

DOKTORI (Ph.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

ECKER ANDRÁS

GÖDÖLLŐ

2024



Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem

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

DOI: 10.54598/005940

Ecker András

Gödöllő

2024

A doktori iskola

megnevezése: Állatbiotechnológiai és Állattudományi Doktori Iskola

tudományága: Mezőgazdasági Biotechnológia

vezetője: **Dr. Mézes Miklós (D.Sc.)**

az MTA rendes tagja, egyetemi tanár, Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem Mezőgazdaság- és Környezettudományi Kar, Állattudományi Alapok Intézet, Takarmányozástani Tanszék

Témavezető: **Dr. Gócza Elen (D.Sc.)**

az MTA levelező tagja, tudományos tanácsadó, kutatásért felelős intézetigazgató-helyettes, tanszékvezető, csoportvezető

MATE, GBI, Állatbiotechnológiai Tanszék

Alkalmazott Embriológia és Össejtbiológia Csoport

Társ-témavezető: **Dr. Várkonyi Eszter (C.Sc.)**

tudományos főmunkatárs

Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ

Haszonállat-génmegőrzési Intézet

.....

Az iskolavezető jóváhagyása

Prof. Dr. Mézes Miklós, MTA doktora

.....

A témavezető jóváhagyása

Dr. Gócza Elen, MTA doktora

.....

A társtémavezető jóváhagyása

Várkonyi Eszter C. Sc.

1. Tartalomjegyzék

1. Tartalomjegyzék	3
2. Munka előzményei, célkitűzések	5
Célkitűzések:	6
3. Anyag és módszer	7
A fehér magyar tyúkfajta bemutatása.....	7
Állatkísérleti engedélyek.....	7
Az állományok tartástechnológiája.....	8
Az ősvarsejtek izolálása.....	8
Az ősvarsejt-vonalak alapítása és fenntartása	8
Ivarmeghatározás	9
RNS expressziós vizsgálatok	9
Immunhisztokémiai vizsgálatok	10
A sejtvonalak mélyhűtése és felolvasztása.....	10
Plazmid izolálás	11
Elektroporálás	11
Transzgénikus sejtvonalak alapítása és fenntartása	12
Egysejt alapú klóntenyészetek alapítása	12
A beépülési potenciál vizsgálata: FUCCI sejtek injektálása recipiens embriókba	13
Kromoszóma vizsgálatok.....	14
DNS szekvenálás a transzgén beépülésének igazolására	14
Mikotoxinkezelés alkalmazása a sejtciklus befolyásolására.....	15
Timelapse videók készítése a transzgén működésének igazolására.....	16
Statisztikai analízis.....	16
4. Eredmények és azok megbeszélése.....	17
Alapítási statisztika	17
Ivarmeghatározás	17
RNS expressziós vizsgálat	17
Immunhisztokémiai vizsgálat	17

Transzgénexpressziós eredmények az elektroporálást követően	18
Transzgénexpressziós eredmények a klónozást követően	18
A klón sejtvonalak karakterizálási eredményei.....	18
Sejtintegráció hatékonysága recipiens embriókba	19
Szekvenálási eredmények	20
A sejtek reakciója mikotoxin hatására és a médiumcsere hiányára	20
Sejtek transzgénexpressziós változásainak bizonyítása	22
5. Következtetések és a javaslatok	23
6. Új tudományos eredmények.....	27
7. Fontosabb publikációk	28
8. Irodalomjegyzék.....	30

2. Munka előzményei, célkitűzések

A termelésből kiszoruló fajták védelmét génmegőrzéssel próbálják megoldani különböző állami és civil szervezetek. Többféle génmegőrzési módszer létezik, amelyeken belül megkülönböztetünk *in vivo* és *in vitro* lehetőségeket. A génmegőrzéshez használt sejt- vagy szövettípus a megőrzendő faj függvényében változik. Emlősök esetén a spermamélyhűtés technológiája a legszéleskörűbben bevett módszer (Ugur et al., 2019; Yáñez-Ortiz et al., 2022). Madárfajok esetén azonban, köszönhetően a madarak speciális szaporodásbiológiai sajátosságainak, ez a technológia csak részmegoldást jelent. Ígéretes eredményeket mutat ezen a téren az ősvarsejtek (primordial germ cells, PGCs) (Petitte, 2006) vagy a gonádszövetek mélyhűtése (Hu et al., 2022; Liptoi et al., 2013; Liptoi et al., 2020; Tiambo et al., 2021), azonban ezek a módszerek a legtöbb fajban még fejlesztésre szorulnak.

Az ősvarsejtek unipotens sejtek, melyek az ivarsejtek elősejtjei (Kimura and Nakano, 2011). Felhasználásuk a kutatásban rendkívül széleskörű, ugyanis a génmegőrzés (Lázár et al., 2021) mellett szaporodásbiológiát érintő állategészségügyi kísérletekben (Trefil et al., 2017), ivarszervi kiméra egyedek előállításában (Tajima et al., 1998) valamint a madarak transzgenezisében (Divya et al., 2021) is jelentős szerepet játszanak. Házityúk fajban a PG-sejtek izolálása és tenyésztése jól megoldható, köszönhetően a megfelelően működő módszerek és tenyésztőmédiumok leírásának. Ezen *in vitro* tenyészetek kiváló alapot biztosítanak a fent említett kutatások elvégzéséhez, amennyiben a sejt kultúrák kielégítő számú és egészségi állapotú sejtből állnak. Ennek ellenőrzésére többféle módszer áll rendelkezésünkre, azonban ezek jó része káros lehet a sejtekre nézve, így csak kisszámú sejten végzett mérések alapján következtethetünk a teljes tenyészet állapotára.

Egy teljes tenyészet monitorozásához szolgáltat lehetőséget a FUCCI (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator) transzgén komplex. Ez az eszköz a sejtciklus során periodikusan expresszáló fehérjék jelenségére

alapoz (Blow and Dutta, 2005). Mivel a sejtciklus bizonyos szakaszain az arra a szakaszra specifikus fehérjék termelődnek a sejtben, ezekhez a fehérjékhez különböző színű fluoreszcenciával jelölt riportergént kapcsolva a sejt ciklikus színváltozáson mehet keresztül a sejtosztódás lépcsői során. Ezzel olyan sejtenyészeteket hozhatunk létre, amelyeken megfelelő gerjesztéssel a teljes tenyészetet figyelembe véve vizsgálhatjuk a sejtek aktuális egészségi állapotát és alkalmasságát kísérleti felhasználásra.

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

Célkitűzések:

A kísérlet során kitűzött célok a következők voltak:

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

3. *Anyag és módszer*

A fehér magyar tyúkfajta bemutatása

A magyar tyúkfajtákra általánosságban jellemző a közepes testméret (tyúkoknál 2,0-2,3 kg, kakasoknál 2,5-3,0 kg átlag), a jól fejlett, domború mellizom, a magasan tűzött szárny és a mély tojóhas. Lábuk középhosszú, sárga. Fejük kicsi, koponyacsontjuk domború, csőrük rövid, de erős tövű. A taréj közepes mértű, csipkézett fűrésztaraj, mely hátranyúló, felálló, de tojók esetén sokszor dőlt. Az áll-lebeny lekerekedő, a füllebeny ovális, élénkvörös. Mivel a fajta kettőshasznosítású, jó minőségű, finom rostú, ízletes hússal rendelkezik, de emellett tojástermelése sem elhanyagolható (140-150 db/év). Kísérletünkhöz azért ezt a fajtát választottuk, mert a vele végzett *in vitro* műveletek már jól meghatározottak, és Lázár Bence kollégám által körültekintően dokumentáltak (Lázár et al., 2021).

Állatkísérleti engedélyek

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

Az állományok tartástechnológiája

Az őscsírasejt-tenyészetek alapításához használt tojások az NBGK HGI génbanki állományából származtak. Az állatokat kültéri kifutóval rendelkező ólakban tartották, 5-6 egyed/m² állománysűrűséggel és 7 tojó 1 kakas ivararányban. A tojásrakás kétszintes tojófészkekben történt, 5 tojó/tojófészek használati intenzitással. Az állomány takarmányozása tojótáppal történt, *ad libitum*. A tápot a jobb tojásmínőség érdekében mészgittel egészítették ki. A tojásokat naponta kétszer gyűjtötték, majd hűtött tojástartólóba helyezték őket. Maga a keltetés már a MATE GBI laboratóriumában történt Midi F500S keltetőgépben (PL Machine Kft. Tárnok, Magyarország), 37,8°C hőmérsékleten, 70% páratartalommal, óránként kétszeri 45°-os forgatással.

Az ősvarsejtek izolálása

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

Az ősvarsejt-vonalak alapítása és fenntartása

Az ősvarsejteket tartalmazó vért PGC tenyésztőművelő cseppentettem. Ennek a tápoldatnak a segítségével már 2-3 hét elteltével az izoláció után stabil ősvarsejt-tenyészetek nyerhetők. A tápoldatot a tenyészeteken egy héten háromszor (hétfő-szerda-péntek) cseréltem. A sejttenyészeteket CO₂-

termosztátban (Sanyo MCO-19AIC (UV) Incubator, Sanyo, Japán) 38°C hőmérsékleten, magas páratartalom és 5% CO₂ koncentráció mellett tartottam fent.

Ivarmeghatározás

Az ivarmeghatározáshoz a mélyhűtött embrionális szövetmintákat felolvasztottam és kit (High Pure PCR Template Preparation Kit, Roche Diagnostics, 11796828001, USA) segítségével izoláltam belőlük a DNS-t. Az ivarmeghatározáshoz a CHD1 primerpárt használtam (Griffiths et al., 1996; Lee et al., 2010). A PCR-t a ProFlex PCR System (Applied Biosystems, USA) segítségével végeztem. A kapott termékeket gélelektroforézissel vizsgáltam.

RNS expressziós vizsgálatok

A stabil sejttenyészetekből sejtmintákat gyűjtöttem. Az RNS izolálást a felolvasztást követően, 125 µl tiszta etanol hozzáadása után az RNAaquarius™-Micro Total RNA Isolation Kit (Thermo Fischer Scientific, AM1931, USA) protokollja szerint végeztem. 15 µl mintát 15 µl MasterMix-szel kevertem össze, utóbbit a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, 4368814, USA) leírása szerint állítottam össze.

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

System (Eppendorf, Németország) gépet használtam. Referencia festékként ROX-ot használtam.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

A fixálás 4%-os PFA-val (Fluka, 30525-89-4, Svájc) történt. Ezután blokkoló oldatot (PBS, 0,1% BSA, 0,1% TritonX (Fluka, 93426, Svájc), 2,5% szamar szérum) tettem a mintákra. Össejtspecifikus anti-SSEA-1 (Millipore, MC480, Németország) és ivarsejt-specifikus anti-CVH (Dr. Bertrand Pain, Stem cell and Brain Research Institute (SBRI), Lyon, Franciaország) elsődleges ellenanyagokat használtam, előbbit az Anti-Mouse-IgM-rD549® (Jackson ImmunoResearch, 715-505-140, USA) vörös másodlagos ellenanyaggal, utóbbit az Alexa Fluor® 488 Anti-Rabbit-IgG (H+L) (Life Technologies/Molecular Probes, A-21207, USA) zöld másodlagos ellenanyaggal párosítottam. Mélyvörös TO-PRO™-3 jodid (642-661) (Invitrogen, T3605, USA) nukleuszfestéket használtam minden mintánál (Bink et al., 2001), amit aztán digitális módosítással kék színnel jelöltünk a képeken. Ezután a mintákat ProLong Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen, P36962, USA) fedőoldattal és fedőlemezzel borítottam. A kész minták kiértékelését Leica TCS SP8 konfokális mikroszkóp (Leica, Németország) segítségével végeztem.

A sejtvonalak mélyhűtése és felolvasztása

Az ideális sejtszám (kb. 80.000 sejt/300 µl médium) és tisztaság ellenőrzését a NanoEntek Arthur fluoreszcens sejtszámoló géppel (NanoEntek, Dél-Korea) végeztem a sejtek mérete és alakja alapján. A mélyhűtésnél a Kong és mtsai által kidolgozott FAM2 mélyhűtő médiumot használtam (Kong et al., 2018). A mintákat -150°C-os fagyasztóban tároltam.

A felolvasztás során a mintákat 90 másodpercig 38°C-os vízfürdőbe helyeztem, majd a lehető leggyorsabban 900 µl 3:1 DMEM+víz keveréket adtam hozzájuk, hogy a hígítással enyhítsem a DMSO káros hatását. A sejteket centrifugáltam, a felülúszót leszívtam, és újabb mosást követően tápoldatban

szuszpendálva plate-re helyeztem ki őket. A sejtvonalak felvételét követően két napig naponta cseréltem médiumot a tenyészeteken, hogy biztosítsam a megfelelő körülményeket a sejtek akklimatizációjához.

Plazmid izolálás

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

Elektroporálás

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

100 μ l sejtszuszpenzió elektroporálásához 10 μ g plazmid DNS-re volt szükség, amit 8 μ l oldatban oldottam fel. A FUCCI plazmid és a hyPBase enzim aránya a reakcióban 1:1, így 4-4 μ l oldatban 5-5 μ g volt a plazmid mennyisége, így 1,2 μ g/ μ l lett a plazmid végső koncentrációja. A transzfektáláshoz a Neon Transfection System (Invitrogen, MPK5000, USA) elektroporátort és kiegészítőit használtam. A gép beállításai a következők voltak: 1300 V feszültség, 10 ms időtartam és 4 ismétlés.

Transzgénikus sejtvonalak alapítása és fenntartása

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

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

Egysejt alapú klóntenyészetek alapítása

A tiszta transzgénikus tenyészetek létrehozása érdekében egysejt alapú klóntenyészeteket alapítottam. Cseppekből válogattam ki a fluoreszcens sejteket üveg mikrokapillárisal ellátott szájpipetta segítségével. A kiválasztott sejteket 96-lyukú szövettenyésztő plate 70 μ l médiumot tartalmazó lyukaiba cseppentettem.

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

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

A beépülési potenciál vizsgálata: FUCCI sejtek injektálása recipiens embriókba

Sejtszámolás segítségével kialakítottam az injektáláshoz ideális 5000 sejt/ μ l koncentrációt. A szuszpenziókat a kísérlet megkezdéséig (de maximum néhány órára) 1,5 ml-es csövekben az inkubátorba helyeztem 38°C-on.

Az injektáláshoz fehér magyar házityúk tojásokat inkubáltam. A tojásokat a laborban fertőtlenítettem, majd csipesszel óvatosan ablakot nyitottam a méshéj tetején, valamint a légkamránál is. Eltávolítottam az ablaknál a membránt, néhány csepp PBS-sel megakadályoztam az embrió kiszáradását, majd szájpipettára rögzített üveg mikropillárisba 2 μ l melegített sejtsuszpenziót szívtam, és a kapillárist az embrió szívcsövébe vezetve a sejteket a véráramba injektáltam. A tojást ezután UV-fény alatt sterilizált parafilmmel lezártam, és az embriót az ablakkal ellentétes oldalra forgatva visszahelyeztem azt a keltetőbe.

Az injektált embriókat a keltetés 7. napján kibontottam a tojásokból és izoláltam a gonádokat. Az izolált gonádokat frissen sztereomikroszkóp alatt vizsgáltuk és fotóztuk, hogy bizonyítsuk a fluoreszcens jel jelenlétét.

Kromoszóma vizsgálatok

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

DNS szekvenálás a transzgén beépülésének igazolására

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

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

A szekvenálás minőségét a FastQC program segítségével ellenőriztük az illesztés előtt (Andrews, 2010). A kapott readeket ezután a teljes genomhoz igazítottuk (bGalGal1.mat.broiler.GRCg7b, Ensembl 110. kiadás) (Martin et al., 2023), kiegészítve a FUCCI vektor fasta szekvenciájával. A PB_CAG_FUCCI szekvenciát a legjobb minőségű genomi szekvenciához adtuk hozzá extra kontigként. A komplementált genomot ezután indexáltuk, és a readek-et a DNS-szekvenciák nagy referencia genomhoz való illesztésére szolgáló bwa-mem2

szoftvercsomag segítségével illesztettük össze (Vasimuddin et al., 2019). Az illesztési paramétereket alapértelmezettre állítottuk.

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

Mikotoxinkezelés alkalmazása a sejtciklus befolyásolására

A kísérletben 5ng/ml T-2 és 20ng/ml zearalenon koncentrációt, valamint ezek kombinált hatását vizsgáltam. A mikotoxinokat Dr. Szőke Zsuzsanna (Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Szaporodásbiológiai és Toxikológiai Csoport) szolgáltatta a kísérlethez.

A mikotoxinokat PGC tenyésztőmédiumban oldottam fel. A kísérlet folyamán végig betartottam a mikotoxinoknál kötelező munkavédelmi és veszélyes hulladék kezelési szabályokat. Az FCF5 és FCM5 vonalakból származó sejteket 12 lyukú plate-re helyeztem 20.000 sejt/lyuk sejtszámmal, majd három napon keresztül mikotoxin tartalmú médiummal kezeltem a PGC-eket, médiumcsere nélkül. A kísérlet előtt és után konfokális mikroszkóp alatt vizsgáltam a sejtek fluoreszcenciáját. Mintánként 5 képet készítettem 10x-es nagyítású objektívvel, amiket a KALSZÁM program (Kalcsevszki Ákos által,

konfokális mikroszkópos felvételek analizisére kifejlesztett Java alapú program) segítségével elemeztem, hogy megállapítsam a fluoreszcencia arányát a tenyészetekben.

Timelapse videók készítése a transzgén működésének igazolására

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

Statisztikai analízis

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

4. Eredmények és azok megbeszélése

Alapítási statisztika

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

Ivarmeghatározás

A PCR segítségével történő ivarmeghatározás alapján elmondható, hogy a 20 alapított sejtvonalból 14 hímivarú, míg 6 minta nőivarú volt. Ez 70%-os hím és 30%-os tojó eredetű sejtvonal részaránynak felel meg. A kísérletbe az 1111-es jelölésű tojó, és az 1116-os jelölésű hímivarú sejtvonalat választottuk, mivel ezek rendelkeztek a legígéretesebb proliferációs képességgel.

RNS expressziós vizsgálat

A qPCR alapján megállapítottam, hogy mindkét általam választott sejtvonal expresszálta az ivarsejt-specifikus markereket, így alkalmasak nemcsak a génbanki megőrzésre, hanem további kísérletekben való felhasználásra is.

Immunhisztokémiai vizsgálat

A konfokális mikroszkóppal készített fotók alapján mindkét sejtvonal expresszálta mindkét markert, így ismét sikerült alátámasztani, hogy megfelelő állapotú PG-sejtekkel tudtam megkezdeni a kísérletet. Az immunfestés lépését a transzgenezisen átesett sejtvonalakon már nem ismételt meg, ugyanis a

FUCCI zöld/piros fluoreszcenciája interferált volna a rendelkezésünkre álló másodlagos ellenanyagok szignáljával.

Transzgénexpressziós eredmények az elektroporálást követően

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

Transzgénexpressziós eredmények a klónozást követően

A tenyészetek minőségének folyamatos monitorozásával sikerült meghatározni azt a pontot, amikor a vonalak megfelelőek voltak az egy sejt alapú tenyészetek alapítására. Ezt az időpontot az Arthur fluoreszcens sejtszámlológéppel készült felvételek, valamint a konfokális mikroszkóppal készített fotók alapján sikerült meghatározni a tenyészetben jelen levő fluoreszcencia megoszlása alapján. Az adatok alapján egyértelmű volt, hogy a klón tenyészetekben jelentősen magasabb arányban képviselték magukat a fluoreszcens sejtek, mint a kiindulási transzgénikus vonalakban. Ez az emelkedés a hímivar esetén 52%, míg a nőivarban 8% volt. A nőivarban tapasztalt kisebb emelkedés feltehetően részben a vonalnál megfigyelt alacsonyabb proliferációs rátának, részben a nőivarú PGC tenyészetekre általánosságban jellemző aggregációképzésnek tudható be.

A klón sejtvonalak karakterizálási eredményei

Az egyetlen sejt kiindulási alapból tenyésztett FCF5 és FCM5 sejtvonalakat a fentiek szerint, valamint annak kiegészítésével jellemeztem. Az eredmények

alapján mindkét sejtvonal a hosszútávú *in vitro* tenyésztés ellenére is megőrizte a jellegzetes ivari- és összejt génexpressziós tulajdonságait. Mindkét vonal esetén a vártnak megfelelő ivar eredményt kaptam (FCF5 valóban tojó eredetű, FCM5 valóban hím eredetű, nem történt technikai hiba a hosszú tenyésztési idő során), valamint a transzgenezis ellenére is stabilan expresszálták a CVH és DAZL markereket. A génexpressziós eredmények azt mutatták, hogy az elektroporálás nem gyakorolt semmilyen szignifikáns hatást ezen két gén működésére. Az immunhisztokémiai vizsgálatok megismétlésére a fluoreszcens interferencia miatt nem volt lehetőség. Egyik klón sejtvonal esetében sem található kromoszómaszám eltérés. A vizsgálatok szerint mindkét sejttenyészet 8 pár makrokromoszómát és 30 pár mikrokromoszómát tartalmazott, míg az FCF5 a ZW ivari kromoszómapárt, az FCM5 pedig a ZZ ivari kromoszómapárt hordozta. Tehát a sejtvonalak diploid kromoszóma száma $2n = 78$.

Sejtintegráció hatékonysága recipiens embriókba

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

Szekvenálási eredmények

A transzgén beépülésének igazolása érdekében két általam létrehozott egy sejt eredetű sejtvonalon szekvenálást végeztettünk, hogy megállapíthassuk a konstrukció integrációjának számát, illetve az integrációk elhelyezkedését a genomban. Az FCM5 sejtvonal esetén két lókuszon is sikerült kimutatni szekvenciaegyezést, ezek a NC052533.1: 50 890 131 (chr2) és a NC_052543.1: 13 339 941 (chr12) koordinátákkal rendelkeznek, melyek a GLI3 és a CADPS kódoló régiói. Mindkét inszerció esetén intronba történt a beépülés. Az FCF5 sejtvonal esetén egy beépülésről számolhatok be, mely a NC052558.1:3028482 (chr27) koordinátánál található, amely egy intergénikus régió, a legközelebb eső génnek a (Ensembl ID, no name) LOC121107680 és a NGFR (anotációs verzió: Ensembl release 110). A két sejtvonal mindhárom integrációjára igaz, hogy egy TTA szekvencia után helyezkednek el.

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

Emellett állandó fals pozitív jelet észleltem minden minta esetén (transzgénikus és nem transzgénikus) a NC_052545.1:4183720-4185523 (chr14) helyen. Ez az ACTB gén kódoló régiója, és minden esetben hasonló számú mellérendelt read-et találtam. Ez azonban szerintem azzal magyarázható, hogy a fehér magyar tyúk genomjában is megtalálható az általunk használt házityúk béta aktin promóter, és ennek a jelét kaptam vissza a mérés során.

A sejtek reakciója mikotoxin hatására és a médiumcsere hiányára

A kapott adatok alapján úgy tűnt, hogy a T2 toxin három nap alatt szignifikánsan megnövelte a piros, G₁ fázisban levő sejtek arányát mindkét

tenyészetben, míg a zöld G₂-es sejtek aránya mindkét tenyészetben, a sárga S fázisban levő sejtek aránya pedig a hímivarú sejtvonalban szignifikánsan csökkent.

A második fázisban a tenyészeteket 20ng/ml koncentrációjú zearalenon toxinnal kezeltük, a mérés menete megegyezett a fentiekben leírtakkal. Az eredmények szintén nagyban hasonlítottak a T2 kezelés után tapasztaltakhoz, a hímivar esetén mindhárom állapotban, a nőivar esetén a G₁ és G₂ fázisokban mutattak erős szignifikanciát az adatok.

Végül a két mikotoxin együttes hatására is kíváncsiak voltunk, hogy ellenőrizzük az esetleges erősítő/gyengítő kölcsönhatásokat közöttük. Ennek érdekében egyszerre alkalmaztunk 5ng/ml T2 és 20ng/ml zearalenon tartalmú médiumot a sejteken. Az eredmény ismételten a már leírt sémát követte: a vörös sejtek arányának megnövekedése és a zöld sejtek arányának csökkenése mindkét sejtvonalban szignifikáns volt, míg a sárga sejtek arányának csökkenése a hímivarú sejtek esetén mutatott szignifikanciát.

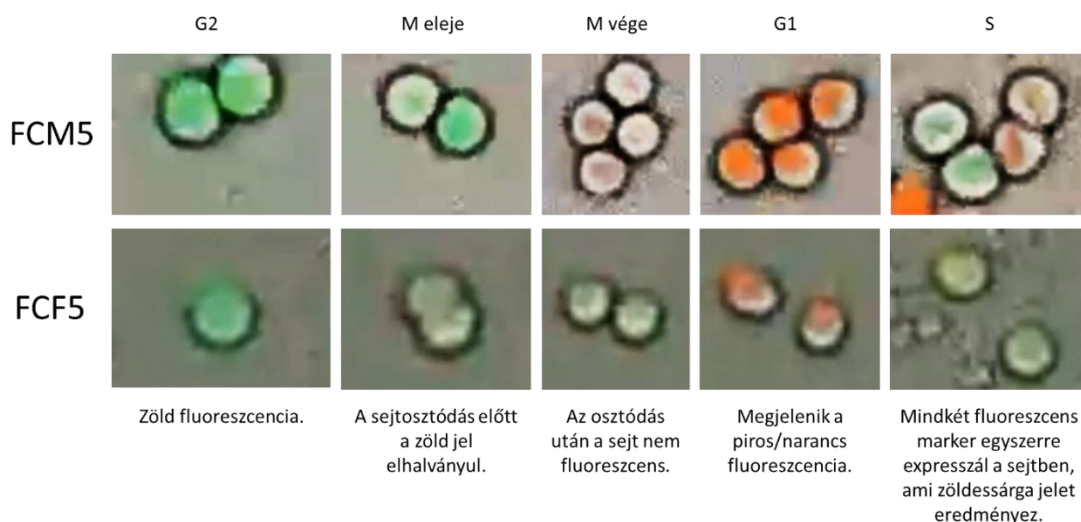
Azonban, mivel a mikotoxinkezelés során nem történt médiumcsere a sejteken, így lehetőségem nyílt annak a vizsgálatára is, hogy egy háromnapos friss médium nélküli időszak hogyan hat a sejtek proliferációjára. Ennek érdekében megismétltem a kísérletet mikotoxinkezelés nélkül is. Az így kapott eredmények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

Ezek alapján az a következtetés vonható le, hogy bár a mikotoxinhatás mérésekor az eredményt befolyásolhatta a médiumcsere elmaradása, az adatok szórása a mikotoxinkezelés esetén jóval kisebb volt, ami a mikotoxinok jelenléte által kiváltott drasztikusabb hatásokat bizonyítja. Ennek megerősítésére a

mikotoxinhatás kísérlet megismétlését tervezem rendszeres médiumcserével, hogy kiszűrjem a friss médium hiányának hatását az eredményekből.

Sejtek transzgénexpressziós változásainak bizonyítása

A sejtek fluoreszcenciájának ciklikus változását automata mikroszkóp segítségével vizsgáltam. A készült képsorozatot a Fiji programmal analizáltam és készítettem belőle timelapse videót a jobb vizualizálás érdekében. Ez alapján egyértelműen megfigyelhető, ahogy a sejtek osztódás után pirosan fluoreszkálnak, majd egy rövid sárga szakaszt követően zöld színre váltanak, végül a következő sejtosztódás előtt elvesztik a színüket (1. ábra).



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

5. Következtetések és a javaslatok

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

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

Az irodalmi áttekintésben bemutatott néhány kutatással igyekeztem felvázolni egy transzgénikus technológia új fajra való adaptálásának nehézségeit, valamint azt is, hogy a múltban folytatott kutatások hogy segítettek hozzá engem egy már részletesen kidolgozott, jól működő eszköz eléréséhez. Emellett jól bemutatják a FUCCI transzgénikus vonalakban rejlő lehetőségeket. Az eredményeimből az a következtetés vonható le, hogy ennek a technikának az adaptálása nagy gazdasági haszonnal rendelkező állatfajokra fontos

információkat szolgáltathat azok fejlődésbiológiai tulajdonságairól, külső tényezőkre adott reakcióikról és a szaporodásbiológiájukat befolyásoló tényezőkről. Az általunk választott házityúk faj emellett remek modell az embriológiai fejlődés vizsgálata szempontjából, míg a létrehozott ősvarsejt-vonalak értékes adatokkal szolgálhatnak az ivarszervek és ivarsejtek kialakulását befolyásoló hatásokról.

Kísérleteim során megfigyeltem, hogy mikotoxinok jelenlétében a tenyészetek sejtosztódás-szinkronizációra utaló magatartást mutatnak, ugyanis voltak olyan mintáim, amikben a sejtek 100%-a piros expresszióval rendelkezett, vagyis G_1/G_0 fázisban maradtak. Ez összhangban van olyan megfigyelésekkel, melyek szerint az alacsony hőmérséklet okozta stressz is sejtciklus-szinkronizációt vált ki (Enninga et al., 1984). Sejtciklus szintronizálás terén már többféle módszert kifejlesztettek, akár fizikális (a sejtek mérete, sűrűsége alapján válogatják szét a különböző stádiumú sejteket centrifugálás, áramlási citometria, vagy dielektroforézis segítségével) vagy kémiai (mitotikus szelekció, DNS szintézis inhibíció, szérummegvonás) módszerekkel (Banfalvi, 2016). Az általunk tapasztalt jelenség dokumentálása jól bizonyítja, hogy a Fucci sejtvonalak kiválóan alkalmasak különböző környezeti stresszhatások következményeinek vizsgálatára.

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

B1) mikotoxin bevonását az ilyen típusú vizsgálatokba. Ugyanígy érdemes a különböző mikotoxinok kombinált hatásait vizsgálni.

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

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

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

Az általam létrehozott sejtvonalak a laboratóriumokban általánosan használt technikák fejlesztésére is alkalmasak lehetnek. A PGC-k az embrionális fejlődés során nem egyenletesen proliferálnak, így egyes fejlődési szakaszok optimálisabbak lehetnek bizonyos műveletek (pl. kiméra gonád izolálás) végrehajtására, mint mások. Ehhez jó eszközt biztosítanak a FUCCI sejtvonalak.

Szintén érdemes lehet protokollt fejleszteni egy teljes tenyészet sejtciklusának szinkronizálására, mivel bizonyos fejlődési stádiumban levő sejtek esetleg jobb hatásfokkal épülhetnek be a gonádokba és biztosabban alapíthatnak kolóniákat, mint más sejtek. Emellett szinkronizált sejtvonalak létrehozásával nagyban fejleszthetnénk akár az ivarszervi kiméraelőállítás hatásfokát, akár a PGC-alapú transzgenezis hatékonyságát is.

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

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

6. Új tudományos eredmények

Új tudományos eredményeim a következők:

1. Optimalizáltam és sikeresen alkalmaztam a piggyBac transzpozon közvetítette elektroporálás módszerét FUCCI riporter vektor hatékony bejuttatására háztípus-ősivarsejtekbe.
2. Elsőként hoztam létre hímváru (ZZ genotípusú) és nőiváru (ZW genotípusú), a FUCCI vektort stabilan integrálódva tartalmazó háztípus ősváru sejt tenyészetekből kiindulva egy sejt eredetű ősváru sejt vonalakat.
3. Igazoltam, hogy az általam létrehozott egy sejt eredetű, a FUCCI vektort stabilan integrálódva tartalmazó FCF5 (ZW) és FCM5 (ZZ) ősváru sejt vonalak sejtjei képesek beépülni recipiens embriók ivarszervébe.
4. Teljes genom szekvenálással igazoltam, hogy a FUCCI vektor az FCF5 sejt vonal esetén egy kópiában, míg az FCM5 sejt vonal esetében két kópiában integrálódott a sejt genomjába.
5. Az FCM5 és FCF5 sejt vonalak esetében igazoltam timelapse videó felvételek készítésével és elemzésével, hogy a sejt által expresszált fluoreszcens fehérje kifejeződése a sejt ciklus fázisainak megfelelően változik.
6. Igazoltam, hogy az FCM5 és FCF5 sejt vonalakban szignifikánsan nő a G_1 fázisban levő sejt aránya a tenyésztés során a tápoldatban létrejövő kedvezőtlen változásokra, így a tápoldat csere hiányára, illetve T2 és zearalenon kezelés hatására.

7. Fontosabb publikációk

Az értekezés témakörében megjelent impaktfaktoros szakcikkek:

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

primordial germ cell health monitoring using the fluorescent ubiquitination-based cell cycle indicator reporter system. 2024, **POULTRY SCIENCE**, 103:104144, **IF: 3,8**, doi: 10.1016/j.psj.2024.104144. **D1**

Az értekezés témakörében megjelent nem impaktfaktoros tudományos cikkek:

- **Ecker András**, Lázár Bence, Tóth Roland, Várkonyi Eszter, Gócza Elen: Embrionális gonádból származó sejtszuspenziók beépülésének vizsgálata magyar parlagi gyöngytyúkban. 2022, **ANIMAL WELFARE, ETHOLOGY AND HOUSING SYSTEMS**, 19(1). doi: 10.17205/SZIE.AWETH.2023.1.018
- Lázár Bence, Tokodyné Szabadi Nikolett, Tóth Roland, **Ecker András**, Urbán Martin, Várkonyi Eszter, Liptói Krisztina, Gócza Elen: A napos kori hőkezelés transzgenerációs hatásainak vizsgálata házityúkban. 2023, **ÁLLATTENYÉSZTÉS ÉS TAKARMÁNYOZÁS**, 72(3). 220-230.

Az értekezés témakörében megjelent nem impaktfaktoros ismeretterjesztő cikkek:

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

8. Irodalomjegyzék

- Alfi, O. S., Donnell, G. N. and Derencsenyi, A. (1973). C-banding of Human Chromosomes Produced by D.N.ase. *The Lancet* **302**, 505.
- Anand, M., Lázár, B., Tóth, R., Páll, E., Patakiné Várkonyi, E., Liptói, K., Homolya, L., Hegyi, Z., Hidas, A. and Gócza, E. (2018). Enhancement of chicken primordial germ cell in vitro maintenance using an automated cell image analyser. *Acta Vet Hung* **66**, 518–529.
- Andrews, S. (2010). FastQC: A quality control tool for high throughput sequence data.
- Banfálvi, G. (2016). Overview of cell synchronization. In *Methods in Molecular Biology*, pp. 3–27. New York: Springer Science+Business Media.
- Bednarczyk, M., Dunisławska, A., Stadnicka, K. and Grochowska, E. (2021). Chicken embryo as a model in epigenetic research. *Poult Sci* **100**,.
- Bink, K., Walch, A., Feuchtinger, A., Eisenmann, H., Hutzler, P., Höfler, H. and Werner, M. (2001). TO-PRO-3 is an optimal fluorescent dye for nuclear counterstaining in dual-colour FISH on paraffin sections. *Histochem Cell Biol* **115**, 293–299.
- Blow, J. J. and Dutta, A. (2005). Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**, 476–486.
- Chaipipat, S., Sritabtim, K., Piyasanti, Y., Prukudom, S., Jurutha, J., Phetpila, V., Sinsiri, R., Kammongkun, J., Molee, A., Thiangtum, K., et al. (2022). Initiative on Avian Primordial Germ Cell Cryobanking in Thailand. *Biopreserv Biobank*.
- Chen, Y. C., Lin, S. P., Chang, Y. Y., Chang, W. P., Wei, L. Y., Liu, H. C., Huang, J. F., Pain, B. and Wu, S. C. (2019). In vitro culture and characterization of duck primordial germ cells. *Poult Sci* **98**, 1820–1832.
- Danecek, P., Bonfield, J. K., Liddle, J., Marshall, J., Ohan, V., Pollard, M. O., Whitwham, A., Keane, T., McCarthy, S. A. and Davies, R. M. (2021). Twelve years of SAMtools and BCFtools. *Gigascience* **10**,.
- Divya, D., Shukla, R., Chatterjee, R., Sagar, G., Rajendra Prasad, A. and Bhattacharya, T. (2021). Production of Transgenic Chimeric Chicken from Cryopreserved Primordial Germ Cells and its Validation by Developing shRNA Transgenic Chicken Chimera. *Res Sq*.
- Enninga, I. C., Groenendijk, R. T. L., Van Zeeland, A. A. and Simons, J. W. I. M. (1984). Use of low temperature for growth arrest and synchronization of human diploid fibroblasts. *Mutat Res* **130**, 343–352.
- Griffiths, R., Daan, S. and Dijkstra, C. (1996). Sex identification in birds using two CHD genes. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **263**, 1251–1256.
- Hu, T., Taylor, L., Sherman, A., Tiambo, C. K., Kemp, S. J., Whitelaw, B., Hawken, R. J., Djikeng, A. and McGrew, M. J. (2022). A low-tech, cost-effective and efficient method for safeguarding genetic diversity by direct cryopreservation of poultry embryonic reproductive cells. *Elife* **11**,.

- Kimura, T. and Nakano, T.** (2011). Induction of pluripotency in primordial germ cells. *Histol Histopathol* **26**, 643–650.
- Kong, L., Qiu, L., Guo, Q., Chen, Y., Zhang, X., Chen, B., Zhang, Y. and Chang, G.** (2018). Long-term in vitro culture and preliminary establishment of chicken primordial germ cell lines. *PLoS One* **13**,.
- Lázár, B.** (2020). Madár ősvarsejtek izolálása és fejlődési potenciáljának jellemzése in vitro és in vivo.
- Lázár, B., Molnár, M., Sztán, N., Végi, B., Drobnyák, Á., Tóth, R., Tokodyné Szabadi, N., McGrew, M. J., Gócza, E. and Patakiné Várkonyi, E.** (2021). Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. *Poult Sci* **100**, 101207.
- Lee, J. C. I., Tsai, L. C., Hwa, P. Y., Chan, C. L., Huang, A., Chin, S. C., Wang, L. C., Lin, J. T., Linacre, A. and Hsieh, H. M.** (2010). A novel strategy for avian species and gender identification using the CHD gene. *Mol Cell Probes* **24**, 27–31.
- Liptoi, K., Horvath, G., Gal, J., Varadi, E. and Barna, J.** (2013). Preliminary results of the application of gonadal tissue transfer in various chicken breeds in the poultry gene conservation. *Anim Reprod Sci* **141**, 86–89.
- Liptoi, K., Buda, K., Rohn, E., Drobnyak, A., Meleg, E. E., Palinkas-Bodzsar, N., Vegi, B. and Barna, J.** (2020). Improvement of the application of gonadal tissue allotransplantation in the in vitro conservation of chicken genetic lines. *Anim Reprod Sci* **213**,.
- Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., et al.** (2023). Ensembl 2023. *Nucleic Acids Res* **51**, D933–D941.
- Nakamura, Y.** (2015). Poultry genetic resource conservation using primordial germ cells. *Journal of Reproduction and Development* **62**, 431–437.
- Petitte, J. N.** (2006). Avian germplasm preservation: Embryonic stem cells or primordial germ cells? In *Poultry Science*, pp. 237–242. Poultry Science Association.
- Petitte, J. N. and Mozdziak, P. E.** (2014). Production of Transgenic Poultry. In *Transgenic Animal Technology: A Laboratory Handbook: Third Edition*, pp. 335–357. Elsevier Inc.
- Robinson, J. T., Thorvaldsdottir, H., Winckler, W., Guttman, M., Lander, E. S., Getz, G. and Mesirov, J. P.** (2011). Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29**, 24–26.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al.** (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* **9**, 676–682.
- Sheridan, C.** (2016). FDA approves ‘farmaceutical’ drug from transgenic chickens. *National Biotechnology* **34**, 117–119.
- Tae, S. P., Kim, M. A., Jeong, M. L. and Jae, Y. H.** (2008). Production of quail (*Coturnix japonica*) germline chimeras derived from in vitro-cultured gonadal primordial germ cells. *Mol Reprod Dev* **75**, 274–281.

- Tajima, A., Naito, M., Yasuda, Y. and Kuwana, T.** (1998). Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken. *Journal of Experimental Zoology*.
- Tiambo, C. K., Kibui, P. W., Kamidi, C., Muteti, C., Hu, T., Kemp, S. and McGrew, M.** (2021). *Laboratory training manual on biobanking and recovery of indigenous poultry genetic resources by cryopreservation of primordial germ cells (PGCs)*.
- Tóth, R., Szabadi, N. T., Lázár, B., Buda, K., Végi, B., Barna, J., Várkonyi, E. P., Liptói, K., Pain, B. and Gócza, E.** (2021). Effect of post-hatch heat-treatment in heat-stressed transylvanian naked neck chicken. *Animals* **11**,.
- Trefil, P., Aumann, D., Koslová, A., Mucksová, J., Benešová, B., Kalina, J., Wurmser, C., Fries, R., Elleder, D., Schusser, B., et al.** (2017). Male fertility restored by transplanting primordial germ cells into testes: A new way towards efficient transgenesis in chicken. *Sci Rep* **7**,.
- Ugur, M. R., Saber Abdelrahman, A., Evans, H. C., Gilmore, A. A., Hitit, M., Arifiantini, R. I., Purwantara, B., Kaya, A. and Memili, E.** (2019). Advances in Cryopreservation of Bull Sperm. *Front Vet Sci* **6**,.
- Vasimuddin, M. D., Misra, S., Li, H. and Aluru, S.** (2019). Efficient architecture-aware acceleration of BWA-MEM for multicore systems. In *Proceedings - 2019 IEEE 33rd International Parallel and Distributed Processing Symposium, IPDPS 2019*, pp. 314–324. Institute of Electrical and Electronics Engineers Inc.
- Whyte, J., Glover, J. D., Woodcock, M., Brzezczynska, J., Taylor, L., Sherman, A., Kaiser, P. and McGrew, M. J.** (2015). FGF, Insulin, and SMAD Signaling Cooperate for Avian Primordial Germ Cell Self-Renewal. *Stem Cell Reports* **5**, 1171–1182.
- Yáñez-Ortiz, I., Catalán, J., Rodríguez-Gil, J. E., Miró, J. and Yeste, M.** (2022). Advances in sperm cryopreservation in farm animals: Cattle, horse, pig and sheep. *Anim Reprod Sci* **246**,.