



MAGYAR AGRÁR- ÉS
ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Genetika és
Biotechnológia Intézet

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

DOKTORI ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**Tóth Roland Imre
Gödöllő
2022**



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 tag
MATE, Mezőgazdasági- és
Környezettudományi Kar Takarmányozástani
Tanszék

Témavezető: Dr. Gócza Elen
MTA levelező tag, tudományos tanácsadó
MATE, Genetika és Biotechnológiai Intézet,
Állatbiotechnológia Tanszék

.....
Iskolavezető jóváhagyása

Dr. Mézes Miklós,
MTA rendes tagja

.....
Témavezető jóváhagyása

Dr. Gócza Elen,
MTA levelező tagja

Tartalom

1	MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK	- 4 -
1.1	Bevezetés.....	- 4 -
1.2	Célkitűzés	- 5 -
2	ANYAG ÉS MÓDSZERTAN	- 6 -
2.1	Hőkezelési kísérletek módszerei	- 6 -
2.2	Fluoreszcensen jelölt ősvarsejt tenyészetek jellemzésének módszerei	- 7 -
3	EREDMÉNYEK	- 9 -
3.1	Hőkezelési kísérletek eredményei	- 9 -
3.1.1	Előzetes eredmények (NBGK-HGI).....	- 9 -
3.1.2	A hőkezelés molekuláris biológiai hatásának eredményei	- 10 -
3.2	Fluoreszcensen jelölt házityúk ősvarsejtek eredményei.....	- 12 -
3.3	Új tudományos eredmények	- 17 -
4	KÖVETKEZTETÉSEK, JAVASLATOK	- 18 -
4.1	Javaslatok	- 23 -
5	FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK	- 25 -
6	IRODALOMJEGYZÉK	- 31 -

1 MUNKA ELŐZMÉNYEI, CÉLKITŰZÉSEK

1.1 Bevezetés

A XXI. század derekán már jól érezhető az emberi tevékenység hatása a Földön. Klímánk állapota jelentősen romlott, és várhatóan, ha nem szorítjuk vissza a fosszilis energiahordozók használatát ez tovább fog romlani (“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. 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-k) 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).

Az ősvarsejtek visszajuttatva egy megfelelő fejlődési állapotban lévő recipiens embrióba, képesek integrálódni annak ivarszervébe így ivarszervi kiméra jön létre. Az ideális recipiens fajta megtalálása fontos feladat azért, hogy minél szélesebb körben lehessen az ősvarsejtekre egy recipienst használni.

Dolgozatomban azt a kutatási munkát foglaltam össze, amelynek keretében házityúk 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.

1.2 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.

2 ANYAG ÉS MÓDSZERTAN

A dolgozatban végzett kísérleteket a Nemzeti Biodiverzitás és Génmegőrzési Központ – Haszonállat Génmegőrzési Intézet (NBGK-HGI) gödöllői telephelyén, valamint az MBK (később NAIK) utód intézményeként a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem – Genetika és Biotechnológiai (MATE-GBI) Intézetében lettek elvégezve. Az állatkísérleti engedélyekkel, mind az NBGK-HGI (Engedély szám: PE/EA197-4/2016), mind a MATE-GBI rendelkezett (Engedély szám: 106685/4/2005).

2.1 Hőkezelési kísérletek módszerei

A hőkezeléssel kapcsolatos kísérletekhez rendelkezésemre álltak előzetes eredmények, melyeket a HGI-ben végeztek el és rendelkezésemre bocsájtották. Az előzetes eredményekben az erdélyi kendermagos kopasznyakú házityúkوك hőkezelés után egy hosszabb idejű (2 hét) hőstressznek is ki voltak téve, majd a termelékenység paramétereit vizsgálták meg. Kakasok esetén a spermatológiai, tyúkoknál a tojástermelési paraméterek kerültek meghatározásra. A második hőkezelés ugyanolyan paraméterek mellett lett elvégezve, mint az előzetes hőkezelési kísérlet (37,8 °C-on 60%-os páratartalom) 30-30 egyed bevonásával. Közvetlen kezelés után 15 hőkezelt és 15 kontroll állatból történt meg a mintavételezés. Összesen 5 minta került legyűjtésre (agy, máj, bal-jobb ivarszerv, izom). Minden egyed ivarmeghatározása megtörtént molekuláris biológiai módszerekkel (szex PCR). A mintákból RNS izolálás után real-time qPCR segítségével génexpressziós vizsgálatok lettek elvégezve két hősokk fehérje (*HSP70*, *HSP90*) és 4 hősokkfaktor (*HSF1*, *HSF2*, *HSF3* és *HSF4*) esetében. Relatív expressziós értékek lettek meghatározva a Genex MultiD szoftver

segítségével, ahol a GAPDH volt a referenciagén és a házityúk embrionális fibroblaszt (CEF) szolgált referencia mintaként.

2.2 Fluoreszcensen jelölt ősvarsejt tenyészetek jellemzésének módszerei

A skóciai Roslin Intézet által tervezett és használt zöld fluoreszcens (GFP) fehérjét expresszáló házityúk tojásaiból ősvarsejt (PGC) vonalak lettek alapítva. Egy szájpipettához rögzített üveg mikrokapilláris segítségével hozzávetőlegesen 1-1,5 μ l vér szívható ki az embrióból, mely tartalmazza a PGC-eket. Az izolált vér egy speciális tenyésztő médiumba került, mely csak a PGC-k fejlődését segíti. A tenyésztés CO₂ termosztátban történt 38 °C-on 5 %-os CO₂ szint mellett. Megfelelő mennyiségű PGC esetén egy speciális fagyasztómédiummal lettek mélyhűtve az ősvarsejtek, tárolásuk folyékony nitrogénben vagy mínusz 150 °C-os mélyhűtő berendezésben történt. Az ősvarsejtek ivarának meghatározása (szex PCR) a P2-P8-as primerpár segítségével történt.

Az ősvarsejtek karakterizálása több módszerrel is megtörtént. Elsőként a sejtekből RNS lett izolálva RNAqueous™ Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) izoláló Kit segítségével, majd complementer DNS írása után real-time qPCR segítségével két ősvarsejt specifikus (CVH, DAZL) és három őssejt specifikus (OCT4, POUV, miR302a) marker relatív expressziója került meghatározásra.

A PG sejtek karakterizálása immunhisztokémiai vizsgálattal is megtörtént. Az optimális sejtszám beállítása után CVH, P63 és SSEA1 elsődleges ellenanyagokkal történt meg a festés. A sejtmag jelölésére TO-PRO™-3 sejtmag festék volt alkalmazva. Az ősvarsejtek proliferációs rátája és az apoptotikus sejtek aránya az ImageXpress Pico EC (Molecular Devices, LLC, San Jose, CA, USA) automata fluoreszcens képkészítő és képelemző

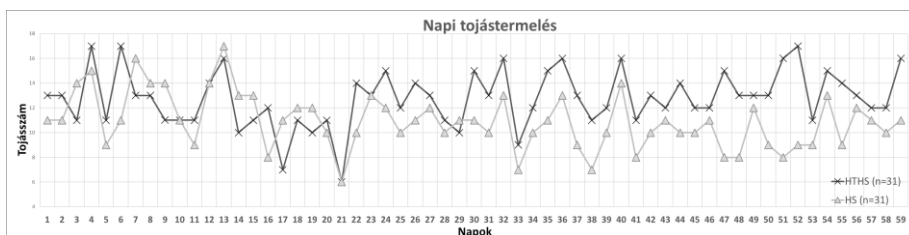
mikroszkóppal történt. A fluoreszcensen jelölt (GFP) PGC-k három őshonos magyar házityúk fajtába (fehér magyar, sárga magyar és fogolyszínű magyar) voltak visszainjektálva. A megfelelő sejtszám meghatározása után egy szájpipettához csatlakoztatott üveg mikropillaris segítségével 1 µl sejtszuspenzió lett visszajuttatva az embrió vérkeringésébe. Az integráció mértékének meghatározása az embrionális fejlődés 14. napján történt meg. 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 vizsgáltuk. Az ivarszervek 4%-os PFA-ban lettek fixálva vizsgálatokhoz. Az ivarszervek a Semmelweis Orvostudományi Egyetem Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetének Laboratóriumát vezető Dr. Nagy Nándor által kifejlesztett protokoll alapján lettek beágyazva 7,5 %-os zselatinba. A zselatinba beágyazott szerveket mínusz 45 °C-os izopentánban lettek megfagyasztva. A megfagyott zselatin kocka egy kriosztát tárgyasztalára (MicroM GmbH D-6900 Heidelberg, Germany) lett rögzítve, ahol 10 - 15µm-es metszetek készültek. A metszetek Polyzines tárgylemezre lettek ráhelyezve, ami garantálta az immunfestés első lépésénél a rehidrálnál azt, hogy lecsússzanak a metszetek a lemezről. Az immunhisztokémiai vizsgálatnál P63 és CVH elsődleges ellenanyagok lettek használva a PGC-k detektálására. 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.

3 EREDMÉNYEK

3.1 Hőkezelési kísérletek eredményei

3.1.1 Előzetes eredmények (NBGK-HGI)

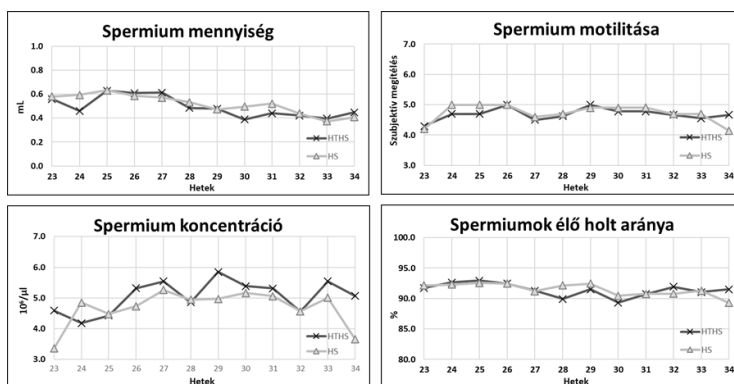
Kísérleteim megkezdése előtt már álltak rendelkezésre előzetes kísérletekből származó adatok. Tojók esetében két paramétert vizsgáltak az NBGK-HGI munkatársai 2015 – 2016 években. A napi tojástermelést hasonlították össze az előzetesen hőkezelt állatok és a hőkezelést nem kapott tojótyúkok között. Azt 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 (**1. 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 volt terméketlen (Anand et al., 2016; Tóth et al., 2021).



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

A kakasok spermatológiai vizsgálatának eredményei nagy hasonlóságot mutatnak az előzetesen hőkezelést kapott és a kontroll állatok teljesítménye között. Tíz, hőkezelésen átesett kakas és tíz kontroll kakas

termékenységi eredményei lettek elemezve négy paraméter alapján (minőség, koncentráció, motilitás és élő-holt arány) (2. ábra). Az ejakulátum mennyiségében nem volt detektálható szignifikáns különbség a két csoport között ($p=0,5075$). A spermium koncentráció esetében sem volt különbség a két 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.



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

3.1.2 A hőkezelés molekuláris biológiai hatásának eredményei

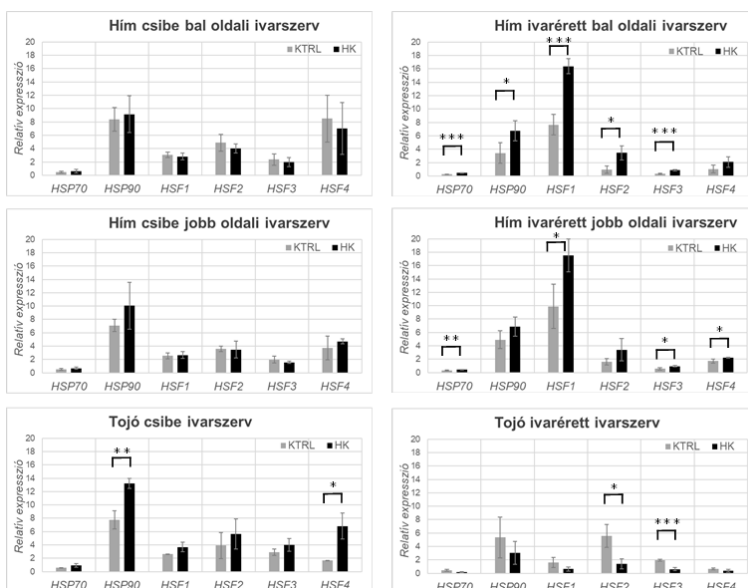
A II. hőkezelési kísérletben 30 – 30 állat vett részt. Az első 30 állat előzetesen hőkezelve lett, míg a másik 30 átlagos környezeti hőmérsékleten volt tartva. Közvetlenül a hőkezelés után 15 – 15 állat lett kiválasztva véletlenszerűen, melyekből megtörtént a mintavételezés, a többi állatot ivarérett korig neveltük. Az egyedek ivar szerint (kakas, tyúk), korcsoport szerint (csibe, ivarérett) és kezelés szerint (hőkezelt, kontroll) voltak csoportosítva. Minden csoport legalább 4 egyedet tartalmazott. A csoportokban szereplő egyedek RNS mintái egyedileg is és poolozva is meg lettek vizsgálva. Az egyedileg mért értékek átlaga, valamint a poolozott minták eredményei nagy

hasonlóságot mutattak. A delta Ct értékek összehasonlítása az egyedi adatok alapján készült. Szignifikáns különbséget volt a *HSP70* ($p= 0,0289$) és *HSF3* ($p= 0,0482$) delta Ct értékében 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 volt megfigyelhető szignifikáns különbség 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 volt szignifikáns különbség 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.

A hősokk fehérje (HSP) és hősokk faktor (HSF) gének expressziós változásairól, relatív expressziós értékek is meghatározásra kerültek, ahol a *GAPDH* volt a referencia gén (**3. ábra**). A számolás Genex (7.0) szofverrel (MultiD Analyses AB, Göteborg, Sveden) volt elvégezve. Közvetlenül a hőkezelés után csibe korban csupán a tojó állatoknál volt megfigyelhető szignifikánsan magasabb relatív expressziós szint a *HSP90* ($p= 0,0094$) és *HSF4* ($p= 0,0387$) géneknél. Összehasonlítva az ivarérett példányokkal, ellentétes összefüggés látható. 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 volt. Kakasoknál 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.

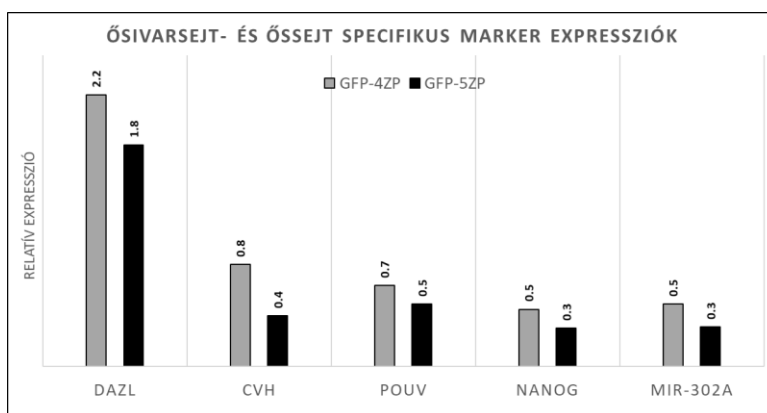


3. ábra: Relatív expressziós értékek hím és tojó állatokban. Az összehasonlítás alapját háztyúk embrionális fibroblaszt (CEF) sejtek adták minden hőszokkfehérje (*HSP70*; *HSP90*) és hőszokkfaktor (*HSF1*; *HSF2*; *HSF3*; *HSF4*) gén expressziója esetében. A változások a bal és jobb oldali ivarszervben,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

3.2 Fluoreszcensen jelölt háztyúk ősvarsejtek eredményei

A GFP-t expresszáló ősvarsejt tenyészetek a Roslin Intézet által készített GFP-s konstrukciót tartalmazó háztyúk embrióiból lettek alapítva. Összesen 19 embrióból, 10 stabil ősvarsejt tenyészetet sikerült létrehozni. 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. 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. A stabil tenyészetek ivari eloszlása szerint 8 (80%) hím és 2 (20%) nőtény vonalat sikerült alapítani. 2 nőtény és 2 hím ivarú ősvarsejt tenyészet került kiválasztásra, melyen real-time qPCR segítségével az őssejt (*cPOUV*, *NANOG*, *miR302a*) és ősvarsejt (*CVH*, *DAZL*) specifikus markerek expressziója lett meghatározva (**4. ábra**). Mind a négy sejtvonal esetében az összes marker relatív expressziós szintje magasnak bizonyult. Minden qPCR mérés része volt egy házityúk embrionális fibroblaszt (CEF) minta is, amely a plate-k eredményeinek összehasonlíthatóságát szolgálta.



4. ábra: GFP-t expresszáló ősvarsejt tenyészetek kvantitatív real-time PCR-el mért relatív expressziós értékeinek ábrázolása *GAPDH* referencia gént használva.

A két kiválasztott ősvarsejt vonalon (4ZP= hím; 5ZP= nőtény), immunhisztokémiai vizsgálatok lettek elvégezve. Mindkét PGC vonal ősvarsejt (*CVH*, *P63*) és őssejt (*SSEA1*) specifikus festődést is mutatott. Sejtmagfestésként ToPro[®]-3 volt használva, ami a képeken kék színű.

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.

Három recipiens fajtába (sárga magyar, fehér magyar, fogolyszínű magyar) volt vizsgálva a bejuttatott GFP-t expresszáló ősvarsejtek integrációs hatékonysága. Összesen 30 injeztálási kísérletet történt. Minden fajta esetében 5-5 injeztálási kísérlet volt a 4 ZP (hím) és 5 ZP (nőstény) GFP-t expresszáló ősvarsejtekkel. Az injeztálási kísérletekhez összesen 365 embrió volt felhasználva, melyből 241 (66,03%) élt túl. Nőstény ivarú (5ZP) GFP PGC 198 (54,25%) embrióba volt injeztálva, melyekből 132 (66,67%) embrió maradt életben. Összesen 58 (43,94%) ivarszervben volt megfigyelhető integráció, ebből 26 (44,83%) hím ivarú és 32 (55,17%) nőivarú recipiens embrió volt. Az embriók ivarszervébe történő integrációs hatékonyság vizsgálata az embrionális fejlődés 14. napján történt.

Hím ivarú ősvarsejt (4ZP) esetében összesen 167 (45,75%) embrióba történt injeztálás, melyekből 109 (65,27%) élte túl a beavatkozást. Az integráció sikerességét 58 embriónál lehetett meghatározni, ebből 28 (48,28%) hím embriónak és 30 (51,72%) tojó recipiens embriónak bizonyult. A részletes fajtákra lebontott adatokat az **1. táblázatban** látható. Szignifikánsan magasabb integrációs értéket lehet megfigyelni a fogolyszínű magyar fajta esetében a másik két fajttal szemben, amikor az 5 ZP nőstény sejt vonalat került injeztálásra. Az injeztált embriók között a sárga magyar fajta túlélési rátája szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a fehér magyar fajté. Említést érdemel, hogy a GFP-4ZP sejt vonal esetében igazolva lett, hogy képes gyöngytyúk ivarszervébe is integrálódni (Molnár et al., 2019).

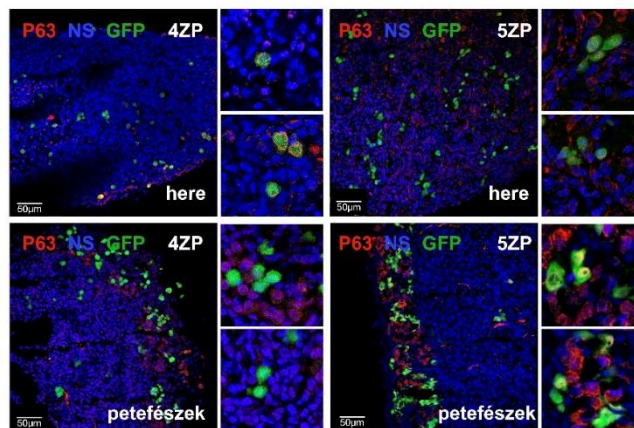
1. táblázat: Nőstény (5ZP) és hím (4ZP) GFP-t expresszáló ősvarsejt vonalak integrációs képességének vizsgálata. Recipiensnek három magyar fajtát használtam.

5 ZP PGC injeztálása	Injeztált 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	Nőtény 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 igazolta az immunhisztokémiai vizsgálat az integrálódott GFP-PGC jelenlétét, továbbá a recipiens fajta ivarszervében lévő PGC-k festésével ősvarsejt arányokat is meg lehetett határozni. Két ősvarsejt specifikus antitesttel történt a festés (CVH, P63). Az **5. ábrán** jól látható, hogy a petefészekben a PGC-k főként a *corticalis* részen található meg, míg herében az integráció a *medullaris*, belső részen található herecsatornácskákból lokalizálódik.

14 napos embriók ivarszerv metszetei

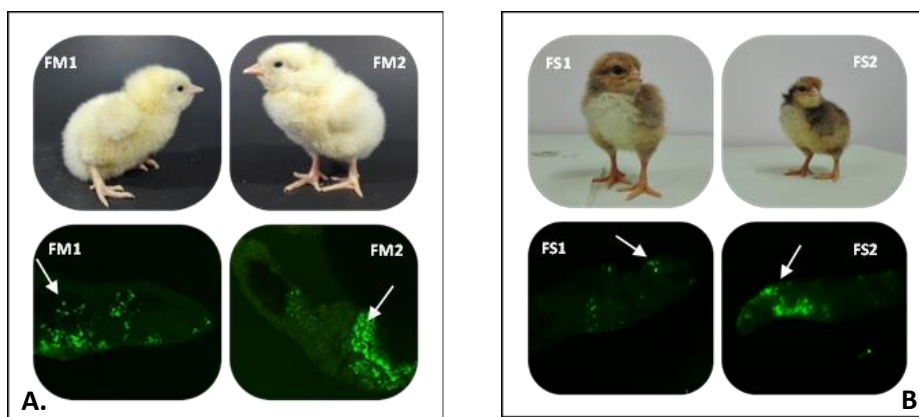


5. ábra: Az embrionális fejlődés 14. napján vizsgált háziyúk embriók ivarszervében (here-petefészek) található GFP-PGC integráció immunhisztokémiai jelölése. Zöld színnel a GFP-PGC, pirossal P63 őssejt specifikus antitest, kézzel a sejtmagfestés (ToPro®-3) látható.

A visszainjektált ősvarsejtek integrációs hatékonysága kikelt csibékben is ellenőrizve lett. Várhatóan a fehér magyar és fogolyszínű magyar fajtából egészséges, fenotípusosan semmilyen defektusban nem szenvedő állatok bújnak ki a tojásból. Mivel a transzgenikus organizmusokra vonatkozó

szigorú engedélyekkel az Intézet nem rendelkezik, így kibújást követően 6 órával az állatokból kíméletes eutanáziával megtörtént az ivarszervek boncolása.

Fehér magyar fajtából 9 csibét, míg a fogolyszínű magyar fajtából 3 csibét engedünk kikelni. Fehér magyar fajta esetében hím ivarú PGC-vel történő injektálásakor 4 csibe bújt ki, nőstény PGC injektálásakor 2. Mind a két esetben volt integráció az ivarszervben. 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. A kikelt csibéken semmilyen fenotípusos defektust nem volt megfigyelhető. Összesen 5 ivarszervi kiméra csibe bújt ki a tojásból (**6. ábra**). 2 tojós 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 recipiens volt.



6. 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.

3.3 Új tudományos eredmények

1. Megállapítottam, hogy az előzetesen hőkezelt tojó ivarú háziatyúk 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.
2. 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.
3. Hazánkban először sikeresen alapítottam GFP-t expresszáló embriókból ősvarsejtvonalakat, valamint igazoltam, hogy mind őssejt- mind pedig ősvarsejt specifikus markereket expresszálnak és ivarszervi kimérák létrehozására is alkalmasak.
4. Megállapítottam, hogy az injektált GFP- 4ZP PGC-k integrációs aránya a vizsgált őshonos fajták esetében nem tért el, viszont a GFP-5ZP PGC-k esetében a nőivarú kiméra ivarszervet tartalmazó embriók aránya magasabb volt. A fehér magyar és sárga magyar fajta esetében a 5ZP integrációs hatékonysága szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a fogolyszínű magyar fajtánál.
5. Injektálást követően a sárga magyar fajta szignifikánsan alacsonyabb túlélési aránnyal rendelkezett, mint a fehér magyar fajta.
6. A 4ZP PGC injektálást követően közel azonos arányban kaptunk hím és nőivarú kiméra ivarszervet tartalmazó embriókat, míg az 5ZP PGC injektálását követően magasabb volt a nőivarú kiméra ivarszervek aránya. Fehér magyar recipiens esetében ez a különbség jelentős volt.
7. 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 P63 expressziót mutatott.

4 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 valamint az állatok *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 kacsra vonatkozásában. A dolgozatomban ezen eljárások közül az egyik leghatékonyabbat vizsgáltam meg. A módszer hatására a génexpresszióban bekövetkező változások még

nem kutatottak. 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 *HSP70* expressziója nem változott a májban, szemben a többi hősokk faktoral, amiknek kiemelkedően magas expressziójuk volt.

Az ivarérett kakasok heréjében megemelkedett hősokkfehérje és hősokkfaktor expressziót mutattak ki Wang és munkatársai Tajvanon honos házityúk fajtán (Wang et al., 2013). 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. 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 *HSP3* expressziós szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a hőstresszt kapott állatoknál, mint a kontroll csoportban (Kang et al., 2019).

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 kitett állatokból származó ivarszervekben magasabb *HSP70* expressziót mutattak ki mint a kontroll csoportban, de ez nem minősült szignifikáns eredménynek (Anand et al., 2016).

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 házityúkknál 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.

Az ősvarsejtek alaposabb tanulmányozása Van de Lavoir és munkatársai által kifejlesztett tenyésztőművelő 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 tenyésztőművelő, 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 grádiens centrifugálást követően kitisztították az ősvarsejteket, majd ezekből alapítottak sejtvonalat. Az ősvarsejt vonalakon real-time PCR segítségével ősvarsejt specifikus marker expressziós szinteket vizsgáltak (*DAZL*, *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 expresszálta 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 visszakeresztezése nem transzgénikus tyúkokkal 2-16 % közötti transzgénikus utódot eredményezett. A tojó transzgénikus tyúkokat visszakeresztezték 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 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 sejtvonalakat ősvarsejt specifikus és őssejt specifikus markerekkel (*SSEAI*, *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.

4.1 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 termékenységi 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 ősvarsejtekben 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 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.

5 FONTOSABB TUDOMÁNYOS PUBLIKÁCIÓK

Az értekezés témájában megjelent impakt faktoralal 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): Öshonos 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., Váronyi, 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 faktorral nem rendelkező tudományos cikk:

- Tokodyné, Szabadi Nikolett; Sima, Krisztina; Tóth, Roland; **Lázár, Bence**; Patakiné, Várkonyi Eszter; Liptói, Krisztina; Gócza, Elen (2020): Hőstressz hatására aktiválódó fiziológiai válaszok házityúkban, a hőháztartás fenntartása érdekében. **ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS TAKARMÁNYOZÁS** (0230-1814): 69/1 pp. 41-52., 12 p.
- Tokodyné, Szabadi Nikolett; Tóth, Roland; **Lázár, Bence**; Gócza, Elen (2020): Klímaváltozás káros hatásainak kivédése baromfiban. In: Bihari, Erika; Molnár, Dániel; Szikszai-Németh, Ketrin (szerk.) *Tavaszi Szél - Spring Wind 2019*. I. kötet: Tanulmánykötet, Budapest, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ), pp. 164-171. 8 p
- 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.

Az értekezés témakörében tartott előadások:

TÓTH R., TOKODYNÉ SZABADI N., LÁZÁR B., PATAKINÉ VÁRKONYI E., LIPTÓI K., KÖRÖSINÉ MOLNÁR A., PAIN B., GÓCZA E. (2021): A fiatalkori hőkezelés hatása őshonos magyar házityúk fajtában. Keszthely Georgikon Kar, 2021. 07. 06. Előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., TOKODYNE SZABADI, N., PATAKINE VARKONYI, E., GOCZA, E. (2019): Comparison of three indigenous Hungarian chicken breeds as potential recipient for germline chimera production using GFP-expressing primordial germ cells. Bioengineering of Animal Resources. 2019. 05. 23. Timisoara, Romania. absztrakt, előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., ANAND, M., PATAKINE VARKONYI, E., LIPTOI, K., GOCZA, E. (2018): GFP-t expresszáló házityúk ősvarsejtek (PGC) izolálása, jellemzése és hosszú távú fenntartása. A Magyar Tudományos Akadémia 189. közgyűlése. 2018. 05. 18, Budapest MTA. Előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., ANAND, M., PATAKINE-VARKONYI, E., LIPTOI, K., GOCZA, E. (2018): Isolation, characterization and long-term culture of GFP-expressing chicken PGCs. Fiala Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2018), Budapest, 2018.03.28 – 2018.03.29., p16, ÁE4, ISBN: 978-963-315-370-3, absztrakt, előadás.

TOTH R., ANAND, M., ALAYU, K., NAGY, A., LAZAR, B., PATAKINEVARKONYI, E., LIPTOI, K., GOCZA, E. (2018): Madár ősvarsejtek alkalmazási lehetőségei a génmegőrzés területén, illetve a hőstressz hatásának tanulmányozásában. Kutatói utánpótlást elősegítő program II. szakmai konferencia publikáció, 29-34., 2017. 12. 14 – 2017. 12. 15. ISBN: 978-6155748-09-7, előadás.

TOTH, R., ANAND, M., LAZAR, B., NAGY, A., GOCZA, E. (2016): Hosszú távon in vitro fenntartott tyúk ősvarsejtek (PG sejtek) fejlődési potenciáljának vizsgálata. 22. Szaporodásbiológiai Találkozó, p22., 2016.11.11 - 2016.11.12., Kecskemét, absztrakt, előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., SÜDY, A., NAGY, A., KIDANE, A., ANAND, M., GOCZA, E. (2016): Bal-jobb aszimmetria kialakulásának követése az ivarszervek embrionális fejlődése során házityúkban. Kutatói utánpótlást elősegítő program I. szakmai konferencia publikációk, 45-49., 2016. 03. 03 – 206. 03. 04. ISBN: 978-963-89399-9-9 előadás.

Az értekezés témakörében bemutatott poszterek:

TOKODYNÉ SZABADI NIKOLETT, **TÓTH ROLAND**, LÁZÁR BENCE, BUDA KITTI, MOLNÁR MARIANN, PATAKINÉ VÁRKONYI ESZTER, LIPTÓI KRISZTINA, GÓCZA ELEN (2021): A hőkezelés hatásának vizsgálata a kezeléssel átesett házityúkok mRNS és miRNS expressziós profiljának tanulmányozásával. Szaporodásbiológiai Találkozó 2021. november 5-6. Marina Port Hotel, Balatonkenese.

TOTH, R., TOKODYNE SZABADI, N., LAZAR, B., LIPTOI, K., KOROSINE MOLNAR, A., PATAKINE VARKONYI, E., GOCZA, E. (2019): Examination the expression level of heat shock-related proteins and the effect of the heat-treatment in 2 days old and mature Hungarian chicken. ID 32. Proceeding of the XIth European 2 symposium on Poultry Genetics. pp. 86. ISBN: 978-80-907442-4-0. 2019. 10. 23 – 2019. 10. 25 Prague Czech Republic. absztrakt, poszter, rövid előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., ANAND, M., NAGY, A., PATAKINE VARKONYI, E., GOCZA, E. (2017): Comparison the germ and stem cell specific marker expression in male and female embryo derived chicken PGCs. Hungarian Molecular Life Sciences 2017, Eger, 2017.03.31-2017.04.02., Eger, P-138, pp240-241., ISBN: 978-615-5270-34-5, absztrakt, poszter.

TOTH, R., LAZAR, B., NAGY, A., ANAND, M., PATAKINE VARKONYI, E., GOCZA, E. (2017): Comparison the integration efficiency of the male or female chicken PGCs into the gonads. IDK 2017 Pécs, p176, 2017.05.19-21, Pécs, ISBN: 978-963-429-113-8, absztrakt, poszter-

TOTH, R., LAZAR, B., NAGY, A., ANAND, M., PATAKINE VARKONYI, E., GOCZA, E. (2017): Comparison the integration efficiency of GFP expressing male and female chicken PGCs into the embryonic gonads. Final Conference of COST Action BM1308 Sharing Advances on Large Animal Models – SALAAM, 2017.09.28. - 2017.09.29., Halle, Germany, P-25. absztrakt, poszter, rövid előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., SÜDY, A., NAGY, A., KIDANE, A., ANAND, M., GOCZA, E. (2016): Left-right asymmetry during the development of embryonic gonads in chicken. Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2016), Gödöllő, 2016.03.21 - 2016. 03.22., p65, APE13, ISBN: 978-963-269-536-5, absztrakt, poszter, rövid előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., SÜDY, A., NAGY, A., KIDANE, A., ANAND, M., GOCZA, E. (2016): Left-right asymmetry of embryonic gonads in Transylvanian Naked neck chicken. New Biotechnology, 33 (S), S212, P37-9, (IF: 3.199) (2015), 17th European Congress on Biotechnology, 2016.07.03 - 2016.07.06., Krakow, Poland, absztrakt, poszter.

Nem az értekezés témakörében tartott előadások:

TÓTH R., STEFANIE ALTGILBERS, WILFRIED A. KUES, HOFFMANN O., URBÁN M., GOCZA E. (2021): Vénusz és mCherry transzfektált őscsírasejtek vizsgálata. GBI-NAPOK Gödöllő, 2021. 12. 14-15.

TÓTH R. URBÁN M., BODROGI L., PINTÉR T., PEER G., BABARCZI B., SZŐKE ZS., GÓCZA E. (2021): Egyes mikotoxinok hatása házityúk és nyúl embriók fejlődésére. Egy a természettel magyarországi konferencia Balotaszállás, 2021. 09. 25. Előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., SÜDY, A., NAGY, A., KIDANE, A., ANAND, M., GOCZA, E. (2016): Bal-jobb aszimmetria kialakulásának követése az ivarszervek embrionális fejlődése során házityúkban. Kutatói utánpótlást elősegítő program I. szakmai konferencia publikációk, 45-49., 2016. 03. 03 – 206. 03. 04. ISBN: 978-963-89399-9-9 előadás.

Nem az értekezés témakörében bemutatott poszterek:

TÓTH ROLAND, URBÁN MARTIN, BODROGI LILLA, PINTÉR TÍMEA, ECKER ANDRÁS, PEER GABRIELLA, BABARCZI BIANKA, SZŐKE ZSUZSANNA, GÓCZA ELEN (2021): Mikotoxinok hatásának vizsgálata a házityúk és nyúl embriók fejlődésére. Szaporodásbiológiai Találkozó 2021. november 5-6. Marina Port Hotel, Balatonkenese.

TÓTH ARNOLD, HOFFMAN ORSOLYA, GÓCZA ELEN, **TÓTH ROLAND** (2021): Házityúk embriók ivarszervének fejlődésében szerepet játszó gének feltérképezése. Szaporodásbiológiai Találkozó 2021. november 5-6. Marina Port Hotel, Balatonkenese.

TOKODYNÉ SZABADI NIKOLETT, **TÓTH ROLAND**, LÁZÁR BENECSE, BUDA KITTI, MOLNÁR MARIANN, PATAKINÉ VÁRKONYI ESZTER, LIPTÓI KRISZTINA, GÓCZA ELEN (2021): A hőkezelés hatásának vizsgálata a kezelésen átesett házityúkok mRNS és miRNS expressziós profiljának tanulmányozásával. Szaporodásbiológiai Találkozó 2021. november 5-6. Marina Port Hotel, Balatonkenese.

SZŐKE ZSUZSANNA, PEER GABRIELLA, BABARCZI BIANKA, **TÓTH ROLAND**, SÜKÖSD FARKAS, SZEMETHY LÁSZLÓ, LAKATOS ISTVÁN (2021): Egyes vadfajokat érintő mikotoxin vizsgálatok eredményei. Világkiállítás keretében megrendezett Balotaszállási szakmai nap. 2021.09.25 OWN.

URBÁN MARTIN; **TÓTH ROLAND**; SZŐKE ZSUZSANNA; EBBIN NA; PINTÉR TÍMEA; BODROGI LILLA; GÓCZA ELEN (2021): The effects of T-2 toxin and zearalenon on the embryonic development of rabbit and chicken. 2nd Conference of the Visegrád Group Society for Developmental Biology. Szeged, 2021.09.02. - 2021.09.05. (Magyar Genetikusok Egyesülete)

TÓTH ROLAND; STEFANNIE ALTGILBERS, WILFRIEN A. KUES, GÓCZA ELEN (2021): Examination of Venus and mCherry transfected primordial germ cells. 2nd Conference of the Visegrád Group Society for Developmental Biology. Szeged, 2021.09.02. - 2021.09.05. (Magyar Genetikusok Egyesülete)

TOTH, R., LAZAR, B., SÜDY, A., NAGY, A., KIDANE, A., ANAND, M., GOCZA, E. (2016): Left-right asymmetry during the development of embryonic gonads in chicken. Fialat Biotechnológusok Országos Konferenciája (FIBOK 2016), Gödöllő, 2016.03.21 - 2016. 03.22., p65, APE13, ISBN: 978-963-269-536-5, absztrakt, poszter, rövid előadás.

TOTH, R., LAZAR, B., SÜDY, A., NAGY, A., KIDANE, A., ANAND, M., GOCZA, E. (2016): Left-right asymmetry of embryonic gonads in Transylvanian Naked neck chicken. *New Biotechnology*, 33 (S), S212, P37-9, (IF: 3.199) (2015), 17th European Congress on Biotechnology, 2016.07.03 - 2016.07.06., Krakow, Poland, absztrakt, poszter.

6 IRODALOMJEGYZÉK

- 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).
- 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.
- 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).
- 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).
- van de Lavoie, M.-C., E. J. Collarini, P. A. Leighton, J. Fesler, D. R. Lu, W. D. Harriman, T. S. Thiyyagasundaram, and R. J. Etches. 2012. Interspecific Germline Transmission of Cultured Primordial Germ Cells (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. Patakine Várkonyi. 2021. Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. *Poult. Sci.* 100:101207.
- 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/>.
- 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).
- 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).
- 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.

- 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).
- 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.
- 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).
- 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).
- 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).
- 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_sPqPMJrbLEnnaUhTtJwiZfwZV6ndo-7TDrPmSMMn0bcwed9UQedRhoC5CMQAvD_BwE (verified 28 March 2022).
- 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).
- 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).
- 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).
- 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, 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.
- Whyte, J., J. D. Glover, M. Woodcock, J. Brzezczynska, 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.
- 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, 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/>.
- 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.