroRNA Expression Profiles of Male and Female Avian Primordial Germ Cell Lines, *STEM CELLS INTERNATIONAL* 1780679, 2018 *Cell Biology* 122/283 (**Q2**), IF: **3.902**, független idéző közlemények száma: **5**

Az értekezés témájában megjelent impakt faktoral nem rendelkező tudományos cikk:

- 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.

Az értekezés témájában megjelent magyar nyelvű ismeretterjesztő cikk:

- **Tóth R.**, Lázár B., Gócza E. (2018): A házityúk-ivarszerv kialakulásának érdekességei. Tyúkok, tojások, őssejtek. **Természettudományi Közlöny** 149(11):498-504.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönettel tartozom **Dr. Gócza Elen** témavezetőmnek, aki mérhetetlen segítséget nyújtott doktori tanulmányaim elvégzésében. Hálás vagyok, hogy doktori munkám az Alkalmazott és Össejtani Laborban végezhettem Elen vezetésével, ahol mindig számíthattam tanácsaira, iránymutatására a kísérletekben, valamint ösztönző szavaira. Minden esetben elérhető volt és hasznos tanácsokkal látott el, ha a kísérletek eredményei nem épp úgy alakultak, ahogy vártuk. Témavezetésével a Ph.D.-s időszakom jó hangulatban és családi légkörben telt.

Köszönet illeti **Dr. Liptói Krisztinát**, az NBGK-HGI kutatásért felelős igazgatóját, aki a hőkezelési kísérletekben nyújtott mindig esetben támogatást, valamint, hogy doktori munkám egy részét az általa kifejlesztett hőkezelési eljárás tanulmányozásával tölthettem. Krisztina mindig készséggel segítségemre volt, bármilyen kérdésem volt a hőkezelési eljárással kapcsolatban. Nagyon sok segítséget kaptam tőle a kísérletek elvégzése és értékelése folyamán. Köszönöm **Dr. Várkonyi Eszternek** a sok jótanácsot, amit a PGC vonalak alapításánál és a visszainjektálási kísérleteknél adott. Eszterhez bármikor elmentem a HGI-be vagy felhívtam mindig töretlen jókedvével hozzásegített az újabb lendület megszerzéséhez doktori munkámban.

Köszönet a MATE-GBI összes munkatársának, akik szakmai és emberi segítségükkel elláttak tanácsokkal, valamint jó hangulatú munkahelyet teremtettek. Külön köszönöm csoportunk tagjainak **Dr. Lázár Bencének**, **Urbán Martinnak**, **Ecker Andrásnak** és **Szabadi Nikolettnek**, hogy a kísérletekben segédkeztek és mindig lehetett rájuk számítani. Nagyon nagy öröm volt velük eltölteni ezt az időszakot. Mindig jókedv uralkodott az irodában, valamint a laborban is. Hála illeti **Markovics Zsuzsanna** és **Gubó Edit** laborelőkészítőnket, akik minden nap hajnalban már elkezdték a laborban dolgozók edényeit és különböző vegyszereit előkészíteni és takarítani a laborokat. Nagyon nagy segítséget adtak ezzel, hogy mindig rendezett, tiszta és alapos munkát végezhsek.

Köszönöm a HGI-ben dolgozó kollégáknak a hőkezelési kísérletekben nyújtott nagy segítséget név szerint **Buda Kitti** és **Dr. Drobnayk Árpád**, valamint köszönöm, hogy a hőkezelés termelési paramétereire irányuló előzetes kutatásokat elvégző **Dr. Végi Barbara** és **Dr. Barna Judit** eredményeit használhattam összehasonlítási alapként saját vizsgálataim eredményeihez. Köszönöm továbbá a HGI-ben dolgozó **Sztán Nikoletta** és **Molnár Mariann** kollegáknak az ősvarsejtekkel végzett kutatásban nyújtott segítségüket.

Köszönöm az NBGK-HGI telepen dolgozó munkatársainak, akik a tojások összeszedésében, előkészítésében segítettek és gördülékenyen folytathattam a munkám segítségükkel.

Köszönet illeti a MATE digitális Képkalkoló Labor volt és jelenlegi kezelőit, **Iski Gergelyt** és **Dr. Tóth Zoltánt**, a konfokális képek elkészítésében nyújtott segítségükért.

Köszönettel tartozom **Nagy Nándornak** és kutatócsoportjában dolgozó **Halassy Viktóriának**, aki megtanította a metszőgép használatát, valamint az immunhisztokémiai lépéseket, továbbá a P63 elsődleges ellenanyag előállítását is Ők végezték.

Nagyon köszönöm továbbá szüleimnek **Tóthné Horváth Máriának** és **Tóth Imrének**, hogy erejükön felül mindig támogatták Ph.D.-s tanulmányaimat. Ezen felül megteremtették azt a feltételt, hogy eljuthassak idáig, nélkülük semmiképpen nem jöhetett volna létre ez a dolgozat. Továbbá köszönöm húgomnak **Tóth Viktóriának** mindig biztató szavait, hogy sikeresen végig tudom csinálni a néha igen nehéz próbatételeket.