



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar

Südy Ágnes

MSc. II. évfolyam
Biomérnök szakos hallgató

Össejt specifikus markerek kimutatása madár primordiális csírasejtekben

Témavezető: Dr. Gócza Elen, tudományos tanácsadó, csoportvezető
NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Intézet

Konzulens: Lázár Bence, PhD hallgató
NAIK Mezőgazdasági Biotechnológiai Intézet

Dr. Szarka András, egyetemi docens
Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék

TDK dolgozat
Budapest, 2014

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Gócza Elennek, aki megismertetett a témával, lehetővé tette, hogy csoportjában dolgozhassak és mindvégig támogatott.

Köszönöm konzulensemnek, Lázár Bencének, hogy megismertetett a munkamódszerekkel, biztosította a kísérleteimhez szükséges mintákat és bármikor segített, ha szükségem volt rá.

Tartalomjegyzék

1	Bevezetés.....	6
2	Célkitűzések	7
3	Irodalmi áttekintés.....	8
3.1	Szárnycsok génmegőrzésének lehetséges módjai.....	8
3.1.1	Sperma krioprezerváció.....	9
3.1.2	Gonádok fagyasztása és regenerációja	10
3.1.3	Embrionális sejtek fagyasztása és regenerációja	11
3.2	Házityúk korai embrionális fejlődése.....	13
3.3	Embrionális őssejtek.....	15
3.4	Primordiális csírasejtek	18
3.4.1	Primordiális csírasejtek identifikálása.....	18
3.4.2	Primordiális csírasejtek migrációja	20
3.4.3	Csírasejt differenciálódás	21
3.5	Pluripotens ES sejtek molekuláris mintázata	22
3.5.1	OCT4.....	23
3.5.2	SOX2.....	23
3.5.3	NANOG.....	24
3.5.4	KLF4	24
3.5.5	GATA4.....	24
3.5.6	CDX2.....	25
3.5.7	STRA8.....	25
4	Anyagok és módszerek.....	26
4.1	Mintavétel tojásból.....	26
4.2	Primordiális csírasejtenyészet <i>in vitro</i> fenntartása	27
4.3	Primordiális csírasejtek fagyasztása	27
4.4	DNS izolálás.....	28
4.5	Ivar meghatározása embrionális szövetből: PCR és agaróz gélelektroforézis	28
4.6	RNS izolálás	31
4.7	Reverz transzkripció.....	32

4.8	Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR).....	33
5	Eredmények és értékelés	36
5.1	Ivar meghatározása csirke embrionális szövetből	36
5.1.1	Ivar meghatározása Griffiths <i>et.al.</i> módszerével	36
5.1.2	Ivar meghatározása Clinton <i>et.al.</i> módszerével	37
5.2	Össejt specifikus génekre primerek tervezése és azok tesztelése	39
5.3	Házityúk embriók jobb és bal oldali ivarszervkezdeményeinek génexpressziós vizsgálata	44
5.4	PG sejttenyészet expressziós mintázatának vizsgálata	48
6	Összefoglalás.....	52
7	Irodalomjegyzék	54
8	Függelék	59

Rövidítésjegyzék

cDNS	komplementer DNS
CDX2	caudal type homeobox-2
cESC	chicken embryonic stem cell, házityúk embrionális őssejt, cES sejt
Ct	threshold cycle, küszöbciklus
CVH	chicken vasa homologue
DAZL	deleted in azoospermia like
DMSO	dimetil-szulfoxid
DNS	dezoxiribonukleinsav
dNTP	dezoxi-nukleotid-trifoszfát
ESC	embryonic stem cell, embrionális őssejt, ES sejt
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz
HH	Hamburger-Hamilton stádium
ICM	inner cell mass, embriócsomó
iPSC	induced pluripotent stem cell, indukált pluripotens őssejt, iPS sejt
KLF4	Krüppel-like factor-4
mESC	mouse embryonic stem cell, egér embrionális őssejt, mES sejt
NBCI	National Center for Biotechnology Information
OCT4	octamer-binding transcription factor 4
PAS	periodic-acid Schiff
PBS	phosphate buffered saline, foszfát puffer
PCR	polymerase chain reaction, polimeráz láncreakció
PGC	primordial germ cell, primordiális csírasejt, PG sejt, ősvarsejt
qPCR	quantitative PCR, kvantitatív polimeráz láncreakció
RNáz	ribonukleáz
RNS	ribonukleinsav
SOX2	Sry-related HMG box 2
SSEA-1	stage specific embryonic antigen-1, stádium-specifikus embrionális antigén-1
STRA8	stimulated by retionic acid 8

1 Bevezetés

A házityúk (*Gallus gallus domesticus*) az iparban és a kutatásban is kiemelt jelentőséggel bír, hús- és tojástermelőképessége miatt a neolitikum óta tenyésztjük [1]. Szaporodása és élettana jól ismert, az embriók könnyű hozzáférhetősége miatt a fejlődésbiológiai és őssejtkutatások kiváló alanya [2].

A primordiális csírasejtek (PG sejtek) a csíravonal prekursorai, melyek a későbbiekben érett pete- illetve hímvarsejtekké differenciálódnak. A madarak embrionális fejlődése során a primordiális csírasejtek a vérkeringésbe jutva vándorolnak az ivarszervtelepek területére. Ez idő alatt az embriók dorzális aortájából történő vérvétellel juthatunk hozzá a PG sejtekhez, melyek ezt követően *in vitro* sejtenyésztésben fenntarthatóak majd lefagyaszthatóak[3]. A primordiális csírasejtek recipiens állatba visszainjektálva képesek annak gonádjait kolonizálni. A létrejött ivarsejtkimérák segítségével a donor PG sejtől utód hozható létre, ezáltal a primordiális csírasejtek felhasználhatóak génmegőrzési célokra is [4]. Az embriók és donor PG sejtek ivarának előzetes meghatározásával biztosítható, hogy a donor és a recipiens embrió azonos nemű legyen [5].

Magyarországon a primordiális csírasejteket őshonos szárnyas állataink genetika állományának megőrzésére ma még nem használják. A gödöllői NAIK Mezőgazdasági és Biotechnológiai Intézetben folyó kutatások távlati célja a PG sejtek ilyen irányú felhasználására szolgáló technológia kidolgozása. Ennek keretében szeretnénk a primordiális csírasejteket hosszú távon fenntartani, szaporítani és fagyasztani.

2 Célkitűzések

- Házityúk embriók embrionális szövetéből történő ivar meghatározására alkalmas módszerek összehasonlítása, a későbbiekben használandó módszer kiválasztása.
- Házityúk embrionális őssejtekre jellemző markerek vizsgálata:
 - Primerek tervezése olyan őssejt specifikus markerekre, melyekkel az ősvarsejtekre jellemző expressziós mintázat felvehető. A mintázat segítségével megfigyelhető, hogy történik-e változás a sejtekben huzamosabb idejű fenntartás során, illetve a fagyasztást követően.
 - A tervezett primerek tesztelése két napos házityúk embriók szöveteiből nyert RNS-en.
- A primerek felhasználása PG sejtenyészet expressziós profiljának vizsgálatára.
- A primerek felhasználása kilenc napos embriók jobb és bal oldali ivarszervkezdeményeiben a markergének expressziójának vizsgálatára.

3 Irodalmi áttekintés

3.1 Szárnyasok génmegőrzésének lehetséges módjai

A házityúk (*Gallus gallus domesticus*) hosszú történelemmel büszkélkedhet. Az emberek a neolitikumban kezdték a tyúk házasítását, azóta válogatjuk és tenyésztjük a csirkéket számtalan fenotipikus tulajdonságuk, például a tojás- és hústermelő-képességük vagy éppen a tollasodási erélyük miatt [1]. A népesség növekvő élelmiszerigényével együtt a baromfítartás is átalakult. Elterjedtek a nagyüzemi tartási rendszerek, előtérbe került a nagy termelőképességű fajták tenyésztése. Egy tanulmány szerint az ipari fajták az ősi fajták ritka alléljainak csak körülbelül az 50%-ával rendelkeznek [6]. Az Élelmiszerügyi és Mezőgazdasági Világszervezet (FAO) 2007-es tanulmánya szerint a haszonállat fajták legnagyobb százaléka Európában és a Kaukázusban, valamint Észak-Amerikában élvez veszélyeztetett státuszt. Pont azokban a régiókban, ahol a legfejlettebb a haszonállat-ipar és ahol a termelést csak kis számú nemesített fajta fedezi. Európában a háziszárnyas fajták 49%-a veszélyeztetett [7].

Ma gyakran hallunk a környezetszennyezés, az iparosodás és a klímaváltozás okozta problémákról. Ezek kapcsán az emberekben tudatosult a biodiverzitás megőrzésének fontossága. Habár a figyelem általában a vadvilágra és természeti értékeinkre irányul, őshonos háziállataink genetikai variabilitásának megőrzése is fontos. Házasított állataink is őrzik genetikai sokféleségüket mely alkalmazkodóképességük, betegségekkel szembeni ellenálló képességük alapja.

Magyarországon a védett őshonos állatfajták körének megállapításáról szóló rendelet szerint a védett őshonos mezőgazdasági állatfajták olyan állatfajták, amelyeket Magyarország természetföldrajzi környezetében, történelmi múltra visszatekintően tenyésztene, és ezáltal a nemzeti örökség, a mezőgazdasági génbank, valamint a természet- és tájvédelem részévé váltak. Ilyen védett tyúkfajtáink a sárga magyar tyúk, kendermagos magyar tyúk, fehér magyar tyúk, fogolyszínű magyar tyúk, fehér erdélyi kopasznyakú tyúk, fekete erdélyi kopasznyakú tyúk és a kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk [8].

Általánosságban lehetőség van a génállomány *in situ* (eredeti élőhelyen) vagy *ex situ* (eredeti élőhelyétől távol) megőrzésére. Az élő populációk tartása azonban igen költséges, és állandó rizikót jelentenek a lehetséges fertőző betegségek is [5], [9]. Hiába indítottak számos programot a világban ritka fajták *in situ* fenntartására, ez nem hozott megoldást a madarak genetikai variabilitásának csökkenésére. Emellett elkerülhetetlen az *ex situ* konzerváció alkalmazása is [10].

Az *ex situ* konzerváció egyik formája valamely szaporító anyag fagyasztása. A szaporító anyag gazdájából izolálható, fagyasztható, majd egy recipiens gazdatestbe ültetve újra folytatja életciklusát, így alkalmas a genetikai készlet megőrzésére. A hatékony krioprezervációs technikák alkalmazása során a szaporító anyagot fagyasztva tárolják, majd regenerálják megőrizve reprodukív potenciálját, hogy az megfelelően létre tudja hozni az eredeti populációban megfigyelhető genetikai variációt[5].

Konzervációra alkalmas szaporító anyagok az ivarsejtek: a madarak hímivarsejtjei fagyaszthatóak, a petesejt és az embrió - a tojás szerkezete miatt - azonban nem. Ivarsejt kimérák hozhatók létre embrionális sejtek (blasztodermális sejtek vagy primordiális csírasejtek) segítségével és lehetőség van maguknak az ivarszerveknek a fagyasztva tárolására is.

3.1.1 Sperma krioprezerváció

A sperma fagyasztása és tárolása emlősök esetében gyakran alkalmazott módszer, technikája is gyorsabban fejlődött, mint madarak esetében. Pedig az első sperma fagyasztásáról szóló leírás - melyben glicerint használtak krioprotektánsként - épp a házityúkról született [11]. A madár spermium és a megtermékenyítéshez szükséges körülmények is meglehetősen különbözőek az emlősökétől. Az eljárások többnyire lassú fagyasztást, krioprotektánsként glicerint vagy DMSO-t (dimetil-szulfoxidot) javasolnak, de van leírás gyors fagyasztásra és felolvasztásra is, melyek során dimetilacetamidot használnak [5]. Ezeket a technikákat a házityúkra fejlesztették ki, de az elmúlt időben több madárfajra is optimalizálták. Ennek ellenére a mesterséges megtermékenyítés madarak esetében nem elterjedten alkalmazott, melynek lehetséges oka, hogy a fagyasztás sikeressége rendkívül különböző a fajok, de még adott vonalak között is. Házityúk esetében a fagyasztott sperma fertilitását 10-90% közé teszik, átlagosan 60% [12]. Néhány vonal fertilitása különösen kicsi, mely akár lehetetlenné is teheti az ily módon történő konzervációt.

A legfőbb probléma azonban az, hogy a madaraknál a nőstény a heterogamétás nem, ők két különböző (W és Z) ivari kromoszómával rendelkeznek, a fenti módszerrel pedig csak a hím genom őrizhető meg, vagyis csak a Z ivari kromoszóma. Ennek eredményeként genotípustól függően 1-6 generációra van szükség, hogy visszakeresztezéssel megkapjuk a kívánt genotípust, ami magával vonja az élő madarak tartásának költségeit [13], [5].

3.1.2 Gonádok fagyasztása és regenerációja

A tojóknál a szik (tojássárgája) előanyagai a májban szintetizálódnak majd folyamatosan felhalmozódnak az érő tüszőkben. Ovulációkor a petesejt a vízre nehezen átjárható és fajlagos felülete is igen kicsi. Az ovuláció után, míg a petesejt végighalad a petevezetőben folyamatosan rakódik rá az albumin és a meszes héj, melyek megakadályozzák a teljes petesejt krioprezervációját. Habár a petesejt nem, a petefészekszövet fagyasztható, az érő tüszők együttesen tárolhatóak. A hereszövet szintén kriokonzerválható, de a spermium fagyasztása mellett nagy jelentősége nincsen.

A fagyasztott ivarszervek felengedése után szükség van a csíravonal fejlődésének újraindulására. Emlősök esetében ez *in vitro* tüszőérleléssel megoldható, azonban a madaraknál nem, így náluk a szövet transzplantációjára van szükség. Az eljárás során újszülött recipiensek petefészkét eltávolítják és azonos korú donorok petefészek szövetét ültetik a helyére. A szövet kilökődését elkerülendő a befogadó állatok immunrendszerét szuppressálják[5].

A szöveti krioprezerváció egyik problémája, hogy a lassú fagyasztó eljárások kevésbé alkalmazhatóak szövetek és szervek esetén, az őket felépítő különböző sejtek miatt. Míg az egyik fajta sejtre alkalmazható egy protokoll, addig ugyanaz az eljárás más sejtek pusztulását okozhatja [5]. Erre megoldás a vitrifikáció lehet, egy ultra-gyors fagyasztási eljárás, mely során a sejtek víztartalma amorf formában szilárdul meg és nem kristályosodik ki [14]. Egy tanulmány japán fürj (*Coturnix japonica*) esetében a vitrifikációt hatékonyabbnak találta a lassú fagyasztásnál a sejtek életképességének megőrzésében és a petefészekszövet funkciójának visszanyerése szempontjából is [15].

3.1.3 Embrionális sejtek fagyasztása és regenerációja

Az elmúlt húsz évben a kutatók nagyfokú érdeklődést mutattak korai embriók primordiális csírasejtjeinek felhasználása iránt. A primordiális csírasejtek (PG sejtek) az ivarsejtek elődjai. A madarak embrionális fejlődése során a PG sejtek az *area pellucida* középső részén jelennek meg, majd innen egy extraembrionális régió felé mozognak, melyet germinális félholdnak nevezünk. Innen a PG sejtek a vérkeringést használják, hogy az ivarszervtelepek területére vándoroljanak [3].

Több technika is kidolgozásra került, melyek révén ivarsejt kimérák hozhatóak létre [3]. Azonban a legtöbb kutatás célja a szárnyasok genetikai módosítása volt, nem pedig genetikai anyaguk konzerválása. Genetikailag módosítani elegendő egyetlen egyedet, azonban egy populáció regenerálásához a genetikai variabilitás megőrzése végett több tucat egyedre van szükség [5].

Ivarsejt kimérák előállíthatóak blasztodermális sejtekkel vagy primordiális csírasejtekkel, melyek le is fagyaszthatóak. PG sejtek a germinális félholdból, a vérkeringésből vagy az ivarszervkezdeményekből izolálhatóak [3]. Az embriók ivarának meghatározásával ellenőrizhető, hogy a donor és a recipiens embrió azonos nemű legyen [5].

A kiméra olyan egyed, mely genetikailag különböző sejtekből épül fel. Embrionális összejteket recipiens embriókba ültetve azok képesek testi- és ivarsejtekké is differenciálódni. Ennek megfelelően a születendő egyed lehet szomatikus kiméra, melynek csak a testi sejtjei között találhatóak a donor genetikai állományával rendelkező sejtek és ivarsejt kiméra, mely a donor genetikai állományát tartalmazó ivarsejtekkel is rendelkezik, azaz képes a donor sejtek genotípusát továbbörökíteni [16].

3.1.3.1 *Blasztodermális sejtek*

A blasztodermális sejtek pluripotens tulajdonságúak, közöttük már megtaláljuk azokat a prekurzorokat, amelyek később a primordiális csírasejteket kialakítják [16]. Blasztodermális sejtek szubgerminális üregbe történő injektálásával (fagyasztott és felolvasztott sejtekkel is) sikeresen hoztak létre szomatikus és ivarsejt kimérákat is [17], [18]. A blasztodermális sejtek használatának előnye, hogy gyűjtésük és a recipiens embrióba történő injektálásuk is egyszerűbb, mint a PG sejteké. Azonban a blasztodermális sejtekkel beinjektált embriók túlélési rátája igen alacsony. Ezen túl az ivarsejt kimérák aránya nem jósolható meg, így nagy számú kimérát kell létrehozni ahhoz, hogy a szomatikus kimérák mellett elegendő számú ivarsejt kiméra is szülessen.

3.1.3.2 *Germinális félholdból származó sejtek*

Először 1969-ben próbálkoztak pulyka embrió germinális félholdjából származó sejteket (melyek között feltehetőleg PG sejtek is voltak) házityúk embriók véráramába injektálva kimérákat létrehozni. Habár a pulyka PG sejtek eljutottak a házityúk gonádokba, egyik recipiens embrió sem kelt ki [19]. Germinális félhold eredetű PG sejteket donor házityúk vérébe juttatva élő utódot 1993-ban sikerült előállítani [20]. Azonban az 1990-es évek óta, ahogy kidolgozták a PG sejtek vérből, illetve gonádból történő izolálásának technikáit ez a fajta kiméra előállítási módszer háttérbe szorult [3].

3.1.3.3 *Vérkeringésből származó primordiális csírasejtek*

A madarak primordiális csírasejtjei a vérkeringéssel vándorolnak a germinális félholdból a fejlődő ivarszervek területére. Ezalatt az embrióból történő vérvétellel juthatunk hozzá a cirkuláló PG (cPG) sejtekhez [3]. Próbáltak házityúk donor embrióból leszedett vért közvetlenül a recipiens embrió vérkeringésébe injektálni, de ezzel a módszerrel nem született donor eredetű utód [21]. Ivarsejt kimérák létrehozásához egy koncentráltabb PG sejt frakcióval kell a recipienseket beinjektálni.

A cPG sejtek tisztítására több módszert kidolgoztak, melyek segítségével sikeresen hoztak létre ivarsejt kimérákat. Ilyen módszerek a PG sejtek sűrűséggradiens-centrifugálással történő tisztítása [22], immunokémiai reakción alapuló válogatásuk [23], az eritrociták lizálása révén történő koncentrálsuk [24], de lehetőség van a PG sejtek *in vitro* fenntartására és a tenyésztett sejtek recipiensbe való visszainjektálására is [25].

3.1.3.4 Gonád eredetű primordiális csírasejtek

Gonád eredetű PG (gPG) sejtekből is lehetséges ivarsejt kimérák előállítása. Először öt napos (HH27) házityúk embriókból izolált PG sejteket fluoreszcensen festve figyelték meg, hogy azok három napos (HH17) embriók véráramába injektálva az ivarszervek területére vándorolnak [26]. Azaz a gPG sejtek az embrionális fejlődés migrációs fázisán túl is képesek újra vándorolni. Ilyen módon öt napos embriókból származó fagyasztott és felengedett gPG sejteket a recipiens embrió véráramába injektálva sikeresen hoztak létre ivarsejt kimérákat [27]. A gPG sejtek monoklonális ellenanyaggal való jelölése és fluoreszcencia-aktivált sejt szortírozás (FACS - Fluorescence-activated cell sorting) révén tisztíthatóak, ugyanúgy, mint a véráramból izolált csírasejtek [23]. FACS által tisztított gPG sejteket közvetlen tojásrakás utáni (X-es stádiumú) embrió szubgerminális üregébe vagy három napos (HH17) embrió véráramába injektálva is sikerült létrehozni házityúk ivarsejt kimérákat [28].

3.2 Házityúk korai embrionális fejlődése

Eyal-Giladi és Kochnav vizsgálta elsőként, hogy milyen morfológiai változások játszódnak le házityúk embriókban az első barázdálódástól a primitív csík kialakulásáig. A fejlődési folyamatot 14 szakaszra osztották, melyeket utánuk római számokkal jelölünk (I-től XIV-ig) [29].

Az ovuláció után a petesejt a petevezetőn halad végig, aminek kezdeti szakaszában (*infundibulum*) zajlik a megtermékenyülés [30]. A megtermékenyített petesejt gyors osztódásba kezd, miközben végighalad a petevezető szakaszain, ahol a megfelelő fehérje elemek és héjrétegek szintézise történik [31].

A madarak petéje sokszikú (telolecitális), ez a szikállomány biztosítja az embrió számára a tápanyagokat. A petesejt belsejében kis, fehér szik foglal helyet, mely az animális pólus felé egy keskeny nyakban folytatódik. A petesejt membránja alatt ez a terület kiszélesedik (Pende-féle mag), közepén helyezkedik el a petesejt sejtmagja és kis mennyiségű citoplazmája. Ez utóbbiak felülnézetben korong alakú együttest alkotnak, melynek átmérője 2-3 mm és csírakorongnak nevezik [31].

Az első osztódások kizárólag a csírákorong területén történnek, az osztódások következtében a csírákorong átmérője egyre nagyobb lesz, az embrió a morula stádiumba jut. Ekkor a csírákorong egy-két sejtrétegnyi vastagságú állományában üreg nincsen, a sejtés lemez közvetlenül a sziken fekszik [31].

A további osztódások során az egyre nagyobb átmérőjű és több sejtrétegű csírapajzs alatt a szikállomány megemésztődése és felszívódása következtében fokozatosan egy keskeny rés alakul ki, ez a szubgerminális üreg. Ezt tehát alulról a szikállomány, felülről pedig a csírákorong sejtjei (melyeket ebben a stádiumban blasztodermának nevezünk) határolják [31].

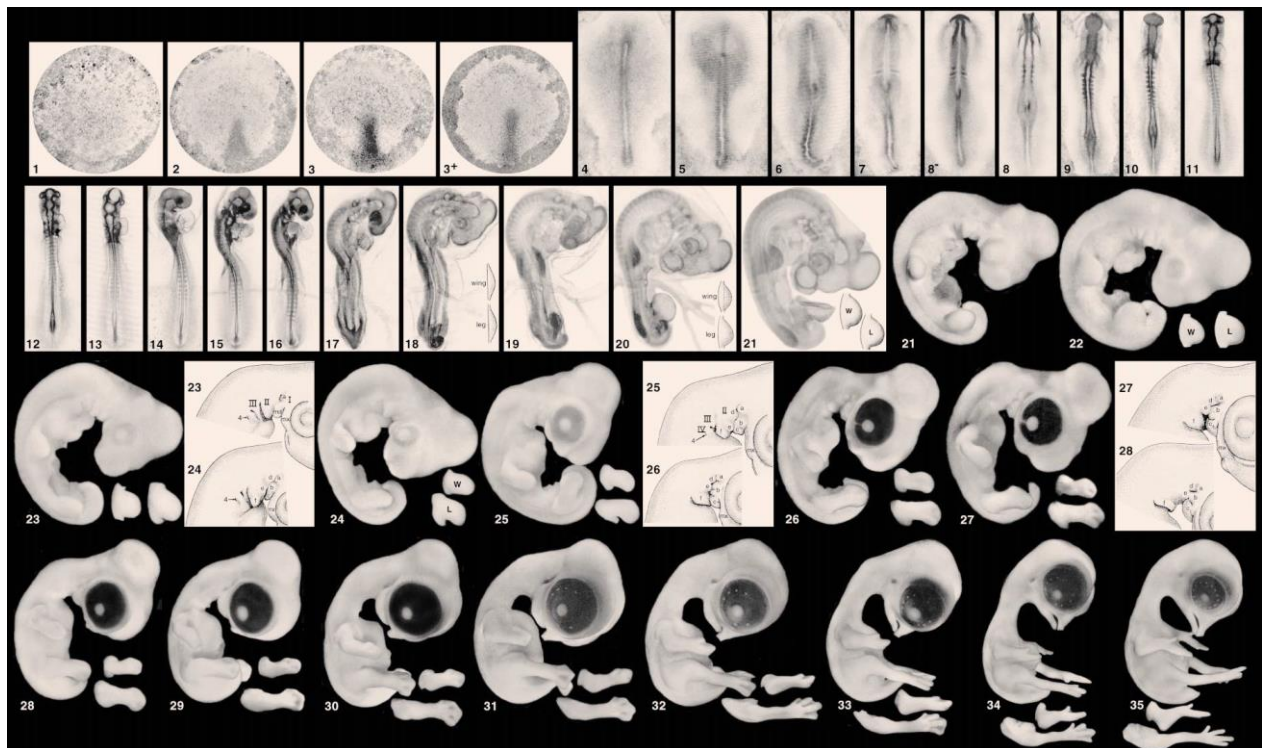
A tyúk 20-23 órával a megtermékenyítés után rakja le a tojásait, ekkor az ún. X-es stádiumú embrió már 20000-50000 blasztodermális sejtből áll [32].

Morfológiailag ez a X-es stádiumú embrió két részre osztható: a fehéres színű *area opaca*-ra, mely egy gyűrű alakú zóna, amely mentén a blasztoderma letapad a szikhez, illetve az áttetsző *area pellucida*-ra, mely a blasztoderma blasztocoel feletti kör alakú része [31], [32] .

A továbbiakban az *area pellucida* néhány sejtje kiválik a blasztodermából és a szubgerminális üregbe vándorolva kialakítja az elsődleges hipoblasztot. Az *area pellucida* többi sejtje a felszínen maradva formálja majd az epiblasztot. Az *area opaca* poszterior marginális zónájából további sejtek vándorolnak ki anterior irányban (másodlagos hipoblaszt sejtek), melyek összekapcsolódva az elsődleges hipoblaszt sejtekkel kialakítják az egységes hipoblaszt réteget. Tehát a blasztoderma most már kétrétegű, a hipoblaszt és az epiblaszt fogják közre a blasztocoelt. Maga az embrió és néhány extraembrionális szövet az epiblasztból fejlődik, míg a külső membránok a hipoblasztból származnak [32], [33].

A továbbiakban a centrális epiblaszt sejtek blasztocoelbe történő levándorlása révén kialakul a primitív csík, az embrió jövőző hossz tengelye [32]. A gasztruláció (a csíralemezek kialakulása) lezajlásával a primitív csík visszahúzódik a poszterior vég felé és annak nyomában megindul az organogenezis [30].

A tojásrakás utáni embrionális fejlődést 46 szakaszra osztjuk, melyeket Hamburger és Hamilton nyomán arab számokkal jelölünk [34]. Dolgozatomban én is a Hamburger-Hamilton (HH) számokkal jelzem az embriók korát, az 1. ábra szerint.



1. ábra Hamburger-Hamilton táblázat (Drew M. Noden munkája, Cornell University)

3.3 Embrionális őssejtek

Az őssejtek differenciálatlan sejtek, melyek egyrészt önmegújító képességgel rendelkeznek, másrészt különböző sejttypusokká képesek differenciálódni. Az őssejtek osztódásakor keletkező két sejt közül az egyik ugyanolyan őssejt, mint az eredeti, a másik leánysejt azonban már differenciáltabb állapotban van [35].

A legkorábbi, teljességgel differenciálatlan őssejt totipotens, azaz embrionális és extraembrionális szövetek kialakítására egyaránt képes. Egy totipotens sejtől egy teljes egyed ki tud fejlődni. A totipotens sejtek leszármazottjai pluripotens sejtek, melyek képesek bármilyen testi sejt kialakítására, azonban nem képesek az extraembrionális szövetek létrehozására. A korai embrionális őssejtek pluripotensek, csak a megtermékenyített petesejt, illetve a zigóta első néhány osztódásakor létrejövő sejtek totipotensek [35].

Az embrionális őssejteken kívül kifejlett egyedek szerveiben is találhatóak őssejtek. Ezek az ún. szöveti őssejtek multipotensek, azaz már valamilyen mértékben elköteleződtek és csak bizonyos sejttypusokat tudnak létrehozni [35].

Embrionális őssejteket (ES sejtek) először 1981-ben izoláltak egérből [36]. Azóta az egér embrionális őssejtek (mES sejtek) fenntartása már rutin munka, a sejtvonalak jó modellként szolgálnak differenciálódási folyamatok vizsgálatára [37]. Az 1990-es évek végén sikerült főemlősökből és emberekből származó embrionális őssejt vonalakat is alapítani [38], [39].

Az egér embrionális őssejtek mintaként szolgáltak, hogy általánosan megfogalmazhassuk az embrionális őssejtek tulajdonságait. Ezek a sejtek hosszú idejű fenntartás után is képesek: végtelen ideig megújítani magukat fenotípusuk vagy kariotípusuk megváltoztatása nélkül; *in vitro* differenciálódni bármilyen sejttypussá, melyek a három csíralemezt alkotják; recipiens embrióba visszainjektálva annak minden sejtjét, így az ivarsejteket is kialakítani és felnőtt recipiens élőlénybe injektálva tumort képezni [32].

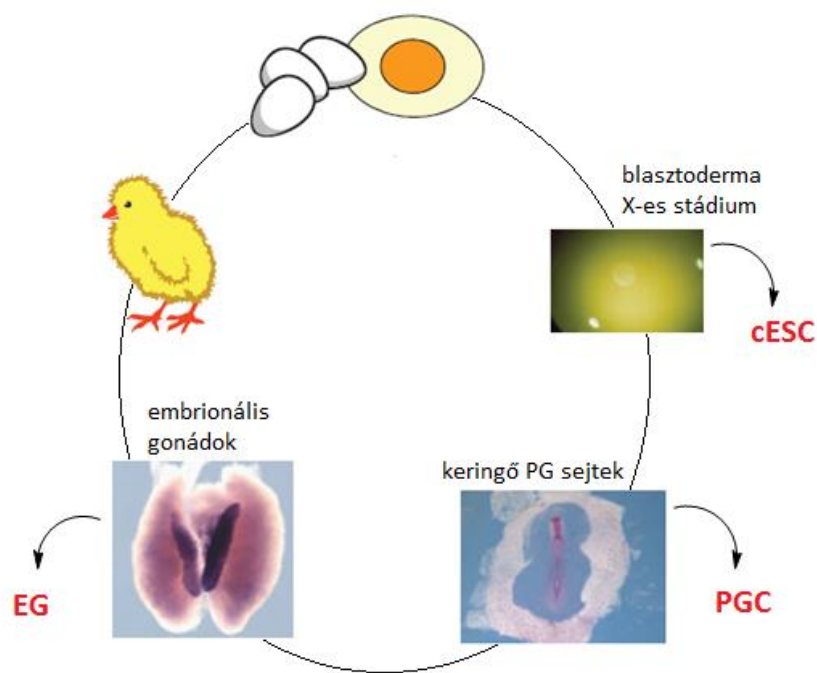
Az első mES sejtvonallal mellett, mely blasztociszta állapotú egér embriócsomójából (ICM) származott további pluripotens sejtvonalak is alapítottak. Ilyenek például az embrionális csírasejtek (EG), az egér epiblasztból nyert epiblaszt őssejtek (EpiSC), illetve ismeretesek extraembrionális őssejtvonalak, mint a trofektoderma eredetű trofektodermális őssejtek (TS) és az extraembrionális endoderma eredetű őssejtek (XEN) is. Szomatikus sejtek meghatározott transzkripciós faktorokkal történő genetikai módosítása révén pedig létrehozták az indukált pluripotens őssejteket (iPSC) [32].

Az egér embrionális fejlődésének kezdeti lépéseként a megtermékenyített petesejt osztódni kezd, kialakulnak a blasztomerek, a szedercsíra majd a hólyagcsíra (más néven blasztociszta). A hólyagcsíra külső sejtjei alkotják a trofoblaszt réteget, melyből az extraembrionális szövetek (a méhlepény és a külső magzatburok) képződnek. A hólyagcsíra másik része az embriócsomónak nevezett belső sejt tömeg, mely a későbbiekben két részre tagolódik. Az epiblasztból alakul ki maga az embrió, míg a primitív endodermából (hipoblaszt) extraembrionális szövetek képződnek [40], [32].

Nem emlős őssejt vonalakat még csak néhány fajból, köztük a házityúkból alapítottak [37]. A házityúk őssejtekkel kapcsolatos kutatások 1961-re nyúlnak vissza, amikor egy csirke

blasztodermát négy részre osztottak és ezek mindegyike képes volt létrehozni egy teljes embriót [41]. Ezek után viszont csak 1990-ben érték el jelentős eredményt, mikor Pettite és társai X-es stádiumú háztyúk embrióból nyert blasztodermális sejteket injektáltak recipiens embriók szubgerminális üregébe. A kísérlet során képesek voltak szomatikus kimérák és egy ivarsejt kiméra létrehozására is, ezzel bizonyítva, hogy a X-es stádiumú embrió blasztodermális sejtjei pluripotensek [17].

Az első csirke embrionális őssejt (cESC) vonalat X-es stádiumú embrió blasztodermális sejtjeiből alapították (2. ábra) [42]. További háztyúk pluripotens sejtvonalak a gonád eredetű embrionális csírasejtek (EG) és a primordiális csírasejtek (PGC). Más, egér esetében ismert őssejtvonalak háztyúk megfelelőinek alapítása még nem történt meg, ahogy háztyúk indukált pluripotens őssejteket sem hoztak még létre [32].



2. ábra Háztyúk őssejtvonalak ([32]-es forrásban szereplő ábra felhasználásával)

3.4 Primordiális csírasejtek

Az ivarsejtek a szervezet azon sejtjei, melyek képesek genetikai információt átadni a generációk között. Az ivarsejtek elődjai a primordiális csírasejtek. A legtöbb gerinces állatban a csíravonal fejlődése hasonló: az embrionális fejlődés elején megjelennek a PG sejtek, az eljövendő ivarszervek területére vándorolnak (migráció) és azt kolonizálják, a nemi differenciálódás során kialakulnak a petefészkek, valamint a herék, végül a PG sejtek az előbbiekből petesejtekké, az utóbbiakban hímivarsejtekké fejlődnek (gametogenezis) [16].

3.4.1 Primordiális csírasejtek identifikálása

A primordiális csírasejtek jellegzetesen nagy alakjuk, nagy kör alakú sejtmagjuk és refraktív lipideket tartalmazó citoplazmájuk miatt mikroszkópban is felismerhetők, továbbá hisztokémiai és immunohisztokémiai módszerekkel jelölhetőek [3].

3.4.1.1 PAS festés

A PG sejtek nagy glikogéntartalmuk révén klasszikus hisztokémiai módszerekkel megkülönböztethetőek a környező szomatikus sejtektől [23]. A glikogén festésére alkalmazott eljárás a perjódsavval és Schiff-reagenssel történő ún. PAS (periodic-acid Schiff) festés. A perjódsav a glikogént aldehiddé oxidálja, aminek Schiff-reagenssel (pararozanilin és nátrium-metabiszulfid keveréke) való reakciója lilás színt eredményez [43]. Habár a PAS festés nem specifikus a PG sejtekre, azok morfológiai megfigyelésével együtt sokáig alkalmazott módszer volt a primordiális csírasejtek identifikálásában [16].

3.4.1.2 EMA-1

Az EMA-1 elnevezésű monoklonális antitestet egér embrionális karcinoma sejtek jelölésére fejlesztették ki. Az EMA-1 sejtfelszíni fukózilált polilaktózin szénhidrát láncokkal reagál és kiderült, hogy festi az egér PG sejteket és emellett a házityúk PG sejteket is [16].

3.4.1.3 Anti-SSEA-1

Az SSEA-1 (stage specific embryonic antigen-1) egy egér és madár PG sejteken is megtalálható antigén. Az anti-SSEA-1 az antigén egy szénhidrát epitópjára specifikus. Differenciálatlan multipotens egér sejtek, egér embrionális őssejtek és házityúk embrionális őssejtek mind hordozzák az SSEA-1 epitópot. Ezek a sejtek differenciálódás után már SSEA-1 negatívak.

Házityúk esetében az SSEA-1 HH10-es stádiumtól kezdve használható a PG sejtek jelölésére [23].

Az EMA-1 és az anti-SSEA-1 a PG sejtek germinális félholdban való megjelenésétől a gonád kolonizációjáig használatosak azok jelölésére, azonban náluk specifikusabb markerek is ismeretesek [23], [3].

3.4.1.4 CVH

A VASA gén egy ATP-függő RNS helikáz aktivitású DEAD box RNS-kötő fehérjét kódol és eredetileg *Drosophila*-ban fedezték fel [44], de VASA-val homológ géneket azóta több fajban azonosítottak, többek között egérben, zebrahalsban és emberben [3]. Izolálták a VASA gén házityúk homológját (chicken vasa homologue, CVH) is és megmutatták csíravonal-specifikus jelenlétét az egész fejlődés során [45]. Házityúkban a CVH egyike a kevés csíravonal specifikus markereknek. Hím egerekben a VASA esszenciális a PG sejtek fennmaradásához, azonban a nőstény génkiütött állatok fertilisek [46]. Házityúk embrionális őssejtekben a CVH túlexpresszáltatása más csíravonal markerek expressziójának megnöveléséhez (upregulációjához) vezet és ezek a sejtek képesek recipiens embrióba injektálva a gonádokba vándorolni [44].

3.4.1.5 DAZL

Egy másik csíravonal specifikus marker a DAZL (deleted in azoospermia like). A DAZ (Deleted in azoospermia) géncsalád három tagból áll, ezek a DAZ, a DAZL és a BOULE [47]. A DAZL egy RNS-kötő fehérjét kódol, expressziója a csírasejtekre korlátozódik. Homológjait számos fajban azonosították, köztük a karmosbékában, zebrahalsban és emlősökben, valamint házityúkban [44]. Emlősökben a DAZL expressziója szükséges a PG sejtek fejlődéséhez, migrációjához és differenciálódásához, valamint az ivarsejtekéréséhez és túléléséhez [47]. Házityúkban a DAZL gént vizsgálva azt tapasztalták, hogy a PG sejtekben erősen expresszálódik 4,5 és 6,5 napos korban, azonban az expresszió jelentősen csökkent hímeiben 14,5 nap után, tojóikban 8,5 nap után. Ez a változás a PG sejtek csírasejtekké történő átalakulásával magyarázható [47].

3.4.2 Primordiális csírasejtek migrációja

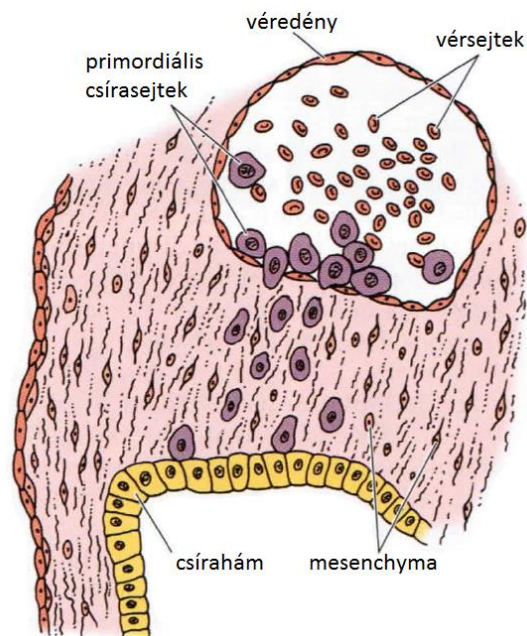
Madarakban a primordiális csírasejtek epiblaszt eredetűek, az *area pellucida* középső részéről származnak és a fejlődés során innen vándorolnak tovább [16].

X-es korú embrióban megközelítőleg 30-130 PGC sejt található az *area pellucida* középső részén, közvetlenül a primitív csík kialakulása előtt [45], [48]. A primitív csík formálódása közben a PG sejtek passzív mozgással anterior irányba haladnak az extraembrionális régió felé egy félhold formájú területre, amit emiatt germinális félholdnak nevezünk (3. ábra) [48].



3. ábra Germinális félhold HH4-es korú háztyúk embrióban ([33])

HH10-11 stádiumban a PG sejtek a germinális félhold területén formálódó vérerekbe lépnek ki [48]. A vérben keringő PG sejtek aránya különböző irodalmi források szerint HH13-16-os stádiumban a legnagyobb, az eltérő adatok oka a tojók közötti individuális különbségek lehetnek [49]. A PG sejtek a későbbiekben elhagyják a vérereket és összegyűlnek a formálódó ivarszervek területén (4. ábra) [48].



4. ábra Keresztmetszeti ábra a házityúk embrió ivarszervkezdeményéről, a primordiális csírasejtek elhagyják a vérereket ([33])

3.4.3 Csírasejt differenciálódás

A genetikailag hím PG sejtek HH39-es kortól (13 nap) differenciálódnak spermatogoniummá a herékben, majd nyugalmi állapotba kerülnek [50]. 10 héttel a kikelés után a spermatogonium újramezdi az osztódást és elkezd differenciálódni [3].

A genetikailag nőivarú PG sejtek HH34-es kortól (8 nap) kezdenek el elsődleges oocytákká differenciálódni a bal oldali petefészekben [51]. A tojók csak a bal oldalon növesztenek működő petefészeket, a jobb oldali ivarszervkezdemény visszafejlődése a hetedik embrionális nap (körülbelül HH31) táján indul meg és a kikelés körüli időszakban fejeződik be [30]. Az első meiózis HH39-es korban kezdődik és a meiózis profázisának diplotén fázisánál áll le közvetlenül a kikelés után [3]. A csírasejtek száma HH43-as korban a legnagyobb, azonban ennek mintegy kétharmadára csökken a kikelés után egy nappal. A sejtszám csökkenését apoptózis okozza, ahogy a jobb petefészekben található csírasejtek is apoptózis által halnak el [3]. Az elsődleges oocyták majd csak az ovuláció előtti pár órában folytatják első meiotikus osztódásukat, majd utána rögtön elkezdik a másodikat, de annak metafázisában leállnak az ovulációig. Ovuláció után a petesejt a petevezetőbe kerül, ahol megtermékenyül [52].

3.5 Pluripotens ES sejtek molekuláris mintázata

Az embrionális őssejtek pluripotens sejtek, melyek differenciálatlan állapotban végtelen ideig fenntarthatóak. Emlős ES sejteken végzett kutatások során a pluripotencia fenntartásában résztvevő gének komplex regulációs hálózatát sikerült feltérképezni. Ebben a hálózatban kulcsfontosságú transzkripciós faktoroknak az OCT4, SOX2 és NANOG tekinthetők. Ezek a gének a közöttük létrejövő pozitív feedback kapcsolatok révén kölcsönösen elősegítik egymás transzkripcióját, így módon stabilan fenntartva a pluripotencia állapotát [37]. Ezek a gének szerepelnek azon négy gén között (OCT4, SOX2, C-MYC, KLF4 valamint OCT4, SOX2, NANOG, LIN28) melyekkel egér és humán eredetű szomatikus sejteket transzformálva pluripotens sejteket hoztak létre [53]. Az ilyen átprogramozással létrehozott sejteket indukált pluripotens sejteknek (iPSC) nevezzük.

Házityúk és más madárfajok esetében a pluripotencia hálózat leírása még nem teljes, de az emlős ES sejtekben jellemzően kifejeződő gén homológjai megtalálhatóak a madár genomban is. Ezen túlmenően az iPS sejtek létrehozásához alkalmazott négy emlős gén (OCT4, SOX2, C-MYC, KLF4) segítségével részben átprogramozott (iPS sejtekre emlékeztető) pluripotens sejtek (partially reprogrammed pluripotent stem cells - PRPSCs) nyerhetők gerinces és gerinctelen modellállatokban (madarakban, zebrahalban, ecetmuslicában), pedig ezek a fajok 550 millió évnyi evolúciós távolságra vannak közös őstől. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy az őssejt állapot nagy filogenetikai távolságokban erősen konzervált [54]. Tovább erősítheti a feltételezést, hogy az őssejtek távoli rokon fajokban jobban hasonlítanak egymásra, mint saját differenciált sejtjeikre és érdemes megemlíteni, hogy az OCT4 ugyanazon gének expresszióját szabályozza (pl. a SOX2-jét) emlősökben, madarakban és halakban is [55], [54].

Feltételezhetjük, hogy az egérben leírt pluripotencia markerek házityúk homológjai a cES sejtekben is jelentőséggel bírnak. A következőkben néhány ilyen markergén leírása következik.

3.5.1 OCT4

Az OCT4 gén az 5-ös POU domén osztály családjához tartozó transzkripciós faktor, melynek további tagjai a Pit, Oct és Unc fehérjék. Ezen fehérjék mindegyike egy 8 nukleotid hosszú DNS szekvenciát ismer fel, innen ered az Oct fehérjék neve is. Egérben a POU domén az ATGCAAAT konszenzus szekvenciát ismeri fel, ami több gén, többek között a NANOG, SOX2 és magának az OCT4 promóter régiójában is megtalálható. Az OCT4 a korai egér embrió ICM sejtjeiben, későbbiekben csak az epiblaszt sejtekben fejeződik ki. Végül expressziója a csíravonalra korlátozódik, ahol szükséges a csíravonal teljes differenciálódásához [37].

Az OCT4 homológját sikerült a házityúkban is azonosítani. A csirke OCT4 (más néven cPOUV) képes egér ES sejtekben az inaktivált OCT4 gént komplementálni. A cPOUV expressziója csak a gastruláció előtti szövetekben és az ősvarsejtekben figyelhető meg [56].

3.5.2 SOX2

A SOX2 gén egy transzkripciós faktor szupercsalád tagja, melynek nagy szerepet tulajdonítanak a differenciálódás szabályozásában. A család közös jellemzője egy homológ szekvencia, a HMG-box (high mobility group), mely egy erősen konzervált DNS-kötő domén. Körülbelül 20 SOX gén található minden gerinces fajban [57]. Egér embrióban a SOX2 által kódolt 319 aminosav hosszú fehérje a morulában és az ICM sejtekben jelenik meg, mielőtt expressziója az epiblasztra korlátozódna [37]. A SOX2 különösen fontos az embrionális fejlődéshez, a neuroektoderma sejtek differenciálódásához és az OCT4 átíródását is szabályozza. Expressziója elengedhetetlen a pluripotencia fenntartásához [58].

A házityúk genomjában is megtalálható többféle SOX gén, ezek az egész fejlődés alatt expresszálódnak különböző szövetekben, a SOX2 terméke megjelenik az ősvarsejtekben is [37]. A SOX2 erőteljesen expresszálódik a proliferáló cES sejtekben; ha differenciálódásra készítjük ezeket a sejteket a SOX2 expressziójának csökkenését (downregulációját) figyelhetjük meg, bár expressziója később újraindul a neuroektoderma differenciálódása alatt [56]. Összességében azt mondhatjuk, hogy a SOX2 gén a házityúk esetében is fontos szerepet játszik a pluripotencia fenntartásában [37].

3.5.3 NANOG

A NANOG gént először egér ES sejtekben azonosították, és hamarosan rájöttek, hogy központi szerepet játszik a pluripotencia fenntartásában gerincesekben. Expressziója humán és egér ES sejtekben szorosan szabályozott az OCT4 és SOX2 gének által, megfelelő szintje befolyásolja az embriócsomót felépítő sejtek számát [37].

Madarakban a NANOG expresszálódik a korai embrióban, az osztódó cES sejtekben, valamint az ősvarsejtekben is. Hím ősvarsejtekben a NANOG downregulációja figyelhető meg, míg genetikailag nőivarú ősvarsejtekben a meiózis kezdetéig expresszálódik. A NANOG csíravonal specifikus expressziója feltehetőleg fontos szerepet játszik az ivarsejt irányba történő elköteleződésben [37].

3.5.4 KLF4

A KLF (Krüppel-like factor) gének a cink-ujj típusú transzkripciós faktorok családjába tartoznak [37]. A KLF4 tagja volt annak a 4 génből álló koktélnak amivel Takahashi és Yamanaka sikeresen állított elő iPS sejteket fibroblaszt sejtekből [59]. A KLF gének az OCT4/SOX2/NANOG szabályozási hálózathoz szorosan kapcsolódva vesznek részt a pluripotencia fenntartásában.

Házityúkban még viszonylag kevés ismeretünk van a KLF génekről. A KLF4 és a KLF5 gének tűnnek a cES sejtekre legspecifikusabbnak (csirke embrionális fibroblasztokhoz, retinsavval kezelt cES sejtekhez és embriócsomókhoz képest). Feltételezhető, hogy mindkét gén aktív szerepet játszik csirke embrionális sejtekben is a pluripotencia szabályozásában. X-XII-es korú házityúk blasztodermális sejtekben a KLF gének legtöbbje expresszálódik [37].

3.5.5 GATA4

A GATA fehérjék a GATA-kötő transzkripciós faktor család tagjai, melyek egy vagy két erősen konzervált cink-ujj DNS-kötő doménnel rendelkeznek. Nevük onnan ered, hogy mindannyian a WGATAR (W = A vagy T és R = A vagy G) konszenzus szekvenciát ismerik fel. Gerincesekben hat GATA faktort azonosítottak, közülük a GATA1, -2, -3 faktorok az erythroid vonal sejteiben expresszálódnak, míg a GATA4, -5, -6 endodermális eredetű sejtekben fejeződnek ki [60]. Egér

őssejtek esetében a GATA4 és GATA6 a primitív endoderma (hipoblaszt) markereként ismeretes [61]. A GATA6 és GATA4 gének szoros kapcsolatban vannak a pluripotencia hálózattal: mES sejtekben az OCT4 overexpresszáltatása illetve túl alacsony szintje is a pluripotencia elvesztésével jár, a sejtek elkezdnek differenciálódni primitív endodermává, melyet magas GATA6 expresszió jelez [61], illetve trofektoderma sejtekké, melyet CDX2 expresszió jellemez [62].

Házityúk embrionális sejtek esetén az mES sejtekhez hasonlóan a cPOUV túlexpresszáltatása indukálja a GATA4, GATA6 és CDX2 gének kifejeződését [56].

3.5.6 CDX2

A CDX2 (caudal type homeobox) a CDX transzkripciós faktorok közé tartozik, melyek az anterior- poszterior elrendeződést szabályozzák embrionális korban [63]. A CDX2 expressziója egerekben a trofoblaszt sejtekre korlátozódik [64]. CDX2 hiányos mutáns embriók még eljutnak egy blasztociszta-szerű állapotba és vannak trofoblaszt-szerű sejtjeik, azonban beágyazódni nem tudnak. Hólyagsíra állapotban kétféle sejtípus figyelhető meg, a trofoblaszt sejtek és az embriócsomót alkotó sejtek. E két vonal szegregálódásában a CDX2 és az OCT4 központi szerepet játszik, előbbi a trofoblaszt sejtekben, utóbbi az ICM sejtjeiben expresszáldva [65]. Házityúk embriókban a CDX2 HH2-es kortól kezdve expresszáldik [66].

3.5.7 STRA8

A STRA8 (stimulated by retionic acid 8) gén retinsav hatására expresszáldik a csírasejtekben és a meiózis elindításához szükséges. Gerincesek esetében a meiózis különböző időpontokban kezdődik a nőtény és a hím állatokban. Nőtényekben a csírasejtek embrionális korban elkezdik a meiotikus osztódást, míg hímekben a meiózis csak a születés (kikelés) után kezdődik. Nőtény egerekben ennek megfelelően a STRA8 már az embrionális petefészkekben expresszáldik, míg a herékben csak a születés után fejeződik ki. A retinsav az A-vitaminból keletkezik oxidatív reakciók során. A retinsav a retinsav sejtmagreceptorok (RAR-ok) ligandja, melyek a célgének szabályozó régiójában található retinsav válaszelemekhez (RARE- retionic acid response element) kötnek. A STRA8 promóterében két ilyen RARE található, a retinsav receptorok ezekhez kötve szabályozzák a STRA8 expressziót [67].

4 Anyagok és módszerek

4.1 Mintavétel tojásból

A kísérletekhez SPF (Specified Pathogen Free, az állatfaj szempontjából meghatározó kórokozóktól mentes) házi tyúk (*Gallus gallus domesticus*) tojásokat használtunk, melyek a Bioovo Kft-től származtak. A tojásokat 38°C-on, 55-65% relatív páratartalom mellett inkubáltuk. A tojásokból történő vérvételt, a sejtek fenntartását és fagyasztását, az embriók és a gonádok kimetszését konzulensem, Lázár Bence végezte.

A mintavételekhez a tojásokat csipesszel felnyitjuk, a nyitás helyét előtte 70%-os etilalkohollal fertőtlenítjük. A héj alatt található membrán átszakítása után a tojásba steril PBS-t (phosphate buffered saline, foszfát puffer) csepegtetünk.

Az embrió korát meghatároztuk, majd különböző céllal mintát gyűjtöttünk:

- PG sejtek tenyésztéshez HH16-os korú embrióból vért vettünk
- három csőbe gyűjtöttünk tenyésztett primordiális csírasejteket
- DNS izolálás céljából az embriókból csipesszel eltávolítottunk egy szövetdarabot
- RNS izolálás céljából két HH16-os korú teljes embriót vágunk ki a tojásból
- öt HH35-ös korú embrió bal és jobb oldali gonádját boncoltuk ki, az embriókat steril petricsészébe mikroszkóp alá helyezve

A teljes embriókat és a gonádokat 500µl RNeasy Lysis Buffer® (Qiagen) oldatban, a sejteket 500µl TRIzol® (Life Technologies) oldatban -20°C-on, eppendorf csőben tároltuk.

4.2 Primordiális csírasejttenyészet *in vitro* fenntartása

HH16-os korú embriók dorzális aortáját mikroszkóp alatt húzott üvegkapillárisal megszűrjük, a kapillárison keresztül szájpipettával 2-3 µl vért veszünk. A vért előre előkészített 48-lyukú (well) plate-re, 300 µl médiumba tesszük, vigyázva, hogy a művelet közben a kapilláris végét ne törjük le. A plate szélein lévő lyukakba penicillint és sztreptomicint tartalmazó PBS-t töltünk, hogy megakadályozzuk a médium párolgását. A sejteket 5% CO₂ szint mellett 38°C-on tenyésztjük. A sejteken két naponta médiumot cserélünk, ekkor 90 µl médiumot leszívunk és helyette 100 µl friss médiumot pipetázunk egy-egy lyukba. A tenyésztés során a vérsejtek elhalnak, a médiumcserékkel tisztulnak a tenyészetek.

A felhasznált médium elkészítésének leírása a skóciai Roslin Intézettől származik, összetételét kérésükre nem áll módomban közölni.

4.3 Primordiális csírasejtek fagyasztása

Felhasznált anyagok:

KO-DMEM oldat: 2 Ko-DMEM (*Iife technologies*): 1 H₂O (*Sigma Embryo Transfer*) + 10% chicken serum (*Biosera*) és 0,0075% 20mM CaCl₂

Fagyasztó médium: az előbbi KO-DMEM oldat kiegészítve 8% DMSO-val

A sejteket a tenyésztő edény aljáról óvatosan felszuszpendáljuk, majd egy centrifugacsőbe pipetázzuk át őket. A mintát 1000 rpm fordulatszámon 3 percig centrifugáljuk. A felülúszót leszívjuk, helyére friss DMSO mentes médiumot pipetázunk, a sejteket felszuszpendáljuk. A felszuszpendált sejteket fagyasztócsővekbe rakjuk át. A fagyasztócsővekbe a DMSO mentes médiummal megegyező mennyiségű 8% DMSO-t tartalmazó médiumot adagolunk lassan. A művelet után a fagyasztócsőveket -80°C-on tároljuk.

A sejteket felolvasztás után újra centrifugáljuk, a DMSO-t tartalmazó médiumot ekkor leszívjuk és a sejteket helyette tenyésztő médiumban osztjuk ki a plate-re. Innentől kezdve a médiumcseréket ugyanúgy folytatjuk, mint a fagyasztás előtt.

4.4 DNS izolálás

A DNS izolálásra félretett szövetdarabokat -20°C-on tároltuk. Egy mintára 100 µl lízis puffer és 1µl 10 mg/ml-es proteináz K oldatot pipettáztam. 50 ml lízis puffer összetételét az 1. táblázatban adtam meg.

<i>Összetevők</i>	<i>Mennyiség (törzsoldat)</i>
0,1 M Tris (pH=8,5)	5 ml (1 M Tris)
5 mM EDTA	0,5 ml (0,5 M EDTA)
0,2 M NaCl	2 ml (5 M NaCl)
0,2% SDS	0,5 ml (20%SDS)
H ₂ O (Milli-Q)	42 ml

1. táblázat DNS izoláláshoz használt lízis puffer összetétele (50 ml)

A mintákat a lízis puffer és a proteináz K oldat hozzáadása után vortexeltem, majd 3 órán keresztül inkubáltam őket 55 °C-on. A három óra leteltével újabb vortexelés és centrifugálás következett (13000 rpm, 1 perc). Majd 10 perc 100°C-os inkubáció után újra centrifugáltam (13000 rpm, 5 perc) őket.

Az így kapott DNS oldatok koncentrációját NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) UV-Vis spektrofotométerrel mértem.

4.5 Ivar meghatározása embrionális szövetből: PCR és agaróz gélelektroforézis

Kétféle módszerrel határoztam meg az embriók ivarát. Mindkét módszer esetén a szövetdarabokból nyert DNS oldat koncentrációját mértem, majd a mért értéknek megfelelően 20 ng/µl-re hígítottam. Pozitív kontrollnak a Haszonállat-génmegőrzési Központból kapott kakas és tyúk szövetből származó DNS mintát használtam. Mindkét módszer esetén a PCR-hez az összetétel reakciócsővenként (2. táblázat).

<i>PCR mix</i>	<i>Mennyiség</i>
ReadyMix RedTaq (<i>Sigma</i>)	5 µl
foward primer	0,5 µl
reverse primer	0,5 µl
minta (20 ng/ µl)	1 µl
nukleáz mentes víz	3 µl
Összesen	10 µl

2. táblázat Az ivar meghatározására használt PCR mix összetétele (egy mintára)

Ivar meghatározása Griffiths módszerével [68]:

Felhasznált primerek:

P2: TCT GCA TCG CTA AAT CCT TT

P8: CTC CCA AGG ATG AGR AAY TG

Ahol R=A/G és Y=T/C

A primerekből *RT-PCR Grade Water (Ambion)* vízzel először 100 µM-os törzsoldatokat, majd ötszörös hígítással 20 µM-os oldatokat készítettem.

A reakció ProFlex PCR System (Life Technologies) készülékben zajlott. A program hőmérsékleti profilja:

0. 94°C 90 s
 1. 94°C 45 s
 2. 48°C 45 s
 3. 72°C 30 s
 4. 72°C 5 perc
 5. 4°C ∞
- } 30x

Várt PCR termékek (3. táblázat):

Gén kódja az NCBI adatbázisában	Gén elhelyezkedése	Termék hossza (nukleotid)
NC_006127.3	Z kromoszóma	345
NW_003766117.1	W kromoszóma	362

3. táblázat P2/P8 primerek felhasználásával amplifikált gének, és az amplifikált szakasz hossza

Agaróz gélelektroforézis:

A reakció után 3%-os agaróz gélen (3 g agaróz/100 ml TAE (Tris-acetate-EDTA, Tris-acetát-EDTA) puffer, 1 µl etídium-bromid oldat (10mg/ml)) zsebenként 5 µl mintát futtattam 2 órán keresztül, az első órában 90 V, később 150 V feszültséggel. DNS molekulatömeg markerként Gene Ruler 1 kb plus ladder mixet (*Thermo Scientific*) használtam. A futás után a gélről UV fény alatt digitális fényképet készítettem.

Ivar meghatározása Clinton *et.al.* módszerével [69]:

Ennél a módszernél párhuzamos mintákkal két különböző primer párral végeztem a reakciót. Az egyiket az ivar meghatározásának céljából (W3-W5), a másikat (GAPDH3-GAPDH5) kontrollként használtam.

Felhasznált primerek:

W3: GAA ATG AAT TAT TTT CTG GCG AC

W5: CCC AAA TAT AAC ACG CTT CAC T

GAPDH 5: CAG ATC AGT TTC TAT CAG C

GAPDH 3: TGT GAC TTC AAT GGT GAC A

A primerekből *RT-PCR Grade Water* (Ambion) vízzel (20°C-on) először 100 µM-os törzsoldatokat, majd kétszeres hígítással 50 µM-os oldatokat készítettem.

A reakció ProFlex PCR System (Life Technologies) készülékben zajlott. A program hőmérsékleti profilja:

- | | | | |
|----|------|----------|-------|
| 0. | 94°C | 4 perc | |
| 1. | 94°C | 30 s | } 35x |
| 2. | 60°C | 30 s | |
| 3. | 72°C | 30 s | |
| 4. | 72°C | 2,5 perc | |
| 5. | 4°C | ∞ | |

Várt PCR termékek (4. táblázat):

Primer pár	Gén kódja az NCBI adatbázisában	Gén elhelyezkedése	Termék hossza (nukleotid)
W3/W5	NW_003770322.1	W kromoszóma	417
GAPDH3/GAPDH5	NC_006088.3	1-es kromoszóma	700

4. táblázat W3/W5 és GAPDH3/GAPDH5 primerek felhasználásával amplifikált gének, és az amplifikált szakasz hossza

Agaróz gélelektroforézis

A reakció után 1%-os agaróz gélen (1 g agaróz/100 ml TAE (Tris-acetate-EDTA, Tris-acetát-EDTA) puffer, 1 µl etídium-bromid oldat (10mg/ml)) zsebként 5 µl mintát futtattam fél órán keresztül 90 V feszültséggel. DNS molekulatömeg markerként Gene Ruler 1 kb plus ladder mixet (*Thermo Scientific*) használtam. A futás után a gélről UV fény alatt digitális fényképet készítettem.

4.6 RNS izolálás

Felhasznált anyagok:

TRIzol® reagens (life technologies)

Kloroform: analitikai tisztaságú

Izopropanol: analitikai tisztaságú

75%-os etanol: analitikai tisztaságú

Nukleáz mentes víz

Az embriót, illetve a gonádokat steril csipesszel az RNAlater oldatból egy új eppendorf csőbe, TRIzol® oldatba helyeztem át. A sejtenyészeteket már TRIzol® oldatban eltéve tároltuk.

500 µl TRIzol® oldatban felfuszpendált mintához 100 µl kloroformot adtam, majd 3 percig szobahőmérsékleten állni hagytam. Következő lépésként centrifugáltam (15 perc, 12000 rpm, 4°C), melynek hatására az RNS az átlátszó felső fázisba jut. Ezért a felső fázist új eppendorf csőbe pipettáztam át, majd az átpipettázott mennyiséggel megegyező mennyiségű izopropanolt

adtam hozzá. 10 percet szobahőmérsékleten állni hagytam az elegyet, majd újból centrifugáltam (15 perc, 12000 rpm, 4°C). Ez után a pelletben található az RNS. A felülúszót leszívtam és 1 ml 75% etanolt adtam a mintához, majd vortexeltem, hogy a pellet ússzon a folyadékban. Újabb centrifugálás után (5 perc, 7600 rpm, 4°C) leszívtam a felülúszót. A pelletet steril fülke levegőjénél szárítottam, majd mennyiségtől függően 10 µl (a gonádok és a sejtenyészet esetén), illetve 20 µl (a teljes embriók esetén) nukleáz mentes vízben oldottam fel.

Az így kapott RNS oldat koncentrációját NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific) UV-Vis spektrofotométerrel mértem.

4.7 Reverz transzkripció

Felhasznált anyagok:

High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (*Life Technologies*)

Nukleáz mentes víz

A qPCR-hez szükséges az izolált RNS-ből reverz transzkripció révén cDNS-t írni. A reakcióhoz az RNS mennyiségét a spektrofotométerrel mért értékek szerint hígítottam, a teljes embriókból nyert RNS esetén 50 ng/µl, a gonádokból és a sejtenyészetből nyert RNS esetén 25 ng/µl koncentrációra.

A cDNS íráshoz High Capacity cDNA Reverse Transcription Kitet (*Life Technologies*) használtam. A kit leírása szerint 10 µl RNS oldathoz 10 µl RT-master mixet adtam (mindegyik esetben). Az RT-master mix összetétele mintánként (5. táblázat):

<i>RT mix</i>	<i>Mennyiség</i>
nukleáz mentes víz	3,2 µl
10x dNTP	0,8 µl
10x RT puffer	2 µl
10x RT random primer	2 µl
RNáz inhibitor (20u/µl)	1 µl
Reverz transzkriptáz (50u/ µl)	1 µl
Összesen	10 µl

5. táblázat A cDNS íráshoz használt PCR mix összetétele (1 mintára)

A reagensekből a mintaszámhoz képest eggyel több reakcióhoz elegendő mennyiségű RT mixet mértem össze, hogy biztosan ki tudjam mérni mintánként a 10 µl-t. A mixet összekevertem, majd 200 µl-es eppendorf csövekbe 10-10 µl-eket mértem a mixből és a mintákból is. A reakció ProFlex PCR System (Life Technologies) készülékben zajlott. A program hőmérsékleti profilja:

1. 25°C 10 perc
2. 37°C 2 óra
3. 85°C 5 perc
4. 4°C ∞

A reakció végeztével a cDNS oldatokat -20°C-on tároltam.

4.8 Kvantitatív polimeráz láncreakció (qPCR)

Felhasznált anyagok:

Power SYBR Green PCR Master Mix (*Applied Biosystems*)

Primerek (*Integrated DNA Technologies*)

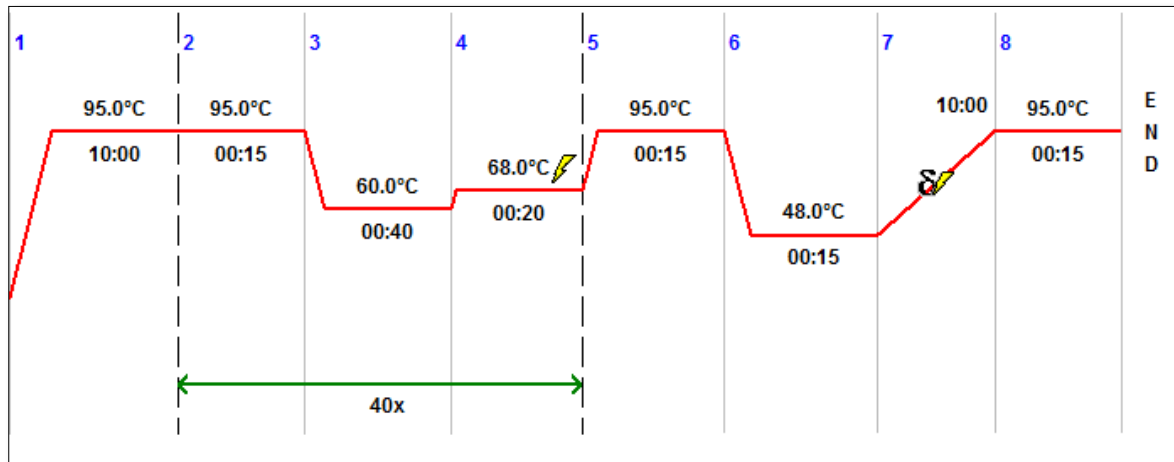
RNáz mentes víz

A qPCR-hez 96 lyukú plate-t használtam, a reakciót Eppendorf Mastercycler ep realplex készülékben végeztem. A reakcióhoz az előzőleg elkészített cDNS oldatokból 1-1 µl-t, a qPCR mixből 14 µl-t mértem be lyukanként. Minden minta/primer esetében 3 párhuzamos mérést végeztem. Egy wellre 14,25 µl-nyi mixet mértem össze, hogy abból 14 µl-t biztonsággal ki tudjak pipettázni. A qPCR mix összetétele (6. táblázat):

<i>qPCR mix</i>	<i>Mennyiség</i>
Power SYBR Green PCR Master Mix	7,50 µl
forward primer (10 µM)	0,75 µl
reverse primer (10 µM)	0,75 µl
RNáz mentes víz	5,25 µl
Összesen	14,25 µl

6. táblázat A qPCR mix összetétele (1 mintára)

A qPCR reakció programja az 5. ábrán látható.



5. ábra A qPCR reakció programja (szoftveres ábra, villám: mérési pont)

A kvantitatív PCR során kapott eredmények értékeléséhez szükséges a mért mennyiségi különbségek korrigálása egy általunk választott viszonyítási alaphoz képest [70]. Normalizációs alapként legelterjedtebben egy belső referencia gént használnak, amit háztartási génnek is neveznek. Ideális esetben a háztartási gén stabilan expresszálódik a szövet fajtájától, a kezelésektől és a minta körülményeitől függetlenül [71].

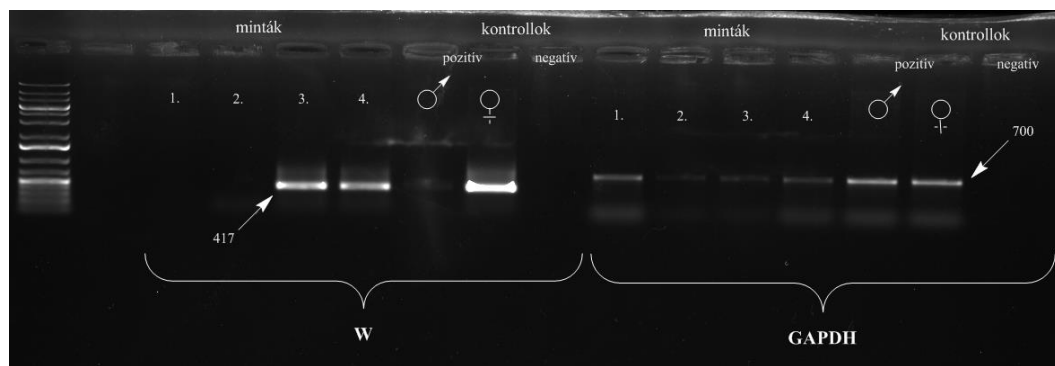
A kísérletek során háztartási géneként GAPDH-t használtam. A gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz egy evolucionálisan konzervált glikolitikus enzim, ami konstitutívan expresszálódik a házityúk minden sejtjében [72]. Emiatt a GAPDH elterjedten alkalmazott háztartási géneként házityúk mintákon történő génexpressziós vizsgálatokban [71].

Az alkalmazott primerek adatai a 7. táblázatban láthatóak.

<i>gén</i>	<i>gén kódja az NCBI Gene adatbázisában</i>			<i>primer hossza</i>	<i>T_m</i>	<i>GC %</i>	<i>termék hossza</i>
GAPDH	NM_204305.1	fw primer	GACGTGCAGCAGGAACACT A	20	60,32	55	112
		rv primer	CTTGGACTTTGCCAGAGAG G	20	58,18	55	
CVH	NM_204708.1	fw primer	GAACCTACCATCCACCAGC A	20	59,38	55	113
		rv primer	ATGCTACCGAAGTTGCCAC A	20	59,96	50	
DAZL	NM_204218.1	fw primer	TTGTCTTGAAGGCCTCGTTT	20	57,66	45	136
		rv primer	ATCCTTGGCAGGTTGTTGA C	20	58,38	50	
POUV	NM_001110178.1	fw primer	GAGGCAGAGAACACGGAC AA	20	59,97	55	109
		rv primer	TTCCCTTCACGTTGGTCTCG	20	59,97	55	
NANO G	NM_001146142.1	fw primer	ATACCCCAGACTCTGCCAC T	20	59,96	55	100
		rv primer	GCCTTCCTTGTCCCACTCTC	20	60,04	60	
SOX2	NM_205188.1	fw primer	GCACCAATACCATGACGAC C	20	58,99	55	119
		rv primer	CATCATCCCATAGCCTCCG T	20	59,02	55	
KLF4	XM_001233583.3	fw primer	CAGAGGAGACAAAGCCCA AG	20	58,18	55	126
		rv primer	TCAGGTGTGCCTTGAGATG A	20	58,65	50	
GATA4	XM_420041	fw primer	GTCACCTCGCTTCTCCTTCT	20	59,11	55	108
		rv primer	TCCCTCCCGTTAGCAGAAA G	20	59,10	55	
CDX2	NM_204311	fw primer	CCCTGGCCTTTGTTAGGTG T	20	59,89	55	95
		rv primer	ATCGTCAGCCCAACAGCAT C	20	60,75	55	
STRA8	XM_416179.4	fw primer	GAGGCACTTCAGCAATCAC A	20	58,47	50	125
		rv primer	ATCCTGGCTTTCCGTCTTCT	20	58,72	50	

7. táblázat A qPCR reakcióhoz használt primerek adatai

A módszert ugyanazon négy házityúk embrióból izolált DNS-en próbáltam ki, mint amit az előző módszer esetében használtam. A PCR után a termékeket 1%-os agaróz gélen futtattam meg. A 9. ábrán látható gélkép alapján az eredmény ugyanaz, mint az előbbieken: az 1-es és a 2-es minta hím egyedből, míg a 3-as és a 4-es minta tojókból származott.

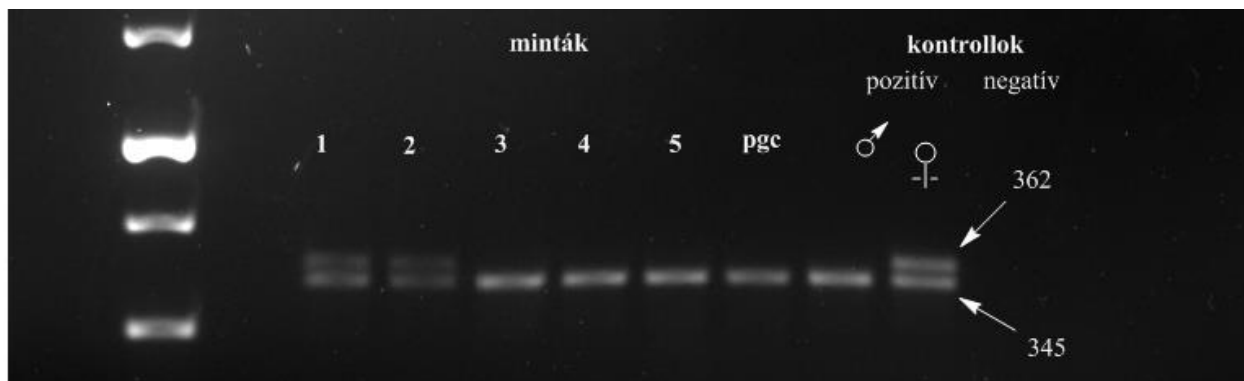


9. ábra Agaróz gélelektroforézis után készített kép: 1-4 házityúk embrióból származó minták, két pozitív kontroll, negatív kontroll

A módszer előnye, hogy az elektroforézis rövidebb ideig tart, így hamarabb kapunk eredményt. Hátránya, hogy a termék hiány okának ellenőrzésére kontroll reakciókat (esetünkben GAPDH génre tervezett primerekkel) is futtatni kell. Végül a további kísérletekhez az itt elsőként leírt Griffiths módszerrel határoztam meg az embriók ivarát.

Egyik jövőbeli tervünk, hogy hím és nőstény embriók bal és jobb oldali ivarszervkezdeményei közötti molekuláris különbségeket vizsgáljunk. Ehhez kezdetben 5 embrióból szedtük ki a gonádokat RNS izolálás céljából, illetve tettünk félre egy-egy szövetdarabot ivar meghatározás céljából (minták 1-5). Emellett vizsgáltam egy embrióból származó szövetdarabot, amelyből származó primordiális csírasejteket később szövettenyészetben tartottunk fent (pgc). A szövetdarabokból történő DNS izolálás után Griffiths módszerrel határoztam meg az egyedek ivarát.

A 10. ábrán látható gélelektroforézis utáni kép alapján az 1-es és 2-es számmal jelölt embriók tojók, míg a 3-as, 4-es és 5-ös számmal jelölt embriók hímek. Az embrió, amiből a PG sejteket nyertük szintén hím.



10. ábra Agaróz gélelektroforézis után készített kép: házityúk embrióból származó minták (1-5 és pgc), két pozitív kontroll, negatív kontroll

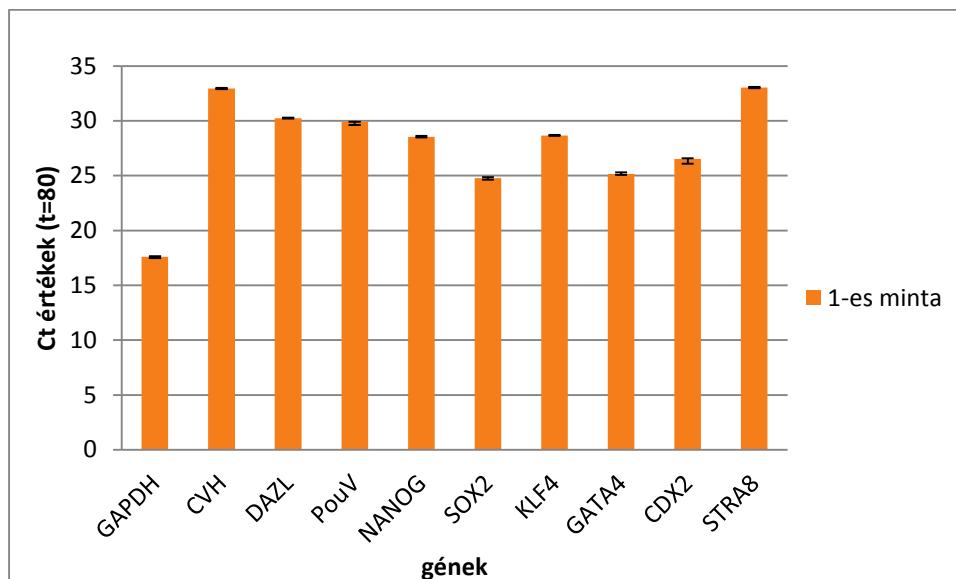
5.2 Össejt specifikus génekre primerek tervezése és azok tesztelése

Munkám első lépéseként olyan össejt specifikus markereket kerestem, amivel az általunk fenntartott primordiális csírasejttenyészet expressziós mintázata vizsgálható. Célunk a PG sejtek hosszú távú fenntartása és fagyasztása. Ha ismerjük a sejtek expressziós mintázatát bizonyos markerekre, akkor azok segítségével vizsgálhatjuk történik-e változás a sejtekben a fenntartás során, illetve fagyasztás után. Összesen kilenc marker kimutatására terveztem primereket. E kilenc gén közül a CVH és a DAZL ismert primordiális csírasejt specifikus markerek. A többi gén az OCT4, SOX2, NANOG, KLF4, GATA4, CDX2 és a STRA8. Ezen gének embrionális össejtekben betöltött szerepéről más fajok (elsősorban egér esetében) már bővebb ismeretekkel rendelkezünk, de házityúk homológjaikat is azonosították már. Az OCT4, SOX2, NANOG és KLF4 emlősökben a legfontosabb pluripotencia markerek közé tartoznak, házityúk homológjaik expresszióját vizsgálták cES sejtek esetében is [37]. Az ES sejtekben jellemzően expresszáló gének egymástól nagy evolúciós távolságra lévő fajokban található homológjaikkal is nagyfokú konzerváltságot mutatnak, ami funkcionális szinten is megjelenhet. Így az egér ES sejtekben leírt markerek házityúk homológjai alkalmasak a házityúk össejtek vizsgálatára. A fent említett hét gén egér és házityúk fehérjetermékeinek szekvenciáinak hasonlóságát illesztéssel ellenőriztem. Ehhez a t-coffee programot használtam, az illesztések a függelékben találhatóak (függelék 1.).

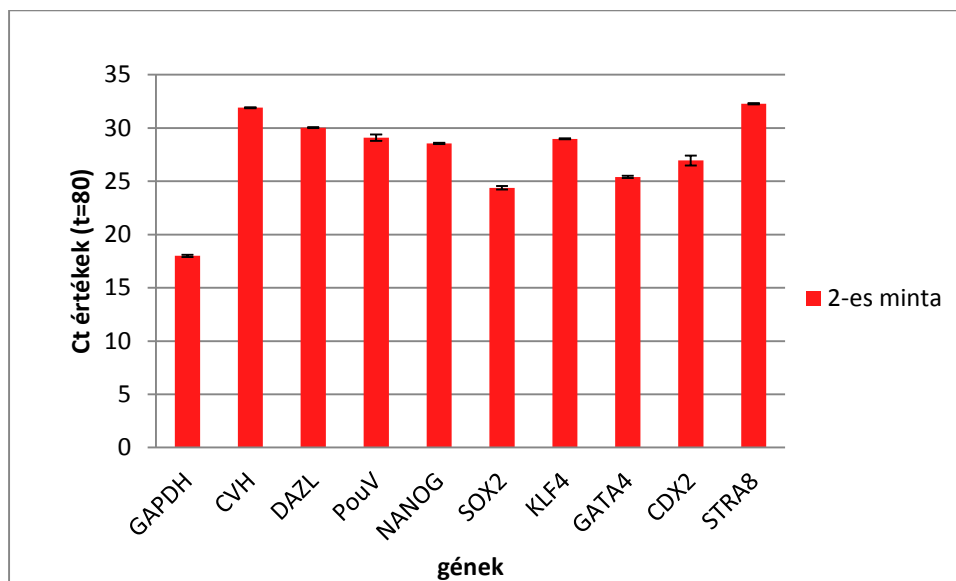
A primerek tervezése előtt az irodalomban kerestem mások által már alkalmazott primereket és ellenőriztem őket. Az irodalomban mindegyik általam vizsgált házityúk génre találtam tervezett primert, de mikor ezeket a Primer3 programba a megfelelő szekvenciákkal együtt bevitettem, egyiküket sem találtam megfelelőnek. Ennek leggyakoribb oka a termék mérete volt. A cikkekben a primereket sokszor PCR-hez tervezték, a termékek hossza 200 nukleotid körül mozgott. Én a qPCR-hez 100 nukleotid körüli termékeket felhozó primereket szerettem volna. Gyakori volt, hogy a primerek jóságát jellemző értékek nem voltak megfelelőek, a program elfogadhatatlannak ítélte a primereket. Ezek a jósági értékek a primerek komplementaritása és a primerek 3' komplementaritása. Minél alacsonyabbak ezek az értékek, annál megfelelőbbek a primerek. A komplementaritás hairpin struktúrák kialakulásához, primer dimerek képződéséhez vezethet. Olyan is előfordult, hogy a cikkben megadott primer szekvenciája nem volt a célgén szekvenciájában. Mindezek után úgy döntöttem, hogy a génekre saját primereket tervezek.

A géneket először az NCBI (National Center for Biotechnology Information) Gene adatbázisában kerestem meg [73]. Az itt található szekvenciákra specifikus primereket a Primer3 primer tervező programmal terveztem, majd az NCBI primer-blast programjával ellenőriztem hogy a primerek valóban csak a kívánt gént hozzák-e fel [74], [75]. Az NCBI primer-blast programja a primereinket különböző adatbázisokban megtalálható szekvenciák ellenében vizsgálja. Fajként a házityúk (*Gallus gallus*) majd adatbázisként a Refseq mRNA beállításával megnéztem, hogy a primerek milyen lehetséges termékeket hozhatnak fel (lásd függelék 2.). A RefSeq mRNA egy nyílt adatbázisa az annotált mRNS nukleotid szekvenciáknak. Lehetőleg a legmegfelelőbb értékű és egyben az adott génre specifikus primereket fogadtam el. Specifikusnak tekintettem azokat a primereket, melyek csak a kívánt, vagy a reakció specifikusságának megzavarásához túl hosszú terméket hoztak volna fel.

A kiválasztott és megrendelt primereket első lépésként leteszteltem. Ehhez két HH16 korú házityúk embriókból izoláltam RNS-t, ebből írtam a cDNS-t amit a qPCR-hez használtam fel. Mindegyik gén esetén kaptam terméket, a program által automatikusan beállított küszöbértéknél ($t=80$) a küszöbciklus értékek (C_t) a 11. és 12. ábrán láthatóak. A negatív kontrollok esetében nem tapasztaltam expressziót.

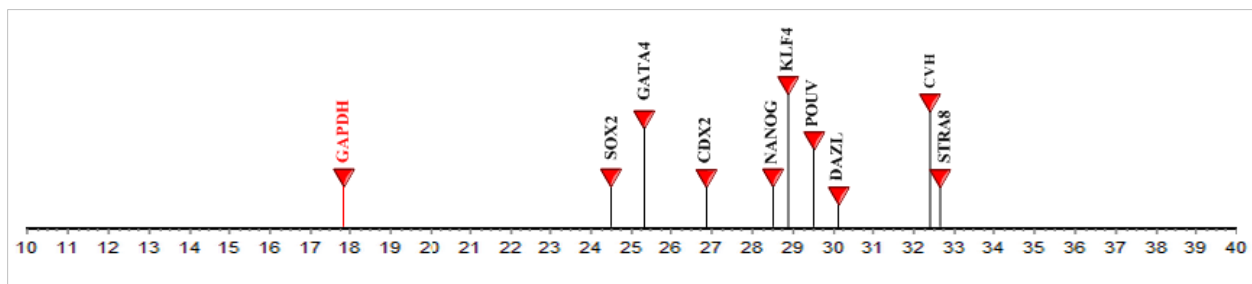


11. ábra Ct értékek (t=80 küszöbértéknél) HH16 embrióból (1) származó minta esetén



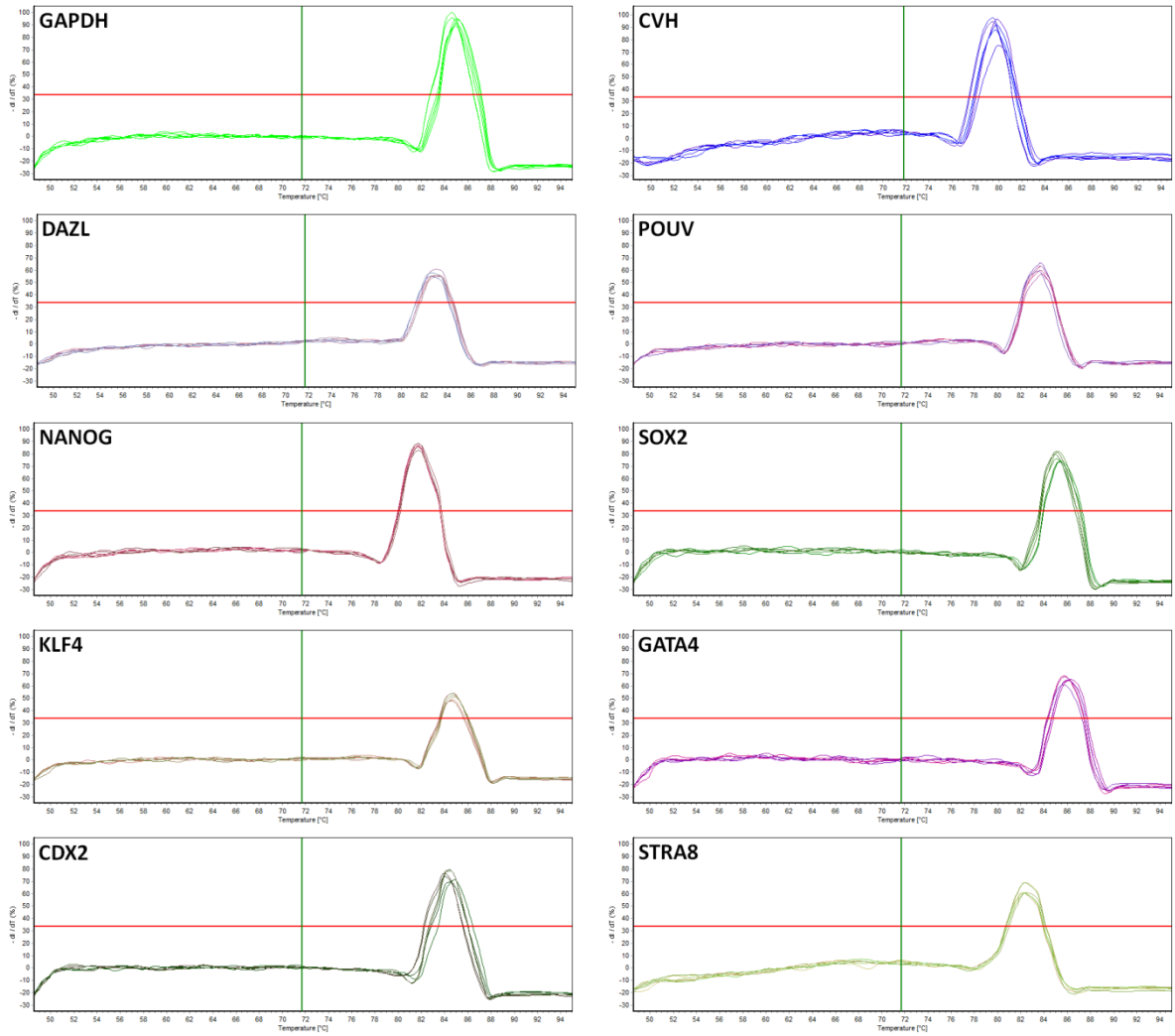
12. ábra Ct értékek (t=80 küszöbértéknél) HH16 embrióból (2) származó minta esetén

A két futás alapján az átlag küszöbértékeket az egyes termékek esetén jobban szemlélteti a 13. ábra.



13. ábra Ct értékek ($t=80$ küszöbértéknél, két HH16 embrióból (1 és 2) származó minták átlaga)

A reakciók specifikusságáról az olvadási görbék alapján bizonyosodtam meg. Minden kettős szálú DNS-nek van egy olvadáspontja, az a hőmérséklet, amin az adott DNS molekulák fele egyszálú formában van jelen a reakcióelegyen. Ez a hőmérséklet függ a DNS szál hosszától, G:C tartalmától, nukleotid sorrendjétől és a helyes Watson-Crick bázispárosodástól. Ha a DNS kettős-szálú DNS-kötő festékkal van jelölve, melegítéskor az olvadáspontot elérve a festék szabadabbá válik, ennek megfelelően a fluoreszcencia hirtelen csökken. A fluoreszcenciát a hőmérséklet függvényében ábrázolva egy csökkenő szigmoid görbét kapunk, aminek az inflexiós pontja adja meg az olvadáspontot. Ezt a görbét negatív derivált alakban szokás ábrázolni, ahol az inflexiós pont egyértelmű csúcsként jelentkezik [70]. Mivel a különböző PCR-termékek olvadási hőmérséklete nagy valószínűséggel más és más, több PCR-termék aspecifikus felszaporodása esetén többcsúcsú derivált görbét kapnánk. A primerek olvadási görbéi a 14-es ábrán láthatóak. Minden esetben egyetlen csúcsot kaptam, ami a primerek specifikusságát jelzi.



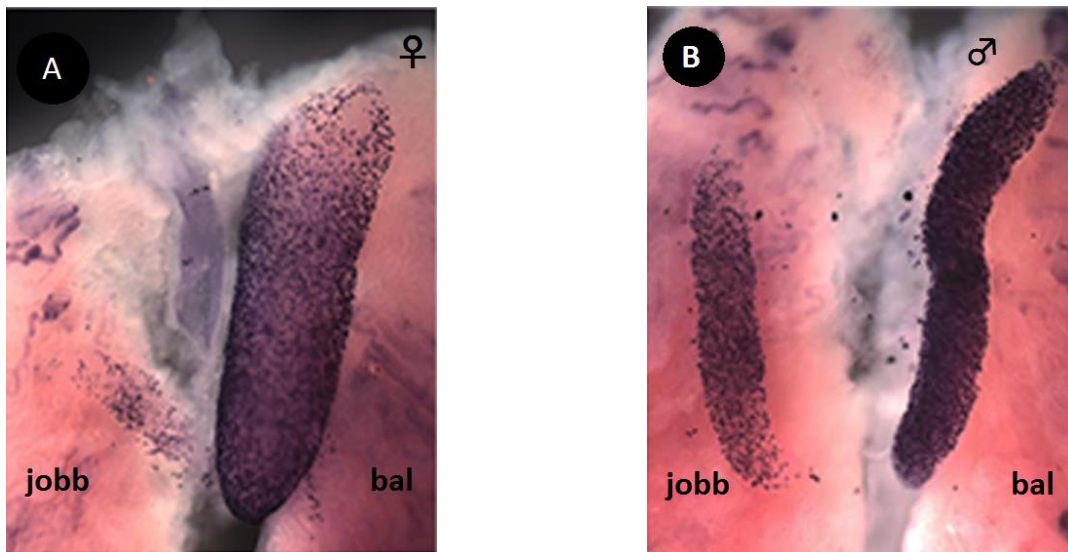
14. ábra Olvadási görbék: két HH16-os korú embrióból származó minták (1 és 2) 3-3 párhuzamos mérésénél felvett olvadási görbék

5.3 Házityúk embriók jobb és bal oldali ivarszervkezdeményeinek génexpressziós vizsgálata

A madarak egyik érdekessége, hogy a tojókban csak a bal oldali petefészek fejlődik ki teljesen, a jobb oldali ivarszervkezdemény visszahúzódása a hetedik embrionális nap (körülbelül HH31) táján indul meg és a kikelés körüli időszakban fejeződik be [28].

Interapat és Stern HH35 körüli embriók bal és jobb oldali gonádjában vizsgálta több gén, köztük a CVH, POUV és a SOX2 pluripotencia gének expresszióját *in situ* hibridizációval. Munkájuk során aszimmetrikus expressziós mintázatot figyeltek meg mind tojó, mind hím embriók esetén [76].

A cikkből származó (15. ábra) jól szemlélteti a különbségeket a bal és jobb oldali gonádok között a két nem esetében.



15. ábra Jobb-bal oldali aszimmetria a cPOUV gén expressziójában (*in situ* hibridizáció): a bal oldali kép tojó, a jobb oldali kép hím embriók gonádjainak metszetét ábrázolja [76]

Munkám során HH35 korú embriókból származó ivarszervkezdeményekből RNS-t izoláltam, reverz transzkriptáz segítségével az RNS-ből cDNS-t írtam. A fentebb említett öt embrióból izolált öt pár gonáddal kezdtem dolgozni, de a 3-as és 4-es mintákból nem sikerült elegendő RNS-t kinyernem a qPCR vizsgálatokhoz. A további minták egy hím és két tojó embrióból származtak. Ezen minták a kiindulási RNS mennyisége miatt csak öt gén vizsgálatára (továbbra

is három párhuzamos mérést végezve) voltak elegendőek. A csak összejtekben expresszáldó CVH és POUV mellett az egyéb szövetekben is előforduló CDX2, SOX2 és GATA4 markereket választottuk, hogy szélesebb spektrumot lefedjünk. (Az 1-es minták és a 2-es és 5-ös minták reakciói két külön plate-en zajlottak. Kontrollként mindegyik plate-re kerültek az egész embrióból származó minták GAPDH primerekkel. Mivel a kontroll mintáknál - azonos küszöbértéknél - azonos Ct értékeket kaptam, ezért a többi értéket is együtt értékeltem.)

A qPCR során háztartási génként a GAPDH-t használtam, az eredményeket a GenEx szoftver segítségével értékeltem, a hagyományos $\Delta\Delta Ct$ metodika szerint.

A $\Delta\Delta Ct$ módszer a Ct értékek közvetlen összehasonlításán alapuló relatív mennyiségi meghatározási módszer. Abból az alapfeltevésből indul ki, hogy ha két minta Ct különbsége 1, akkor a kezdeti templát mennyiségének különbsége kétszeres, a kisebb Ct értékű minta javára. A Ct különbség növekedésével a kezdeti templát szekvencia különbség exponenciálisan nő [70]. Első lépésként a kapott Ct értékeket a háztartási génre normalizáljuk:

$$\Delta Ct = Ct_{\text{gén}} - Ct_{\text{GAPDH}}$$

Ezután kiválasztunk egy referencia szintet (ref), amire a ΔCt értékeket relativizáljuk:

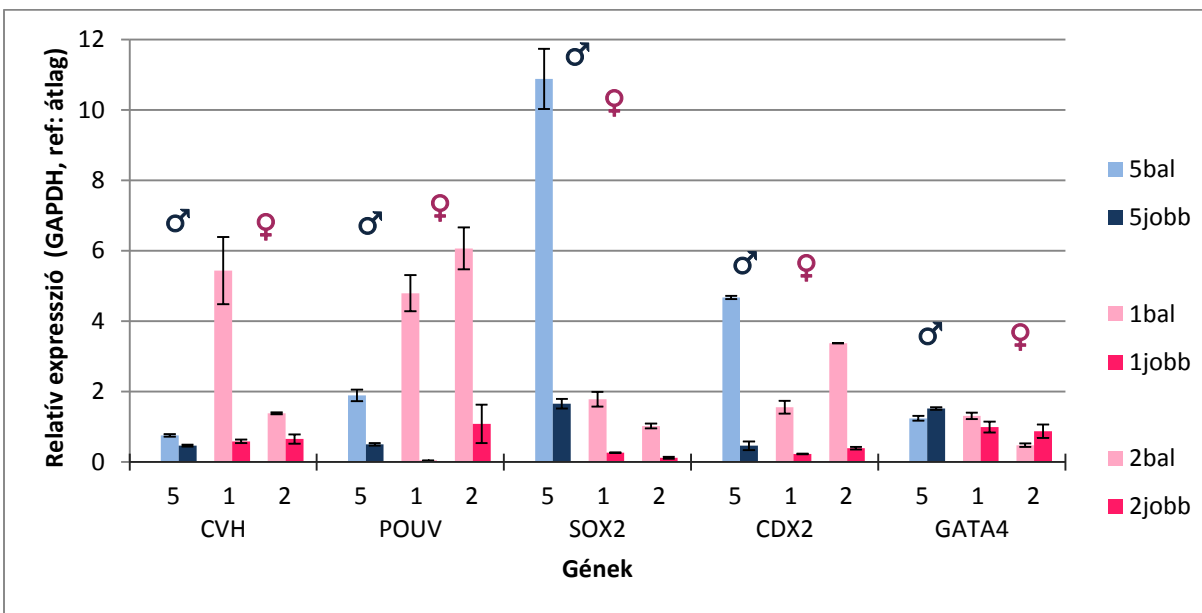
$$\Delta\Delta Ct_{\text{gén}} = \Delta Ct_{\text{gén}} - \text{ref}$$

Ez a referencia szint lehet például az összes futás átlaga, az egyik minta vagy az egyik vizsgált gén. A relatív mennyiségeket ezután az exponenciális futásból következő összefüggéssel kaphatjuk:

$$\text{Gén relatív mennyisége} = 2^{-\Delta\Delta Ct_{\text{gén}}}$$

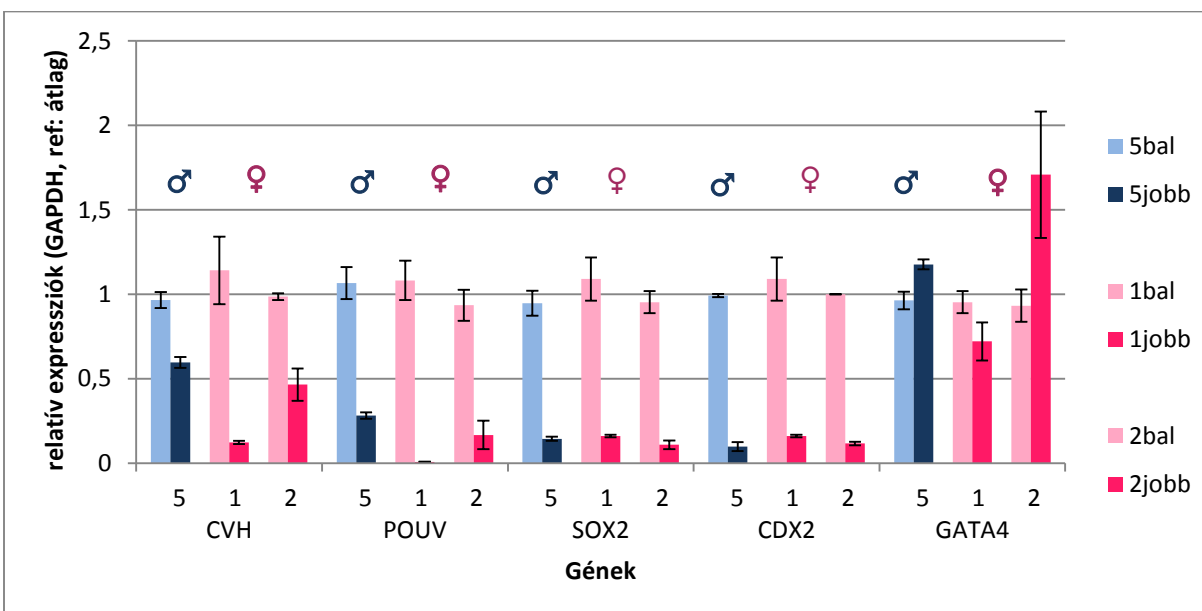
Az így kapott relatív expressziós értékek egymással összevethetőek és a nagyobb érték nagyobb kiindulási koncentrációt jelent.

Jelen esetben referencia szintnek az összes futás átlagát vettem. Az így kapott relatív expresszió értékek a 16. ábrán láthatóak.



16. ábra Relatív expresszió értékek: egy hím (kék) és két tojó (rózsaszín) embrió bal és jobb gonádjaiban

Még egy ábrát készítettem, melyen minden bal oldali minta egyik párhuzamosának értékéhez, mint 1-hez hasonlítottam minden további (többi bal oldali párhuzamos és a jobb oldali) értékeket. Így a párhuzamosok közötti szórás továbbra is megjelenik, de a bal és jobb oldalak közötti különbségek jobban láthatóak (17. ábra).



17. ábra Relatív expresszió arányok: hím (kék) és tojók (rózsaszínnel), bal és jobb oldali gonádjaiban

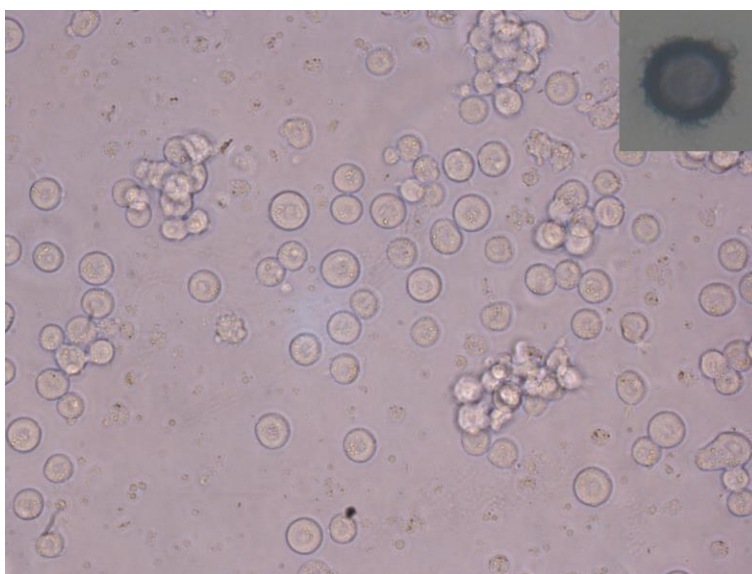
Az ábra alapján a GATA4 kivételével a többi gén esetében jelentős különbségek figyelhetők meg a bal és a jobb oldal között mindegyik nem esetében. A CVH és a POUV esetében nagyon hasonló eredményeket kaptunk, mint a korábbi publikációban, ahol a CVH expressziójában hímeknél csak kétszeres, a tojóknál nagyságrendi különbséget, a POUV expressziójánál a hímeknél háromszoros, a tojóknál körülbelül négyszeres különbséget figyeltek meg a bal és jobb oldal között. A SOX2 esetében adataik nem mutatnak nagy különbséget a két nem között, ellentétben az általunk kapott eredményekkel. Összességében két, alapjaiban eltérő módszerrel végzett vizsgálat is arra utal, hogy jelentős az aszimmetria a vizsgált gének expressziójában házityúk embriók ivarszervkezdeményeiben.

Jövendőbeli tervünk mindkét nemből a jobb és bal oldali ivarszervkezdeményekben az összejt specifikus miRNS-ek vizsgálata. A miRNS-ek endogén, kb. 22 nukleotid hosszúságú RNS-ek, melyek a génexpresszió szabályozását végzik állatokban és növényekben egyaránt [77]. Rendkívül sok folyamatban játszanak fontos szerepet, mint például a sejthalál, a sejtosztódás, vagy a sejtdifferenciálódás. Az embrionális fejlődéssel párhuzamosan a mikroRNsek expressziós mintázata dinamikusan változik több faj és különböző szövetek esetében is. Egerekben már megmutatták, hogy az miRNS-ek specifikus expressziója szükséges a PG sejtek és a csíravonal fejlődéséhez [78].

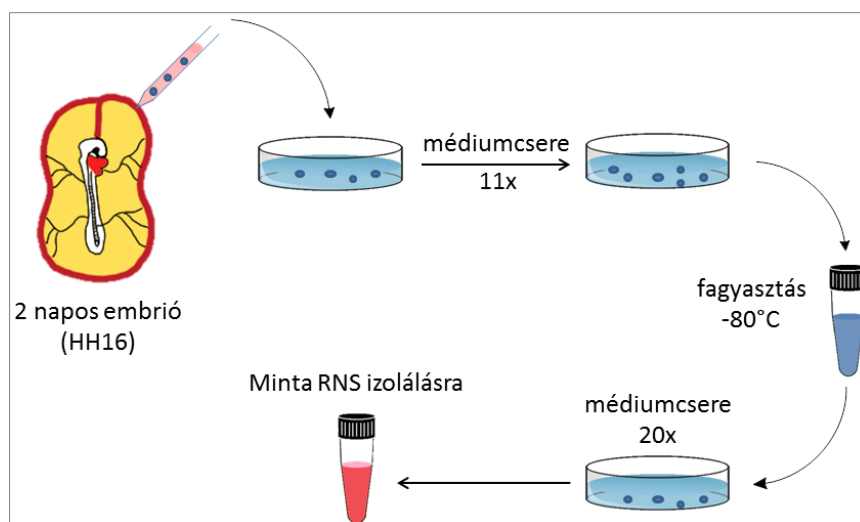
További kísérleteinkben a miRNS-ek primordiális csírasejtek differenciálódásában betöltött szerepüket szeretnénk vizsgálni. A házityúk embrionális fejlődése során több stádiumban szeretnénk génexpressziós vizsgálatokat végezni és megfigyelni, hogy a miRNS-k, mint korai markerek változása megelőzi-e a transzkripció faktorok változását.

5.4 PG sejtenyészet expressziós mintázatának vizsgálata

HH16 korú embrióból származó PG sejtenyészetek expressziós mintázatát is vizsgáltam. A tenyésztett sejtekből (18 ábra) sajnos nagyon kis mennyiség állt rendelkezésemre. A sejtek egy HH16-os korú embrióból származtak, négy hét fenntartás után fagyasztottuk, majd két és fél hét múlva felengedtük őket. A felengedés után hat hét fenntartás követően 3 csőbe gyűjtöttük őket RNS izolálás céljából (19. ábra).



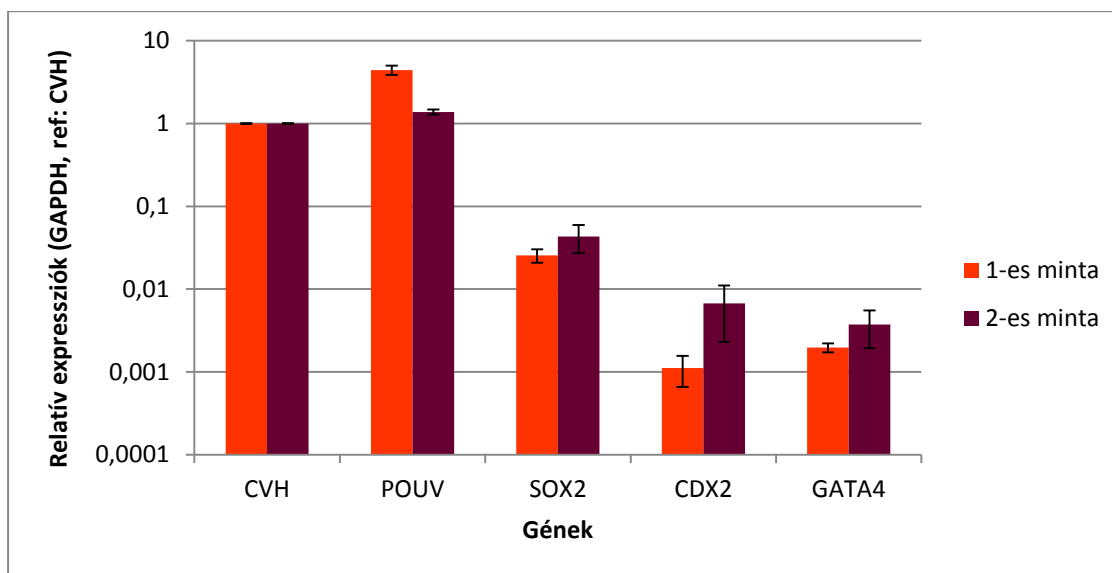
18. ábra Primordiális csírasejt tenyészet: Lázár Bence felvétele (jobb felső sarok: SE labor saját ellenanyaggal festett PG sejt)



19. ábra PG sejtek izolálása, fenntartása, fagyasztása és mintavétel az RNS izoláláshoz (saját ábra)

Az RNS izolálás során a három csőben elrakott mintákat külön kezeltem. Az RNS mennyisége jelentősen eltért a három cső között, feltehetőleg az eredetileg különböző mennyiségű elrakott sejt miatt. Az egyik mintában túl kevés RNS volt ahhoz, hogy abból további vizsgálatokat végezzek. A másik két mintában is csak öt gén vizsgálatához volt elegendő mennyiség. Ez az öt gén hasonlóan az ivarszervek esetéhez a CVH, POUV, SOX2, CDX2 és a GATA4 volt. Az RNS oldatokat azonos koncentrációra hígítottam, majd reverz transzkripcióval cDNS-t írtam.

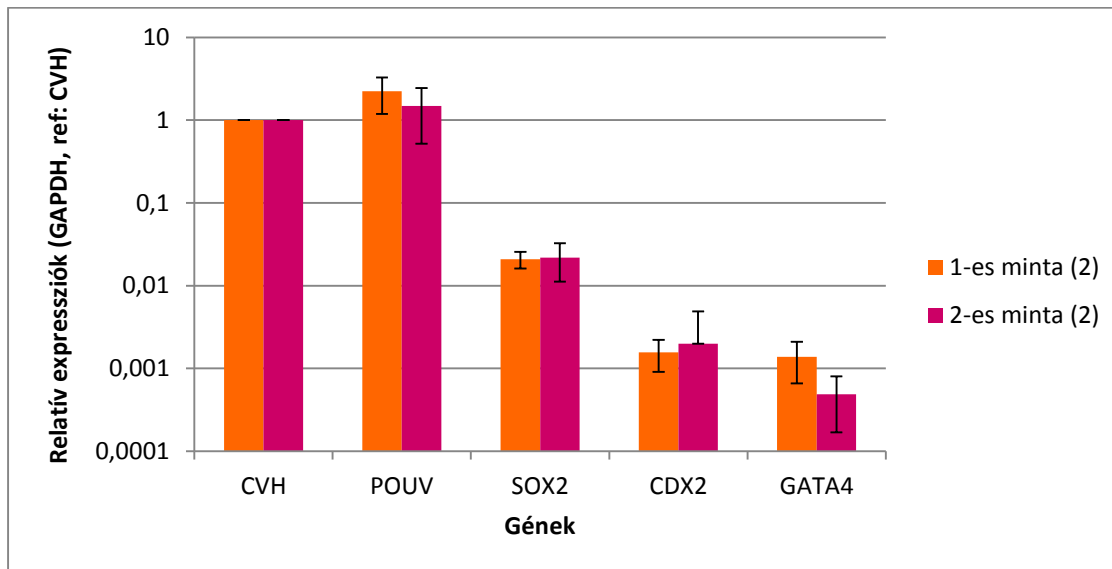
A qPCR során az előzőekhez hasonlóan háztartási génként a GAPDH-t használtam, az eredményeket a GenEx szoftver segítségével értékeltem. A Ct értékeket a hagyományos $\Delta\Delta C_t$ metodika szerint először a háztartási génre normalizáltam, majd referencia szintnek a CVH gént (mint a PG sejtek markerét) véve relativizáltam az adatokat (20. ábra).



20. ábra Relatív expresszió értékek PG sejtenyészethen (első mérés)

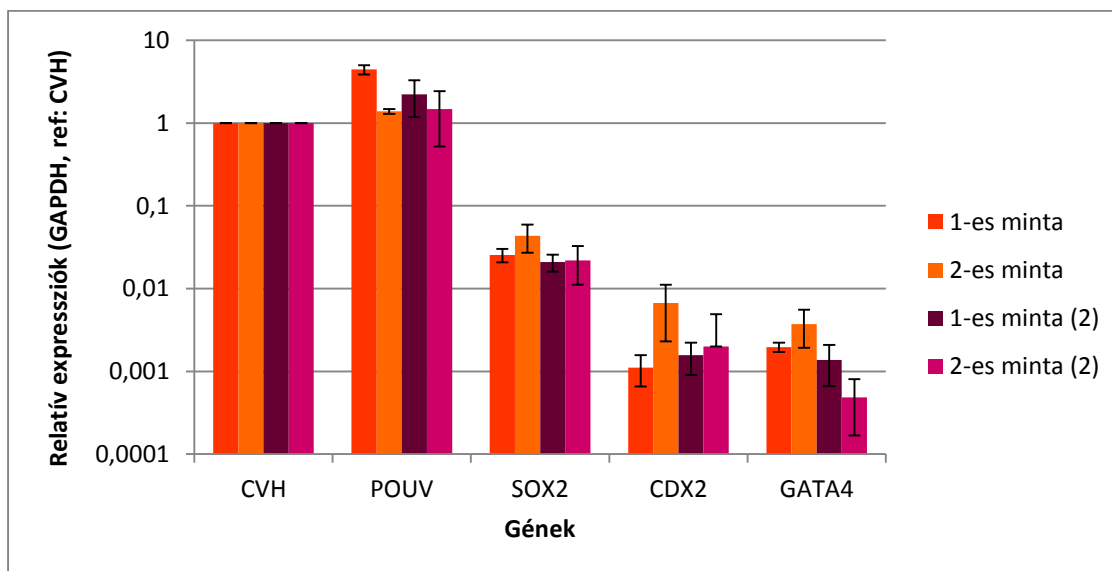
Bizonyos gének esetében (pl. a POUV) a minták közötti különbség jóval meghaladta a mintákon belüli szórás értékét. Mivel arra számítottunk, hogy az expressziós mintázatok nem mutatnak nagy eltérést egymástól (lévén a két minta ugyanabból a sejtuszuspenzióból származott), megismétltem a mérést, hogy lássam a különbség valós eltérésből, vagy esetleges mérési hibából ered.

Az adatokat ugyanúgy értékeltem, mint az előbbieken (21. ábra).



21. ábra Relatív expresszió értékek PG sejttényészetben (második mérés)

Ennél a mérésnél kisebb eltéréseket tapasztaltam a minták között. A két mérés eredményei együtt láthatóak a 22. ábrán.



22. ábra Relatív expresszió értékek PG sejttényészetben (két mérés együtt)

A két minta két mérése során (3-3 ismétléssel) kapott adatokat kétfaktoros varianciaanalízis (ANOVA) vizsgálatnak vetettem alá, ahol az egyik faktor a minta, a másik pedig az időbeli eltérés. A statisztikai eredmények alapján a minták és az időbeli eltérés hatása nem szignifikáns ($p < 0,05$), viszont érdekes módon a két faktor kölcsönhatása szignifikánsnak bizonyult a legtöbb gén esetében.

Mivel az eredmények nem egyértelműek és nincsen arra utaló jel, hogy az első mérés során tapasztalt különbségeket mérési hiba okozta, fontolóra veendő a robusztusság növelésére irányuló módszerváltoztatás. A sejtszuspenzióból történő mintavétel nehezen reprodukálható a sejtek gyors ülepedése miatt, továbbá a sejtek között eltérő mennyiségben maradhatnak az embrió véreből származó esetleges RNS szennyeződések, amik befolyásolhatják a folyamat végén mért expressziós szinteket. Ha csak a PG sejt frakciót tudnám analizálni, pontosabb, jobban értékelhető adatokat lehetne kapni. Ennek egyik lehetséges módja Anti-SSEA-1 ellenanyagot hordozó mágnesezhető mikrogyöngyök alkalmazása [79].

A mikrogyöngyök megkötik az SSEA-1 antigénnel rendelkező primordiális csírasejteket. A kapott szuspenziót egy oszlopra töltjük, amit utána erős mágneses térbe helyezünk. A mágneses tér hatására a mikrogyöngyök (és az általuk kötött PG sejtek) az oszlopon maradnak. Tisztítási lépéseket követően az oszlopot a mágneses térből kivéve a mikrogyöngyök eluálhatóak és a PG sejtek regenerálhatóak.

Ezen kívül terveim között szerepel a relatív kvantifikáció helyett abszolút standardok használata, amelyek pontosabb eredményt nyújtanak és az értékelés során a referencia szint választása elhagyható. Abszolút standard sort a templát szekvencia kópiájának pontos ismeretében készíthetünk [70]. Ezt úgy tudjuk megvalósítani, hogy a templát szekvenciákat plazmidba építve azokat felszaporítatjuk, majd izoláljuk. Az izolált plazmidok tömege megadja a kópiaszámot, melyek ismeretében megfelelő hígításokkal standard sor készíthető. A qPCR után meghatározzuk a standard sor tagjaihoz tartozó Ct értékeket és azokat az ismert koncentráció logaritmusának függvényében ábrázoljuk. Az így kapott pontokra egy kalibrációs egyenes illeszthető, aminek segítségével minden ismeretlen minta Ct értékéből következtethetünk annak kiindulási mennyiségére [70].

6 Összefoglalás

A házityúk kiváló alanya a fejlődésbiológiai és őssejt kutatásoknak elsősorban az embriók könnyű hozzáférhetősége miatt. A primordiális csírasejtek a csíravonal prekursorai, melyek a későbbiekben érett pete-, illetve hímivarsejtté differenciálódnak. A PG sejtek két napos házityúk embriók dorzális aortájából izolálhatóak, majd ezt követően *in vitro* sejtenyésztésben hosszabb ideig fenntarthatóak.

TDK munkám során embrionális őssejtekre jellemző markereket vizsgáltam. Az őssejt specifikus transzkripciós faktorokra specifikus primereket terveztem, majd két napos házityúk embriókon teszteltem azok expresszióját.

A primereket felhasználva embriók ivarszervkezdeményeiből származó mintákon qPCR-rel vizsgáltam a markergének expresszióját és jelentős aszimmetriát figyeltem meg a két oldal között mindkét nem esetében. A kísérlettel egy korábbi cikkben közölt, más technikával nyert eredményekhez hasonló eredményt kaptam. A továbbiakban az embrionális fejlődés több különböző stádiumában szeretnék génexpressziós vizsgálatokat végezni az ivarszervkezdeményekben, és megfigyelni, hogy a miRNS-k, mint korai markerek változása megelőzi-e ezen transzkripciós faktorok változását.

Házityúk embriók véréből izolált primordiális csírasejtenyésztés expressziós mintázatát is vizsgáltam, de a kevés rendelkezésemre álló mintából ellentmondásos eredményeket kaptam. Még további méréseket tervezek elvégezni, lehetőség szerint a már tisztított PG sejteken. Emellett abszolút standard sorokat szeretnék készíteni az egyes termékekre és a relatív expresszió mérés helyett abszolút kvantifikációt végezni. A sejtenyésztés expressziós mintázatának megfigyelésével lehetőségünk lenne a sejtekben a fenntartás alatt és a fagyasztás hatására bekövetkező esetleges változásokat megfigyelni. Távlati célunk, hogy laborunkban házityúk PG sejtek fenntartására és vizsgálatára alkalmazott módszereket más madarakra (elsőként az őshonos erdélyi kopasznnyakú tyúkra) is adaptáljuk. A PG sejtek gyűjtése, megőrzése és recipiens állatba történő visszainjektálása révén lehetséges ivarsejtkimérák előállítása. A létrejött ivarsejtkimérák segítségével a donor utódja létrehozható, ezáltal a primordiális csírasejtek alkalmasak génmegőrzési célokra. Az embriók ivarának meghatározásával elérhető, hogy a donor és a recipiens embrió azonos nemű legyen. Mivel az embrionális fejlődés kezdetén csak molekuláris

vizsgálatokkal lehet meghatározni az egyedek ivarát, munkám során két olyan módszert is adaptáltam, melyek az ivar meghatározását teszik lehetővé polimeráz láncreakcióval. Mindkét módszer, a jövőben alkalmas lehet embrionális szövetből történő ivarmeghatározásra.

7 Irodalomjegyzék

- [1] P. B. Siegel, J. B. Dodgson, and L. Andersson, "Progress from chicken genetics to the chicken genome.," *Poult. Sci.*, vol. 85, no. 12, pp. 2050–60, Dec. 2006.
- [2] S. Intarapat and C. D. Stern, "Chick stem cells: current progress and future prospects.," *Stem Cell Res.*, vol. 11, no. 3, pp. 1378–92, Nov. 2013.
- [3] Y. Nakamura, H. Kagami, and T. Tagami, "Development, differentiation and manipulation of chicken germ cells.," *Dev. Growth Differ.*, vol. 55, no. 1, pp. 20–40, Jan. 2013.
- [4] H. Woelders, C. a Zuidberg, and S. J. Hiemstra, "Animal genetic resources conservation in the Netherlands and Europe: poultry perspective.," *Poult. Sci.*, vol. 85, no. 2, pp. 216–22, Feb. 2006.
- [5] F. Silversides, "Novel techniques for preserving genetic diversity in poultry germplasm.," *CAB Rev. Perspect. Agric. Vet. Sci. Nutr. Nat. Resour.*, vol. 7, no. 068, pp. 1–8, Dec. 2012.
- [6] W. M. Muir, G. K.-S. Wong, Y. Zhang, J. Wang, M. a M. Groenen, R. P. M. a Crooijmans, H.-J. Megens, H. Zhang, R. Okimoto, A. Vereijken, A. Jungerius, G. a a Albers, C. T. Lawley, M. E. Delany, S. MacEachern, and H. H. Cheng, "Genome-wide assessment of worldwide chicken SNP genetic diversity indicates significant absence of rare alleles in commercial breeds.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 105, no. 45, pp. 17312–7, Nov. 2008.
- [7] FAO, *The State of the World's Animal Genetic Resources for Food and Agriculture*. 2007, pp. Rome, Italy.
- [8] "4/2007. (I. 18.) FVM–KvVM együttes rendelet a védett őshonos mezőgazdasági állatfajták és a veszélyeztetett mezőgazdasági állatfajták körének megállapításáról," no. 1. 2007.
- [9] Y. Song and F. G. Silversides, "Offspring Produced from Orthotopic Transplantation of Chicken Ovaries.," *Poult. Sci.*, vol. 86, no. 1, pp. 107–111, 2007.
- [10] F. G. Silversides, P. H. Purdy, and H. D. Blackburn, "Comparative costs of programmes to conserve chicken genetic variation based on maintaining living populations or storing cryopreserved material.," *Br. Poult. Sci.*, vol. 53, no. 5, pp. 599–607, Jan. 2012.
- [11] J. E. Lovelock and C. Polge, "The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol.," *Biochem. J.*, vol. 58, no. 4, pp. 618–22, Dec. 1954.
- [12] B. J. Fuller, N. Lane, and E. E. Benson, *Life in the Frozen State*. 2004, pp. 371–392.
- [13] E. Blesbois, F. Seigneurin, I. Grasseau, C. Limouzin, J. Besnard, D. Gourichon, G. Coquerelle, P. Rault, and M. Tixier-Boichard, "Semen cryopreservation for ex situ management of genetic diversity in chicken: creation of the French avian cryobank.," *Poult. Sci.*, vol. 86, no. 3, pp. 555–64, Mar. 2007.
- [14] G. M. Fahy, B. Wowk, J. Wu, J. Phan, C. Rasch, A. Chang, and E. Zendejas, "Cryopreservation of organs by vitrification: perspectives and recent advances.," *Cryobiology*, vol. 48, no. 2, pp. 157–78, Apr. 2004.

- [15] J. Liu, Y. Song, K. M. Cheng, and F. G. Silversides, "Production of donor-derived offspring from cryopreserved ovarian tissue in Japanese quail (*Coturnix japonica*).," *Biol. Reprod.*, vol. 83, no. 1, pp. 15–9, Jul. 2010.
- [16] A. Tajima, "Production of germ-line chimeras and their application in domestic chicken.," *Avian Poult. Biol. Rev.*, vol. 13, no. 1, pp. 15–30, 2002.
- [17] J. N. Petite, M. E. Clark, G. Liu, a M. Verrinder Gibbins, and R. J. Etches, "Production of somatic and germline chimeras in the chicken by transfer of early blastodermal cells.," *Development*, vol. 108, no. 1, pp. 185–9, Jan. 1990.
- [18] K. Kino, B. Pain, S. P. Leibo, M. Cochran, M. E. Clark, and R. J. Etches, "Production of chicken chimeras from injection of frozen-thawed blastodermal cells.," *Poult. Sci.*, vol. 76, no. 5, pp. 753–60, May 1997.
- [19] P. G. Reynaud, F. Sciences, and U. Aix-marseille, "Transfert de cellules germinales primordiales de Dindon a Fembryon de Poulet par injection intravasculaire.," vol. 21, no. June, pp. 485–507, 1969.
- [20] S. K. Vick L, Li Y, "Transgenic birds from transformed primordial germ cells.," *Proc. Biol. Sci. /The R. Soc.*, vol. 251, no. 1332, pp. 179–82, 1993.
- [21] J. N. Petite, M. E. Clark, and R. J. Etches, "Assessment of functional gametes in chickens after transfer of primordial germ cells.," *J. Reprod. Fertil.*, vol. 92, no. 1, pp. 225–9, May 1991.
- [22] A. Tajima, M. Naito, Y. Yasuda, and T. Kuwana, "Production of Germ Line Chimera by transfer of Primordial Germ Cells in the Domestic Chicken (*Gallus domesticus*).," *Theriogenology*, vol. 40, no. 3, pp. 509–519, 1993.
- [23] P. E. Mozdziak, B. Rushton, S. L. Pardue, and J. N. Petite, "Isolation of Chicken Primordial Germ Cells Using Fluorescence-Activated Cell Sorting.," *Poult. Sci.*, vol. 84, no. 4, pp. 594–600, 2005.
- [24] Y. Yamamoto, F. Usui, Y. Nakamura, Y. Ito, T. Tagami, K. Nirasawa, Y. Matsubara, T. Ono, and H. Kagami, "A novel method to isolate primordial germ cells and its use for the generation of germline chimeras in chicken.," *Biol. Reprod.*, vol. 77, no. 1, pp. 115–9, Jul. 2007.
- [25] J. Macdonald, J. D. Glover, L. Taylor, H. M. Sang, and M. J. McGrew, "Characterisation and germline transmission of cultured avian primordial germ cells.," *PLoS One*, vol. 5, no. 11, p. e15518, Jan. 2010.
- [26] O. T. Chang IK, Yoshiki A, Kusakabe M, Tajima A, Chikamune T, Naito M, "Germ line chimera produced by transfer of cultured chick primordial germ cells.," *Cell Biol. Int.*, vol. 19, no. 7, pp. 569–76, 1995.
- [27] K. T. Tajima A, Naito M, Yasuda Y, "Production of germ-line chimeras by transfer of cryopreserved gonadal primordial germ cells (gPGCs) in chicken.," *J. Exp. Zool.*, vol. 280, no. 3, pp. 265–267, 1998.

- [28] P. E. Mozdziak, R. Wysocki, J. Angerman-Stewart, S. L. Pardue, and J. N. Petitte, "Production of chick germline chimeras from fluorescence-activated cell-sorted gonocytes.," *Poult. Sci.*, vol. 85, no. 10, pp. 1764–8, Oct. 2006.
- [29] H. Eyal-Giladi and S. Kochav, "From cleavage to primitive streak formation: a complementary normal table and a new look at the first stages of the development of the chick. I. General morphology.," *Dev. Biol.*, vol. 49, no. 2, pp. 321–37, Apr. 1976.
- [30] Dr. Zboray Géza, *Összehasonlító anatómiai praktikum II.* 2001.
- [31] Dr. Zboray Géza, dr. Sass Miklós, and dr. Kőműves László, *Embryologia.* 2004, pp. 79–110.
- [32] F. Lavial and B. Pain, "Chicken embryonic stem cells as a non-mammalian embryonic stem cell model.," *Dev. Growth Differ.*, vol. 52, no. 1, pp. 101–14, Jan. 2010.
- [33] Scott F. Gilbert, *Developmental Biology.* 2006.
- [34] V. Hamburger and H. L. Hamilton, "A Series of Normal Stages in the Development of The Chick Embryo.," *J. Morphol.*, vol. 88, no. 1, 1951.
- [35] Németh Kinga and Gócza Elen, "Össejtek-e az embrionális össejtek?," *Természet Világa*, vol. 145, no. 9, 2014.
- [36] M. J. Evans and M. H. Kaufman, "Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos.," *Nature*, vol. 292, pp. 154–156, 1981.
- [37] C. Jean, P. Aubel, C. Soleihavoup, F. Bouhallier, S. Voisin, F. Lavial, and B. Pain, "Pluripotent genes in avian stem cells.," *Dev. Growth Differ.*, vol. 55, no. 1, pp. 41–51, Jan. 2013.
- [38] J. a Thomson, J. Kalishman, T. G. Golos, M. Durning, C. P. Harris, R. a Becker, and J. P. Hearn, "Isolation of a primate embryonic stem cell line.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 92, no. 17, pp. 7844–8, Aug. 1995.
- [39] J. a. Thomson, "Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts.," *Science (80-.).*, vol. 282, no. 5391, pp. 1145–1147, Nov. 1998.
- [40] Elen Gócza, "Emlősállatok klónozása.," *Természet Világa*, vol. 128, no. 8, pp. 352–356, 1997.
- [41] Spratt N. T. and Haas H., "Integrative mechanisms in development of the early chick blastoderm. III. Role of cell population size and growth potentiality in synthetic systems larger than normal.," *J. Exp. Zool.*, vol. 147, pp. 271–93, 1961.
- [42] B. Pain, M. E. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut, and R. J. Etches, "Long-term in vitro culture and characterisation of avian embryonic stem cells with multiple morphogenetic potentialities.," *Development*, vol. 122, no. 8, pp. 2339–48, Aug. 1996.
- [43] Hotchkiss R, "A microchemical reaction resulting in the staining of polysaccharide structures in fixed tissue preparations.," *Arch. Biochem.*, vol. 16, no. 1, pp. 131–141, 1948.

- [44] F. Lavial, H. Acloque, E. Bachelard, M. A. Nieto, J. Samarut, and B. Pain, "Ectopic expression of *Cvh* (Chicken Vasa homologue) mediates the reprogramming of chicken embryonic stem cells to a germ cell fate.," *Dev. Biol.*, vol. 330, no. 1, pp. 73–82, Jun. 2009.
- [45] N. Tsunekawa, M. Naito, Y. Sakai, T. Nishida, and T. Noce, "Isolation of chicken vasa homolog gene and tracing the origin of primordial germ cells.," *Development*, vol. 127, no. 12, pp. 2741–50, Jun. 2000.
- [46] S. S. Tanaka, Y. Toyooka, R. Akasu, Y. Katoh-Fukui, Y. Nakahara, R. Suzuki, M. Yokoyama, and T. Noce, "The mouse homolog of *Drosophila* Vasa is required for the development of male germ cells.," *Genes Dev.*, vol. 14, no. 7, pp. 841–53, Apr. 2000.
- [47] D. Rengaraj, Y. H. Zheng, K. S. Kang, K. J. Park, B. R. Lee, S. I. Lee, J. W. Choi, and J. Y. Han, "Conserved expression pattern of chicken *DAZL* in primordial germ cells and germ-line cells.," *Theriogenology*, vol. 74, no. 5, pp. 765–76, Sep. 2010.
- [48] Y. Nakamura, Y. Yamamoto, F. Usui, T. Mushika, T. Ono, A. R. Setioko, K. Takeda, K. Nirasawa, H. Kagami, and T. Tagami, "Migration and Proliferation of Primordial Germ Cells in the Early Chicken Embryo.," *Poult. Sci.*, vol. 86, no. 10, pp. 2182–2193, 2003.
- [49] C. T. Tajima A, Hayashi H, Kamizumi A, Ogura J, Kuwana T, "Study on the concentration of circulating primordial germ cells (cPGCs) in early chick embryos.," *J Exp Zool.*, vol. 284, no. 7, pp. 759–64, 1999.
- [50] Charles H. Swift, "Origin of the sex-cords and definitive spermatogonia in the male chick.," *Am. J. Anat.*, vol. 20, no. 3, pp. 375–410, 1916.
- [51] Charles H. Swift, "Origin of the definitive sex-cells in the female chick and their relation to the primordial germ-cells.," *Am. J. Anat.*, vol. 18, no. 3, pp. 4417–470, 1915.
- [52] M. M. Perry, "Nuclear events from fertilisation to the early cleavage stages in the domestic fowl (*Gallus domesticus*).," *J. Anat.*, vol. 150, pp. 99–109, Feb. 1987.
- [53] J. Yu and J. A. Thomson, "Pluripotent stem cell lines.," *Genes Dev.*, vol. 22, pp. 1987–1997, 2008.
- [54] R. A. Rosselló, C.-C. Chen, R. Dai, J. T. Howard, U. Hochgeschwender, and E. D. Jarvis, "Mammalian genes induce partially reprogrammed pluripotent stem cells in non-mammalian vertebrate and invertebrate species.," *Elife*, vol. 2, p. e00036, Jan. 2013.
- [55] A. Parikh, E. R. Miranda, M. Katoh-Kurasawa, D. Fuller, G. Rot, L. Zagar, T. Curk, R. Sucgang, R. Chen, B. Zupan, W. F. Loomis, A. Kuspa, and G. Shaulsky, "Conserved developmental transcriptomes in evolutionarily divergent species.," *Genome Biol.*, vol. 11, no. 3, p. R35, Jan. 2010.
- [56] F. Lavial, H. Acloque, F. Bertocchini, D. J. Macleod, S. Boast, E. Bachelard, G. Montillet, S. Thenot, H. M. Sang, C. D. Stern, J. Samarut, and B. Pain, "The Oct4 homologue *PouV* and *Nanog* regulate pluripotency in chicken embryonic stem cells.," *Development*, vol. 134, no. 19, pp. 3549–63, Oct. 2007.

- [57] M. Uchikawa, Y. Ishida, T. Takemoto, Y. Kamachi, and H. Kondoh, "Functional analysis of chicken Sox2 enhancers highlights an array of diverse regulatory elements that are conserved in mammals.," *Dev. Cell*, vol. 4, no. 4, pp. 509–19, Apr. 2003.
- [58] S. Masui, Y. Nakatake, Y. Toyooka, D. Shimosato, R. Yagi, K. Takahashi, H. Okochi, A. Okuda, R. Matoba, A. a Sharov, M. S. H. Ko, and H. Niwa, "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells.," *Nat. Cell Biol.*, vol. 9, no. 6, pp. 625–35, Jun. 2007.
- [59] K. Takahashi and S. Yamanaka, "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors.," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 663–76, Aug. 2006.
- [60] J. a Lowry and W. R. Atchley, "Molecular evolution of the GATA family of transcription factors: conservation within the DNA-binding domain.," *J. Mol. Evol.*, vol. 50, no. 2, pp. 103–15, Feb. 2000.
- [61] L. Li, E. Arman, P. Ekblom, D. Edgar, P. Murray, and P. Lonai, "Distinct GATA6- and laminin-dependent mechanisms regulate endodermal and ectodermal embryonic stem cell fates.," *Development*, vol. 131, no. 21, pp. 5277–86, Nov. 2004.
- [62] H. Niwa, J. Miyazaki, and a G. Smith, "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells.," *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 4, pp. 372–6, Apr. 2000.
- [63] M. Bialecka, T. Young, S. Chuva de Sousa Lopes, D. ten Berge, A. Sanders, F. Beck, and J. Deschamps, "Cdx2 contributes to the expansion of the early primordial germ cell population in the mouse.," *Dev. Biol.*, vol. 371, no. 2, pp. 227–34, Nov. 2012.
- [64] F. Beck, T. Erler, a Russell, and R. James, "Expression of Cdx-2 in the mouse embryo and placenta: possible role in patterning of the extra-embryonic membranes.," *Dev. Dyn.*, vol. 204, no. 3, pp. 219–27, Nov. 1995.
- [65] H. Niwa, Y. Toyooka, D. Shimosato, D. Strumpf, K. Takahashi, R. Yagi, and J. Rossant, "Interaction between Oct3/4 and Cdx2 determines trophectoderm differentiation.," *Cell*, vol. 123, no. 5, pp. 917–29, Dec. 2005.
- [66] B. Pernaute, S. Cañon, M. Crespo, B. Fernandez-Tresguerres, T. Rayon, and M. Manzanares, "Comparison of extraembryonic expression of Eomes and Cdx2 in pregastrulation chick and mouse embryo unveils regulatory changes along evolution.," *Dev. Dyn.*, vol. 239, no. 2, pp. 620–9, Feb. 2010.
- [67] J. Koubova, D. B. Menke, Q. Zhou, B. Capel, M. D. Griswold, and D. C. Page, "Retinoic acid regulates sex-specific timing of meiotic initiation in mice.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 8, pp. 2474–9, Feb. 2006.
- [68] K. O. and R. J. G. D. Richard Griffiths, Mike C. Double, "A DNA test to sex most birds.," *Mol. Ecol.*, vol. 7, pp. 1071–1075, 1998.

- [69] M. Clinton, L. Haines, B. Belloir, and D. McBride, "Sexing chick embryos: a rapid and simple protocol.," *Br. Poult. Sci.*, vol. 42, no. 1, pp. 134–8, Mar. 2001.
- [70] Tóth Gábor, "Kvantitatív Real-Time PCR." [Online]. Available: http://elte.prompt.hu/sites/default/files/tananyagok/novenyelttani_vizsgalo_modszerek/ch13.html#d0e10513. [Accessed: 07-Oct-2014].
- [71] P. Olias, I. Adam, A. Meyer, C. Scharff, and A. D. Gruber, "Reference genes for quantitative gene expression studies in multiple avian species.," *PLoS One*, vol. 9, no. 6, p. e99678, Jan. 2014.
- [72] S. R. Stone EM, Rothblum KN, Alevy MC, Kuo TM, "Complete sequence of the chicken glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 82, no. March, pp. 1628–1632, 1985.
- [73] "NCBI Gene." [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>.
- [74] "Primer3." [Online]. Available: <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>.
- [75] "NCBI Primer BLAST." [Online]. Available: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>.
- [76] S. Intarapat and C. D. Stern, "Sexually dimorphic and sex-independent left-right asymmetries in chicken embryonic gonads.," *PLoS One*, vol. 8, no. 7, p. e69893, Jan. 2013.
- [77] V. Ambros, "The functions of animal microRNAs.," *Nature*, vol. 431, no. 7006, pp. 350–5, Sep. 2004.
- [78] S. I. Lee, B. R. Lee, Y. S. Hwang, H. C. Lee, D. Rengaraj, G. Song, T. S. Park, and J. Y. Han, "MicroRNA-mediated posttranscriptional regulation is required for maintaining undifferentiated properties of blastoderm and primordial germ cells in chickens.," *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 108, no. 26, pp. 10426–31, Jun. 2011.
- [79] J. Y. Han, T. S. Park, J. N. Kim, M. a Kim, D. Lim, J. M. Lim, and H. Kim, "Gene expression profiling of chicken primordial germ cell ESTs.," *BMC Genomics*, vol. 7, p. 220, Jan. 2006.

8 Függelék

1. Egér és házityúk homológ fehérjeszekvenciák illesztése (egyezés mértéke: gyenge(kék) - nagyfokú(piros), teljes egyezés:*)

BAD AVG GOOD

*** NANOG**

Gallus : 88
Mus : 88
cons : 86

Gallus MSAHLAMP^{SYG}SVRC^GHYYW^PSPGSMDSASAAEAPAA---DLS--LTTEOKTPCHPDASPASSSSGTLIOY
Mus MSVGLPGPH--SLP-----SSEEASNSGNASSMPAVFHPENYSCLQGSATEMLCTEAASPRPSSEDLPLQG

cons ** . * . * * : * : * . * . * . : * : : * *** . * . . *

Gallus TPDSATSPTADHPSHRPTFOKVKDKGESGTRKAKSRTAFSOELOTLHORFOSOKYLSPHOIRELAAALGLT
Mus SPDSSTSPKQLSSPEADKGPEEEENKVLARKQKMRTVFSQAQLCALKDRFQKQKYL^{SL}QMQMQLSSILNLS

cons : *** : *** . . * . . : : : : * * * * * * * * : : : * * * * * : : * * : * . *

Gallus YKOVKTWFONORMKFKRCOKESOWVDKGIYLPONGFHOAAAYLDMTPTFHOGFPVVANRNLOAVTSAHO--AY
Mus YKQVKTWFONQRMKCKRWQK-NQWLKTSNGLIQKSAPVEYPSIHCSYPQGYLVN^{AS}GLSLMWGSQTWTNPT

cons ***** * * * * . * : . . * * . * . : : * : * * . * . * * . * .

Gallus SSGOTYNGNO-----GLYP-----FMAVEDEGFFGKGGTSCNTQQAMGLLSQQMNFYHG^Y-
Mus WSSQTWTNPTWNNQTWTNPTWSSQAWTAQSWNGQPWNAAPLHNF-GED-----FLQPYV

cons * . * : * * * * * * : * . * . * : * : * : * : * : * : * : *

Gallus -----S-TNVDYDSLQAEDTYSFSTSDSITOFSSSPVRHQYQAPWHTLGTONGYET-----
Mus QLQQNFSASD-----LEVNLEATRESHAHFSTPQAL-----ELFLNYSVTPG^EI

cons * : : * : * : * : * : * : *

BAD **AVG** **G00D** **SOX2**
 *
 Gallus : 98
 Mus : 98
 cons : 99

 Gallus MYNMMETELKPPAP00TSGGGTGNSNSA- - - - ANNOKNSPDRVKRPMNAFMVWSRGORRKMAOENPKMHNSE
 Mus MYNMMETELKPPGPQASGGGGGGGNATAAATGGNQKNSPDRVKRPMNAFMVWSRGORRKMAQENPKMHNSE

 cons ***** . *** . *** * . * : . *****

 Gallus ISKRLGAEWKLLSEAEKRPFIDEAKRLRALHMKHEPDYKYRPRRKTKTLMKKDKYTLPGGLLAPGNTNTMTTG
 Mus ISKRLGAEWKLLSETEKRPFIDEAKRLRALHMKHEPDYKYRPRRKTKTLMKKDKYTLPGGLLAPGGNSMASG

 cons ***** : ***** * : *

 Gallus VGVGATLGAGVNORMDSYAHMNGWTNGGYGMMOEOLGYPQHPGLNAHNAAOMOPMHRVDVSALOYNSMTSSO
 Mus VGVGAGLGAGVNQRMDSYAHMNGWSNGSYSSMQEQLGYPQHPGLNAHGAAQMOPMHRVDVSALOYNSMTSSQ

 cons ***** ***** . * . *****

 Gallus TYMNGSPTYSMSYSOOGTPGMALGSMGVSVKTESSSSPPVVTSSSHSRAPCQAGDLRDMISMYLPGAEVPEP
 Mus TYMNGSPTYSMSYSQQGTPGMALGSMGVSVKSEASSSPVVTSSSHSRAPCQAGDLRDMISMYLPGAEVPEP

 cons ***** : *

 Gallus AAP SRLHMSOHYOSAPVPGTAINGTLPLSHM
 Mus AAP SRLHMAQHYQSGPVPGTAINGTLPLSHM

 cons ***** . *****

BAD AVG GOOD

KLF4

*
Gallus : 92
Mus : 90
cons : 93

Gallus MRWVPGAAPGAISVPPPPPDAPRSPRROPPGECEMALSGTLLPSIATFAAGAAGREKAPRPAG-PGNRWRE
Mus -----MRQPPGESDMAVSDALLPSFSTFASGPAGREKTLRPAGAPTNRWRE

cons ***** . * * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . *

Gallus ELSOLKRPPPALTARPAEP---PPSDLET-----APALGPRRETEEFNELLDFOFILSNLMHOEPA
Mus ELSHMKRLPP-LPGRPYDLAATVATDLES GGAGAACSNNPALLARRETEEFNDLLDFOFILSNLTHQESV

cons *** . * * * * . * * : . * * * . * * * * * * * * * * * * * * . *

Gallus AAAAVVSPAAAPAPAASPCPAGP-----FAYPLPC-AEPGGLLYGGGGGGGGGRDGAP-AAAPFNLAD
Mus AATVT---TSASASSSSSPASSGPASAPSTCSFSYPIRAGGDPGVAASNTGGGLLYSRESAPPPTAPFNLAD

cons ** : . . . * : . . . : *

Gallus ISDVSPSGGFVAELMRPDLDPVYLPAPAALPPLGSLGKFVVKAVG-----DYSHPG-L-SPKSGPPAAAOPP
Mus INDVSPSGGFVAELLRPELDPVYIPQPPGGGLMGKFVLKASLTTPGSEYSSPSVISVSKGSPDGSHPV

cons * . *

Gallus GSEGGAPYSPLPRMCPKIKOEASPPCTLAPPHGSGPRGP-----PPOHDFSMGRLLPARTTSLGPE
Mus ---VVAPYSGGPPRMCPKIKQEAVPSTVSRSLEAHL SAGQLSNGHRPNTHDFPLGRQLPRTTPTLSPE

cons *

Gallus EMLSSRDCLPPTPGLGHPPLPLPPGYPPA--PGYPTFLPEOLPP--GTLOYOELMPPGSCLPEETKPKRGRR
Mus ELLNSRDC-----HPGLPLPPGFHPPGPNYPPFLPDQMSQVPSLHYQELMPPGSCLPEEPKPKRGRR

cons * . *

Gallus SWPRKRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHLKAHLRTHTGEKPYHCDWEGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQC
Mus SWPRKRTATHTCDYAGCGKTYTKSSHLKAHLRTHTGEKPYHCDWDGCGWKFARSDELTRHYRKHTGHRPFQC

cons *

Gallus ORCDRAFSRSDHLALHMKRHF
Mus QKCDRAFSRSDHLALHMKRHF

cons * . *

BAD AVG GOOD

GATA4

```

*
Gallus : 96
Mus : 94
cons : 96

Gallus MYOSLAMAANPGPP--SYE--GAGGFMHGAA-AASPVYVPTTRVPSMLPSLPYLPSSGSS00ASPVSSH--
Mus MYOSLAMAANHGPPEGAYEAGGPGAFMHSAGAASSPVYVPTPRVPSSVLGLSYLQGGGSAAAAGTTSGGSSG

cons ***** ** : ** * . * . * . * . : ***** . * . : . * . * . * . * . * . * .

Gallus -----IWTOPGAESAAYNPSSHPPVSPRFSFSTSTPIP-----STSSRDAAAAYSSS-L--
Mus AGPSGAGPGTQQGSPGWSQAGAEAAAYTP-----PPVSPRFSFPGTTGSLAAAAAAAAAREAA-AYGSGGGAA

cons ***** : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .

Gallus SLSANGREOYSR-GFGSSYSSPYPAYVSPERMATTW-----TSSPFDSPMLHNL0SRGTPAAARHANIEFFD
Mus GAGLAGREQYGRPGFAGSYSSPYPAYMA-DVGASWAAAAAASAGPFDSPVLHSLPGRANP--GRHPNLDMPD

cons . . ***** * * . ***** : : : : : * : : ***** . * . * . * . * . * . * . * .

Gallus DYSEGRECVNCGAMSTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGINRPLFKPORRLSASRRVGLSCANCHTTTTTL
Mus DFSEGRECVNCGAMSTPLWRRDGTGHYLCNACGLYHKMNGINRPLIKPQRRLSASRRVGLSCANCQTTTTTL

cons : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : ***** : *****

Gallus WRRNAEGEPVCNACGLYMKLHGVRPLAMRKEGIOTRKRKPKNLNKTTPAGPSSSESLTPTTSSTS-----
Mus WRRNAEGEPVCNACGLYMKLHGVRPLAMRKEGIOTRKRKPKNLNKSCTPAGPA-GETLPPSSGASSGNSSN

cons ***** : ***** : * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * . * .

Gallus SSSSATTTEEMRPIKTEPGLSSHYGHPSPISOAFVSAMSGHGSSIHPAISALKLSP0AY0SAIS0SP0ASS
Mus ATSSSSSEEMRPIKTEPGLSSHYGHSMSQTFS--TVSGHGPSIHPVLSALKLSPQGYASPTQTSQASS

cons : * : : : ***** . : * : * : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :

Gallus KODSWNSLVLAENHGDIIITA
Mus KODSWNSLVLADSHGDIITA

cons ***** : *****

```

CDX2

Gallus	:	97
Mus	:	96
cons	:	95

Gallus	MYVSYLLDKDGMYPGPVRHSGGLNLAQNFGVGAAYADYGGYHV-----NLDGAQSPGPVWAAPYAAP
Mus	MYVSYLLDKDVMYPSSVRHSGGLNLAPQNFVSPQYDPDYGGYHVAAAAAATANLDSAQSPGPSWPTAYGAP

cons ***** . *** ***** ***** ** ***** ***** ***** * . . *

Gallus	LRDDWGAYGQGAPPPAAAAAVHGLNGGSPAAAMAYS - PVD FHHHHHHHPAHHHVGPETHCSAGGMQTLGAA
Mus	LREDWNGYAPGGAA - AANAVAHGLNGGSPAAAMGYSSPAEYHAHHHPHHHPHPA - ASPSCASGLLQTLNLG

cons **.*.* * * .**.* *****.*****.** * ..* *** * *.****..* .****.

Gallus	PAAAAA SA PEPLSPGGQRRGLCEWVRKPAQAPLGSQVKTRTKDKYRVVYTDHORLELEKEFHYSRYITIRR
Mus	PPGPAATAAAEQLSPSGQRRNLC EW MRKPAQQSLGSQVKTRTKDKYRVVYTDHORLELEKEFHFSRYITIRR

[illegible]

Gallus	KAELASSLGLSERQVKIWFQNRRAKERKINKKKLQQAQRRRGA--AQPHRPSASRP---RGAP-----
Mus	KSELAATLGLSERQVKIWFQNRRAKERKIKKKQKQQKQQKQQKQQPPQPPQPSQPQPGALRSVPEPLSPVTSI

cons *:.***:.******.***: ** *.: *:.**.* *.*

Gallus -----PPAGLGPA-----PQ
Mus QGSVPGSVPGVLGPAGGVLNSTVTQ

cons * . ***** . *

BAD AVG GOOD

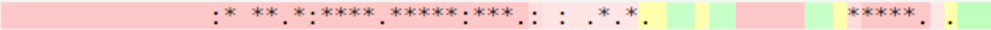
STRA8

*
Gallus : 96
Mus : 94
cons : 96

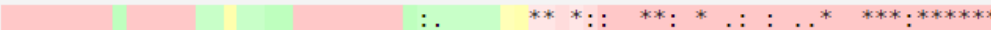
Gallus -----
Mus MATPGEGNQPSDDGAPQLAQLQKLEPRVVRRLSQARHRATLVGLFNNLRKAVYSQSDITASKWQVLNRTK

cons 

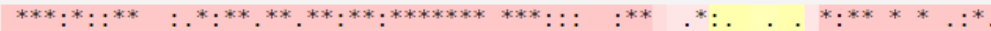
Gallus -----MKESFSLEDGNPSSLEEVRREEYVKRHFSNHSTA-----SPSEAVSES---
Mus IHIQEQUESLDKLLKLLKASFNLDGNPNSLEEVEEYARMYSENDSVFLNSFLQDSPPEWFPSEAVGPDAEE

cons 

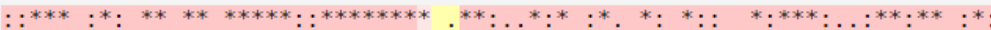
Gallus -----DSAWYLMOECEKOTMEEDGKPGFIOYPDTSPPDLVEFERYL
Mus EEEEEEEEEEEEEEEEEEGDEEEEEEENGEEEREVEEYQEEEEEEEEEEKVDLSHSSSTLLPDLMEFERYL

cons 

Gallus YFYKHTVELLREHGIVSAEEVPLPVVSTAISHLWOELSEDRRDSILOYCSORDF-HLGPTDACOEPACTDGD
Mus NFYKQTMDLLTMNSIISAHEVTLPIVSAAISHLWQTLSEEKKARLLQVWEQQHSAFADLTEACLELAGVEGS

cons 

Gallus VRDSGGNSEEASGSLVSTPEEVMFEDAFDVAAGFLETNETOGLSSOSSSFTSGISDNPEDDHRLYLQITDFL
Mus MKDSGVDSQGASCSTPEEILFEDAFDVA-SFLDKSEAHMSNISAMFATCENSENPEEKFQLYIIEFF

cons 

Gallus KSLFFANTOFCEEDLOFDYETVMLRCTETFDDEDL
Mus KSLGCVNTPLNQEPPEPDDDDAMLLKCLETFD--L

cons 

2. NCBI primer-blast eredményei

GAPDH						
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GACGTGCAGCAGGAACACTA	20	60.32	55.00	5.00	2.00
Reverse primer	CTTGGACTTTGCCAGAGAGG	20	58.18	55.00	5.00	0.00
Products on target templates						
> NM_204305.1 Gallus gallus glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), mRNA						
product length = 112						
Forward primer	1 GACGTGCAGCAGGAACACTA 20					
Template	28 47					
Reverse primer	1 CTTGGACTTTGCCAGAGAGG 20					
Template	139 120					
> XM_004936153.1 PREDICTED: Gallus gallus family with sequence similarity 184, member B (FAM184B), transcript variant X3, mRNA						
product length = 3462						
Forward primer	1 GACGTGCAGCAGGAACACTA 20					
Template	3669 A.A.....C.....T.. 3650					
Reverse primer	1 CTTGGACTTTGCCAGAGAGG 20					
Template	208TC....TGA..... 227					
> XM_004936152.1 PREDICTED: Gallus gallus family with sequence similarity 184, member B (FAM184B), transcript variant X2, mRNA						
product length = 3465						
Forward primer	1 GACGTGCAGCAGGAACACTA 20					
Template	3860 A.A.....C.....T.. 3841					
Reverse primer	1 CTTGGACTTTGCCAGAGAGG 20					
Template	396TC....TGA..... 415					
> XM_003641223.2 PREDICTED: Gallus gallus family with sequence similarity 184, member B (FAM184B), transcript variant X1, mRNA						
product length = 3465						
Forward primer	1 GACGTGCAGCAGGAACACTA 20					
Template	3674 A.A.....C.....T.. 3655					
Reverse primer	1 CTTGGACTTTGCCAGAGAGG 20					
Template	210TC....TGA..... 229					
> NM_204766.1 Gallus gallus myosin, heavy chain 15 (MYH15), mRNA						
product length = 3688						
Reverse primer	1 CTTGGACTTTGCCAGAGAGG 20					
Template	4309 ...T.T....T.....A. 4290					
Reverse primer	1 CTTGGACTTTGCCAGAGAGG 20					
Template	622 .CA.T.....C..T.. 641					

DAZL						
Primer pair 1						
	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	TTGTCTTGAAGCCTCGTTT	20	57.66	45.00	6.00	0.00
Reverse primer	ATCCTTGGCAGGTTGTTGAC	20	58.38	50.00	3.00	2.00
Products on target templates						
> NM_204218.1 Gallus gallus deleted in azoospermia-like (DAZL), mRNA						
product length = 136						
Forward primer	1 TTGTCTTGAAGCCTCGTTT 20					
Template	114 133					
Reverse primer	1 ATCCTTGGCAGGTTGTTGAC 20					
Template	249 230					

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAACCTACCATCCACCAGCA	20	59.38	55.00	2.00	0.00
Reverse primer	ATGCTACCGAAGTTGCCACA	20	59.96	50.00	4.00	2.00

Products on target templates

>[NM_204708.1](#) Gallus gallus DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 4 (DDX4), mRNA

product length = 113

Forward primer 1 GAACCTACCATCCACCAGCA 20
 Template 1530 1549

Reverse primer 1 ATGCTACCGAAGTTGCCACA 20
 Template 1642 1623

>[XM_004948038.1](#) PREDICTED: Gallus gallus NLR family member X1-like (LOC419755), transcript variant X2, mRNA

product length = 2726

Forward primer 1 GAACCTACCATCCACCAGCA 20
 Template 531 ..C.TA.....G..C.. 550

Reverse primer 1 ATGCTACCGAAGTTGCCACA 20
 Template 3256A.G.G.TT.... 3237

>[XM_003642592.2](#) PREDICTED: Gallus gallus NLR family member X1-like (LOC419755), transcript variant X1, mRNA

product length = 2726

Forward primer 1 GAACCTACCATCCACCAGCA 20
 Template 547 ..C.TA.....G..C.. 566

Reverse primer 1 ATGCTACCGAAGTTGCCACA 20
 Template 3272A.G.G.TT.... 3253

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAGGCAGAGAACACGGACAA	20	59.97	55.00	2.00	0.00
Reverse primer	TTCCCTTCACGTTGGTCTCG	20	59.97	55.00	4.00	2.00

Products on target templates

>[NM_001110178.1](#) Gallus gallus POU domain class 5 transcription factor 1 (POUV), mRNA

product length = 109

Forward primer 1 GAGGCAGAGAACACGGACAA 20
 Template 442 461

Reverse primer 1 TTCCCTTCACGTTGGTCTCG 20
 Template 550 531

>[XM_004943817.1](#) PREDICTED: Gallus gallus WAS protein homology region 2 domain containing 1 (WHDC1), transcript variant X3, mRNA

product length = 171

Forward primer 1 GAGGCAGAGAACACGGACAA 20
 Template 2895 .T.....GG.AA..... 2914

Forward primer 1 GAGGCAGAGAACACGGACAA 20
 Template 3065GTTC..G..... 3046

>[XM_413835.4](#) PREDICTED: Gallus gallus WAS protein homology region 2 domain containing 1 (WHDC1), transcript variant X2, mRNA

product length = 171

Forward primer 1 GAGGCAGAGAACACGGACAA 20
 Template 3062 .T.....GG.AA..... 3081

Forward primer 1 GAGGCAGAGAACACGGACAA 20
 Template 3232GTTC..G..... 3213

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	ATACCCCAGACTCTGCCACT	20	59.96	55.00	7.00	1.00
Reverse primer	GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC	20	60.04	60.00	2.00	0.00

Products on target templates

>[NM_001146142.1](#) Gallus gallus nanog homeobox (NANOG), mRNA

product length = 100
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 197 216
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 296 277

>[XM_004951044.1](#) PREDICTED: Gallus gallus uncharacterized LOC101752118 (LOC101752118), transcript variant X2, mRNA

product length = 485
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1006 .C...AA.A...G..... 987
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 522 .GA..T...C.....G.. 541

>[XM_004944164.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X10, mRNA

product length = 297
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1646 C.....TG.C....A... 1665
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 1942CACAAAA.....G 1923

>[XM_004944163.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X9, mRNA

product length = 297
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1190 C.....TG.C....A... 1209
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 1486CACAAAA.....G 1467

>[XM_004944161.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X7, mRNA

product length = 297
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1221 C.....TG.C....A... 1240
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 1517CACAAAA.....G 1498

>[XM_004944160.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X6, mRNA

product length = 297
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1314 C.....TG.C....A... 1333
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 1610CACAAAA.....G 1591

>[XM_004944159.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X5, mRNA

product length = 297
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1737 C.....TG.C....A... 1756
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 2033CACAAAA.....G 2014

>[XM_004944158.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X4, mRNA

product length = 294
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1353 C.....TG.C....A... 1372
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 1646CACAAAA.....G 1627

>[XM_004944157.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X3, mRNA

product length = 297
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1353 C.....TG.C....A... 1372
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 1649CACAAAA.....G 1630

>[XM_004944156.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X2, mRNA

product length = 2050
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1353 C.....TG.C....A... 1372
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 3402CACAAAA.....G 3383

product length = 297
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1353 C.....TG.C....A... 1372
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 1649CACAAAA.....G 1630

>[XM_004944155.1](#) PREDICTED: Gallus gallus serine/arginine repetitive matrix protein 1-like (LOC101750299), transcript variant X1, mRNA

product length = 297
 Forward primer 1 ATACCCCAGACTCTGCCACT 20
 Template 1353 C.....TG.C....A... 1372
 Reverse primer 1 GCCTTCCTTGTCCTCACTCTC 20
 Template 1649CACAAAA.....G 1630

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CAGAGGAGACAAAGCCCAAG	20	58.18	55.00	2.00	0.00
Reverse primer	TCAGGTGTGCCTTGAGATGA	20	58.65	50.00	3.00	1.00

Products on target templates

>[XM_004949369.1](#) PREDICTED: Gallus gallus Kruppel-like factor 4 (gut) (KLF4), transcript variant X2, mRNA

product length = 126

Forward primer 1 CAGAGGAGACAAAGCCCAAG 20
 Template 1397 1416

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 1522 1503

>[XM_001233583.3](#) PREDICTED: Gallus gallus Kruppel-like factor 4 (gut) (KLF4), transcript variant X1, mRNA

product length = 126

Forward primer 1 CAGAGGAGACAAAGCCCAAG 20
 Template 1142 1161

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 1267 1248

>[XM_417510.4](#) PREDICTED: Gallus gallus potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1 (KCNG1), transcript variant X8, mRNA

product length = 1029

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 6872G.ATC....C... 6853

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 5844AT.A.T...A... 5863

>[XM_004947261.1](#) PREDICTED: Gallus gallus potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1 (KCNG1), transcript variant X10, mRNA

product length = 1029

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 6798G.ATC....C... 6779

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 5770AT.A.T...A... 5789

>[XM_004947260.1](#) PREDICTED: Gallus gallus potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 1 (KCNG1), transcript variant X9, mRNA

product length = 1029

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 7823G.ATC....C... 7804

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 6795AT.A.T...A... 6814

>[XM_004945138.1](#) PREDICTED: Gallus gallus sorting nexin 8 (SNX8), transcript variant X10, mRNA

product length = 4573

Forward primer 1 CAGAGGAGACAAAGCCCAAG 20
 Template 4929 T...A...TA.....G. 4910

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 357 .GT.....T..A.....C 376

>[XM_415267.4](#) PREDICTED: Gallus gallus ring finger protein 10 (RNF10), mRNA

product length = 1628

Forward primer 1 CAGAGGAGACAAAGCCCAAG 20
 Template 186 .T.G....T.T.....A 205

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 1813 .A....C.C.T.A..... 1794

>[XM_003640686.2](#) PREDICTED: Gallus gallus integrin, beta 8 (ITGB8), mRNA

product length = 550

Forward primer 1 CAGAGGAGACAAAGCCCAAG 20
 Template 1330 G...CA.CG..... 1349

Reverse primer 1 TCAGGTGTGCCTTGAGATGA 20
 Template 1879 ...A...T.AG.....C 1860

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GTCACCTCGCTTCTCCTTCT	20	59.11	55.00	3.00	0.00
Reverse primer	TCCCTCCCGTTAGCAGAAAG	20	59.10	55.00	2.00	2.00

Products on target templates

>[NM_001293106.1](#) Gallus gallus GATA binding protein 4 (GATA4), mRNA

product length = 108
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 258 277
 Reverse primer 1 TCCCTCCCGTTAGCAGAAAG 20
 Template 365 346

>[XM_004935896.1](#) PREDICTED: Gallus gallus GATA binding protein 4 (GATA4), transcript variant X3, mRNA

product length = 108
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 456 475
 Reverse primer 1 TCCCTCCCGTTAGCAGAAAG 20
 Template 563 544

>[XM_004948016.1](#) PREDICTED: Gallus gallus chromosome 24 open reading frame, human C11orf63 (C24H11orf63), mRNA

product length = 537
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 1648 T...G.C.....A.C... 1667
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 2184 TA..A..T...T..... 2165

>[XM_004944500.1](#) PREDICTED: Gallus gallus PHD finger protein 7-like (LOC101747293), transcript variant X4, mRNA

product length = 1535
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 30C..GTC...G.. 49
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 1564 A.....AG.G.....G.. 1545

>[XM_004944499.1](#) PREDICTED: Gallus gallus PHD finger protein 7-like (LOC101747293), transcript variant X3, mRNA

product length = 1535
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 30C..GTC...G.. 49
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 1564 A.....AG.G.....G.. 1545

>[XM_004944498.1](#) PREDICTED: Gallus gallus PHD finger protein 7-like (LOC101747293), transcript variant X2, mRNA

product length = 1535
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 30C..GTC...G.. 49
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 1564 A.....AG.G.....G.. 1545

>[XM_004944497.1](#) PREDICTED: Gallus gallus PHD finger protein 7-like (LOC101747293), transcript variant X1, mRNA

product length = 1535
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 30C..GTC...G.. 49
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 1564 A.....AG.G.....G.. 1545

>[NM_205049.1](#) Gallus gallus ras responsive element binding protein 1 (RREB1), mRNA

product length = 1015
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 3049 C..TT...C...G..... 3068
 Forward primer 1 GTCACCTCGCTTCTCCTTCT 20
 Template 4063 T..CT..G...G..... 4044

>[XM_004939611.1](#) PREDICTED: Gallus gallus KIAA0319 (KIAA0319), transcript variant X5, mRNA

product length = 2933
 Reverse primer 1 TCCCTCCCGTTAGCAGAAAG 20
 Template 4447 ..A....TA.TT..... 4428
 Reverse primer 1 TCCCTCCCGTTAGCAGAAAG 20
 Template 1515 ...T.TG..GG..... 1534

>[XM_426033.4](#) PREDICTED: Gallus gallus KIAA0319 (KIAA0319), transcript variant X4, mRNA

product length = 2936
 Reverse primer 1 TCCCTCCCGTTAGCAGAAAG 20
 Template 4450 ..A....TA.TT..... 4431
 Reverse primer 1 TCCCTCCCGTTAGCAGAAAG 20
 Template 1515 ...T.TG..GG..... 1534

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT	20	59.89	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	ATCGTCAGCCCAACAGCATC	20	60.75	55.00	2.00	0.00

Products on target templates

>[NM_204311.1](#) Gallus gallus caudal type homeobox 2 (CDX2), mRNA

```
product length = 95
Forward primer 1 CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT 20
Template 1301 ..... 1320

Reverse primer 1 ATCGTCAGCCCAACAGCATC 20
Template 1395 ..... 1376
```

>[XM_004947513.1](#) PREDICTED: Gallus gallus uncharacterized LOC100859440 (LOC100859440), transcript variant X4, mRNA

```
product length = 2352
Forward primer 1 CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT 20
Template 1266 T.....C.. 1284

Reverse primer 1 ATCGTCAGCCCAACAGCATC 20
Template 3616 GC.T.....C.. 3597
```

>[XM_004947512.1](#) PREDICTED: Gallus gallus uncharacterized LOC100859440 (LOC100859440), transcript variant X3, mRNA

```
product length = 2355
Forward primer 1 CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT 20
Template 1176 T.....C.. 1194

Reverse primer 1 ATCGTCAGCCCAACAGCATC 20
Template 3529 GC.T.....C.. 3510
```

>[XM_004947511.1](#) PREDICTED: Gallus gallus uncharacterized LOC100859440 (LOC100859440), transcript variant X2, mRNA

```
product length = 2355
Forward primer 1 CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT 20
Template 1266 T.....C.. 1284

Reverse primer 1 ATCGTCAGCCCAACAGCATC 20
Template 3619 GC.T.....C.. 3600
```

>[XM_420083.4](#) PREDICTED: Gallus gallus ring finger protein 213 (RNF213), transcript variant X5, mRNA

```
product length = 672
Forward primer 1 CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT 20
Template 6282 T.A...G.....G.C... 6263

Reverse primer 1 ATCGTCAGCCCAACAGCATC 20
Template 5611 TCG.....CT.... 5630
```

>[XM_004946279.1](#) PREDICTED: Gallus gallus ring finger protein 213 (RNF213), transcript variant X8, mRNA

```
product length = 672
Forward primer 1 CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT 20
Template 6856 T.A...G.....G.C... 6837

Reverse primer 1 ATCGTCAGCCCAACAGCATC 20
Template 6185 TCG.....CT.... 6204
```

>[XM_004946278.1](#) PREDICTED: Gallus gallus ring finger protein 213 (RNF213), transcript variant X7, mRNA

```
product length = 672
Forward primer 1 CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT 20
Template 6637 T.A...G.....G.C... 6618

Reverse primer 1 ATCGTCAGCCCAACAGCATC 20
Template 5966 TCG.....CT.... 5985
```

>[XM_004946277.1](#) PREDICTED: Gallus gallus ring finger protein 213 (RNF213), transcript variant X6, mRNA

```
product length = 672
Forward primer 1 CCCTGGCCTTTGTTAGGTGT 20
Template 6637 T.A...G.....G.C... 6618

Reverse primer 1 ATCGTCAGCCCAACAGCATC 20
Template 5966 TCG.....CT.... 5985
```

STRA8

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAGGCACTTCAGCAATCACA	20	58.47	50.00	2.00	0.00
Reverse primer	ATCCTGGCTTTCCGTCTTCT	20	58.72	50.00	3.00	0.00

Products on target templates

>[XM_004937665.1](#) PREDICTED: Gallus gallus stimulated by retinoic acid gene 8 homolog (mouse) (STRA8), transcript variant X5, mRNA

product length = 125

Forward primer 1 GAGGCACTTCAGCAATCACA 20
Template 1713 1732

Reverse primer 1 ATCCTGGCTTTCCGTCTTCT 20
Template 1837 1818

>[XM_416179.4](#) PREDICTED: Gallus gallus stimulated by retinoic acid gene 8 homolog (mouse) (STRA8), transcript variant X3, mRNA

product length = 125

Forward primer 1 GAGGCACTTCAGCAATCACA 20
Template 248 267

Reverse primer 1 ATCCTGGCTTTCCGTCTTCT 20
Template 372 353

>[XM_004937664.1](#) PREDICTED: Gallus gallus stimulated by retinoic acid gene 8 homolog (mouse) (STRA8), transcript variant X4, mRNA

product length = 125

Forward primer 1 GAGGCACTTCAGCAATCACA 20
Template 252 271

Reverse primer 1 ATCCTGGCTTTCCGTCTTCT 20
Template 376 357

>[XM_414325.4](#) PREDICTED: Gallus gallus family with sequence similarity 120A (FAM120A), mRNA

product length = 738

Forward primer 1 GAGGCACTTCAGCAATCACA 20
Template 694 ..C.TTT.....C..... 713

Reverse primer 1 ATCCTGGCTTTCCGTCTTCT 20
Template 1431 .G.GA.T.....T.... 1412

SOX2

Primer pair 1

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GCACCAATACCATGACGACC	20	58.99	55.00	4.00	0.00
Reverse primer	CATCATCCCATAGCCTCCGT	20	59.02	55.00	3.00	0.00

Products on target templates

>[NM_205188.1](#) Gallus gallus SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2), mRNA

product length = 119

Forward primer 1 GCACCAATACCATGACGACC 20
Template 656 675

Reverse primer 1 CATCATCCCATAGCCTCCGT 20
Template 774 755