

MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

Szent István Campus

Genetika és Biotechnológia Intézet

**HÁZITYÚK EMBRIÓK IVARSZERVÉNEK FEJLŐDÉSÉBEN
SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK FELTÉRKÉPEZÉSE**

**Mapping of the gene expression under the embryonic gonadal development
in chicken**

ORSZÁGOS TUDOMÁNYOS DIÁKKÖRI KONFERENCIA

Kaposvár

2023. április 4–6.

Készítette: Tóth Arnold
Mezőgazdasági biotechnológus MSc
Nappali tagozat
Szent István Campus

Témavezető: Tóth Roland Imre
Tudományos segédmunkatárs
MATE SzIC

**Gödöllő
2021**

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés.....	4
1.1. Célkitűzések.....	4
2. Szakirodalmi áttekintés	6
2.1. Embriófejlődés.....	6
2.1.1. Őscsírasejtek.....	8
2.1.2. PGC vándorlás jellemzése.....	8
2.2. Ivarszerv fejlődés.....	9
2.2.1. Gonádok szöveti differenciálódásának kezdete	10
2.3. Ivardetermináció és szexuális differenciálódás	11
2.4. Gének.....	12
2.4.1. PITX2	12
2.4.2. DMRT1	13
2.4.3. CYP19A1 – Aromatáz	13
2.4.3.1. ER α	14
2.4.4. SOX9.....	14
2.4.5. GAPDH	14
2.5. Ivarszerv kimérák és univerzális recipiensek szerepe a génmegőrzésben.....	15
3. A vizsgálatok módszerei	16
3.1. Vizsgálat helyszíne, állomány	16
3.2. Mintavétel.....	16
3.3. DNS izolálás, ivarmeghatározás.....	16
3.3.1. DNS izolálás.....	16
3.3.2. Ivarmeghatározás.....	17
3.4. RNS izolálás	17
3.5. cDNS írás.....	18
3.6. Primer tervezés és kezelés	19

3.7.	qPCR.....	20
3.8.	Adatelemzés.....	22
4.	Eredmények és értékelésük	23
4.1.	Ivar meghatározás.....	23
4.2.	Primerek tesztelése	23
4.3.	qPCR analízis eredmények.....	24
5.	Összefoglalás.....	29
6.	Köszönetnyilvánítás	30
7.	Irodalomjegyzék.....	31
8.	Mellékletek.....	40

1. Bevezetés

Madarak esetében a heterogamétás ivar a nőivar (ZW), míg a hímeknél két ugyanolyan „Z” ivari kromoszómát találunk (ZZ), pont ellentétesen, mint az emlősöknél, ahol az X – Y kromoszóma rendszernél a hímek a heterogamétásak. Ez komoly kihívás elé állítja a génmegőrzést végző kutatókat, mert amíg az emlősöknél egy egyszerű sperma mélyhűtéssel megoldható a teljes genetikai anyag hosszútávú tárolása, addig madarak esetében a tojás mélyhűtése a magas szikanyag tartalom miatt nem kivitelezhető. Hatékonynak bizonyult az ősvarsejteken (PGC-k) alapuló génmegőrzés, melyek embrionális vérből könnyen izolálhatók. Az izolált vérből homogén PG sejttenyészetek alapíthatók génmegőrzés céljából. Ezen PG sejtek visszajuttathatók recipiens fajta embriójának szervezetébe, ahol is felismerik azokat a szignálokat, melyek alapján a fejlődő ivarszerv telepeknél kilépnek a vérkeringésből. A bejuttatott PGC-k integrációjával ivarszervi kimérák állíthatók elő, mellyel sikeresen reprodukálható az eredeti donor fajta.

Az ősvarsejtek vándorlása az embrionális ivarszerv kezdeményekben ér véget és összefügg azok fejlődésével. Kulcsfontosságú feladat feltérképezni, az ebben a folyamatban résztvevő géneket és megérteni azok működését az embrió fejlődése során, különös tekintettel a madarakra jellemző aszimmetrikus fejlődésű gonádokra. Néhány ragadozófaj kivételével a tojók petefészke csak a bal oldalon fejlődik funkcionális ivarszervvé, miközben a jobb oldali elcsökevényesedik. Ezzel ellentétben a herék mind a két oldalon kifejlődnek, de az integrálódott ősvarsejtek számán felül, számos ivarhoz köthető gén expressziós mintázatában aszimmetria mutatkozik a két oldal között.

Vizsgálataink során az ivarszerv fejlődésében résztvevő gének expressziós profilját határoztuk meg 8-10-12 napos erdélyi fekete kopasznnyakú tyúk embriókban. Olyan géneket választottunk ki, melyeknek expressziója a két oldali ivarszervben, valamint a két ivarban az embrionális kor előrehaladtával változik.

1.1.Célkitűzések

Vizsgálataink célja, hogy őshonos magyar tyúkfajták esetében univerzális recipiens fajtaként alkalmazni kívánt tyúkok embriójának az ivarszervfejlődését jobban megismerhessük. Ebből adódóan a jövőben már egy jól ismert recipiens embriót használhatunk a génmegőrzés számára.

Dolgozatom célja feltérképezni és összehasonlítani az ivarszervfejlődésben szerepet játszó gének expressziójának változását az embrionális fejlődés során. Összehasonlítani a génexpressziót hím és nőivarú gonádokban, a bal és jobb oldali ivarszervekben 8, 10, 12 napos korban. A kapott eredmények alapján következtetéseket vonhatnának le a további vizsgálatokhoz.

2. Szakirodalmi áttekintés

2.1. Embriófejlődés

A korai embriófejlődés, a megtermékenyüléssel létrejött zigóta barázdálódásával kezdődik. Ezt a folyamatot gasztrulációnak nevezzük, a petevezetőben zajlik le és a tojásrakás pillanatáig tart. Az ovuláció után egy órával a fejlődő embrió 16 sejt állapotba jut, majd az uterusban való további, 4 órán át tartó fejlődés során 256 sejt állapotba kerül. Ennek a folyamatnak során a csíralemez két sejtrétege jön létre, az ectoderma, amely a később kialakuló különböző bőr, szarurétegek, szem, száj és testüregek nyálkahártyájának alapja; valamint endoderma, melyből a mirigyes szervek, az emésztőszervek és a légzőszervek fejlődnek majd (Bogenfurst et al. 2000).

A tojásrakás pillanatában, a tojás sárgája tetején már több ezer sejt figyelhető meg, melyet csírákorongnak nevezünk és gastrula stádiumban van (Bogenfurst et al. 2000; N. Theodosiou 2006). Innentől kezdve az embriófejlődés és maguk a tojások is a keltetés vagy inkubáció fázisában vannak. A fejlődés rendkívül gyors ütemben halad, a harmadik nap végére már a legtöbb szervkezdemény kialakul, eleinte egy-egy fokozat béli váltás pár óránként bekövetkezik (Bogenfurst et al. 2000).

Hamburger és Hamilton (1992) leírtak egy, a csirkék teljes inkubációs idejét (21nap) átfogó fázisok sorozatát, ami a külső tulajdonságok megfigyelésén alapszik. Meghatároztak 3 fő fázist: korai, középső és késői stádiumot. A szervek és szervrendszerek kialakulása az első két fő stádium alatt történik, ezt követi a szervek növekedése és a rendszerek érése a késői stádiumban. A csirkék embrionális fejlődési fázisainak ismerete mélyebb megértést nyújt a fejlődési folyamatokról és hogy az embrionális fejlődés, valamint a keltetés folyamata hogyan befolyásolható, manipulálható, mind külső és belső faktorok segítségével (W. L. Reed and Clark 2011).

A klasszikus Hamburger Hamilton (HH) nevezéktan alkalmazásával a tyúk embriófejlődés 45 stádiumra bontható (Hamburger and Hamilton 1992). Az 1-től 6-ig tartó kezdeti fázisok a primitív csík fejlődése alapján karakterizálják az embriót. A középső, 7-től 14-ig tartó fázisok főleg a szomiták száma és a kapcsolódó tulajdonságok által vannak definiálva. A késői fejlődési stádiumok 15-től 45-ig tartanak, meghatározásuk számos morfológiai tulajdonságon, valamint egy csoportba foglalt, standard mérhető tulajdonság sorozatán alapul. A végtagbimbók és a zsigeri szervek méreteinek változásait a 18 és 40. fázis közötti stádiumok határozzák meg. Az embrionális fejlődés vége felé az embrió már nem esik át lényeges morfológiai változásokon,

főleg csak méretnövekedés történik. Ezért van szükség objektíven mérhető tulajdonságokra, mint a csőr hossza (Tong et al. 2013).

A fejlődés első napjaiban bekövetkező események sorozatai határozzák meg a test tengelyeit és a különböző szervek kialakulási helyét. Az élet első látható jele a primitív csík kialakulása, ami egy vékony, átlátszatlan sejtsáv, amely a csírákorong szélétől nyúlik ki. Ezt nevezzük fej – farok tengelynek (Bogenfurst et al. 2000; N. A. Theodosiou 2006). Megjelenik a harmadik, középső alapréteg, a mezoderma. Ebből a rétegből származtatható a csontváz, az izomzat, a vér, a szaporító és a kiválasztó szervrendszer (Bogenfurst et al. 2000).

A szív és érrendszer az egyik első, amely kifejlődik. Ennek fejlődése a második nap legelején, 25h körül indul meg. Az első nap végén már megjelennek a primitív csík végénél azok a vérszigetek, amelyek a szik felületén előre terjeszkedve létrehozzák a véredényhálózatot, szélén gyűrű alakú üregrendszerrel határolva. Az embriófejlődés folyamán a vérrendszernek két része alakul ki, az egyik az embrióban, a másik, pedig a szikre kiterjedve, melyet extraembrionális vérkeringésnek nevezünk. Ez a későbbiekben fehérje, táplálékszállító rendszerként funkcionál majd tovább. Az embrióban a fej és a szív kezd formálódni, megjelenik a bal és a jobb aszimmetria (Mellor and Diesch 2007; Mellor, Diesch, and Johnson 2010).

Az inkubáció harmadik – negyedik napján az embrió főbb részei felismerhetővé válnak pl.: a fej, törzs és a farok. Ezt követően az embrió többi része, mint a végtagbimbók, a szemek, a tüdő, továbbá a harmadik nap végére már látható a hallógödör is (Mellor and Diesch 2007; Mellor, Diesch, and Johnson 2010).

A szaporítószervek kialakulása, az ivari differenciálódás és a mozgás kezdete az ötödik és a hatodik nap közé esik (Mellor and Diesch 2007; Mellor, Diesch, and Johnson 2010; N. A. Theodosiou 2006)

A hatodik naptól a végtagok részei már jól kivehetők és az embrió a kilencedik naptól már hasonlít a tojásból kibújó csibére. A szív a testbe záródik, ettől kezdve az embrió a hasi befűződésen keresztül, a vérkeringés útján tartja a kapcsolatot a szik állománnyal (Bogenfurst et al. 2000).

A 10. naptól a csontozat mineralizálódik. A tollkezdemények a 8. naptól már láthatók, de a toll tokok csak a 13. napon jelennek meg és a 16. napon már felismerhetők a szaruképződmények is teljesen kifejlődnek (a csőr, karmok, lábpikkelyek) (Bogenfurst et al. 2000).

2.1.1. Öscsírasejtek

Az ősiarsejtek (PGCk) már a tojásrakás pillanatában, megtalálhatók az extra embrionális régióban, az *area pellucida* centrális régiójában (Intarapat 2011).

Régóta ismert a tény, hogy a bal oldali ivarszervben 70%-al több PGC található, mint a jobb oldalon (Witschi 1935). Úgy tartották, hogy a PGC-k gonádok felé tartó vándorlását, a gonádok által termelt faktorok irányíthatják, melyet a sejtek kemotaxis segítségével ismernek fel (Kuwana and Rogulska 1999). Ezen faktorok termelése a bal oldalon magasabb, ami feltételezhetően a PGC-k mitotikus aktivitását is indukálja (Swartz and Domm 1972).

Madarokban a PGC vándorlást irányító molekuláris mechanizmusok továbbra sem tisztázottak. Az említett faktorok szerepet játszhatnak ebben a folyamatban. Ezek lehetnek szteroidok, glykoprotein, Transforming growth factor-beta (TGF- β), valamint említésre méltó lehet az SDF-1 α , SDF-1/CXCR4, Steel factor/c-Ki és a Dnd (Deadend) gén, melyek mind valamilyen szerepet játszhatnak a csírasejtek irányításában (Intarapat and Stern 2014).

2.1.2. PGC vándorlás jellemzése

Az ősiarsejtek a blasztodermából az epiblasztba, majd a hipoblasztba, végül a germinális félhold területére vándorolnak. A germinális félhold területén már 4-500 PG sejt található. Innen a PGC-k a vérerekben vándorolnak az ivarlécek irányába (Intarapat 2011).

A germinális félholdból a dorsalis aortán keresztül, kilépnek az extra-embrionális vérérhálózatba. Ez a PGC vándorlás eltér az emlős PGC-k vándorlásától, ahol a sejtek a szövetek közötti térben vándorolnak a fejlődő ivarszervekig. Ebben a kezdeti szakaszban a vándorlás passzívnak tekinthető, az endoteliális sejtekkel együtt vándorolnak, cPGC-nek (circulating-PGC) nevezik őket (Clawson and Domm 1969). A csíraléc közelében egyre több sejt jelenik meg. A vérérhálózatból kilépő cPGC-k beépülnek a mezenchimális sejtekbe és együtt vándorolnak a dorsalis mesenteriumba, a mesonephros szintjén. Amőboid mozgással jutnak be a hámsejtek közé, ahol alakjuk kissé megváltozik, kerekesebb formát vesznek fel (Clawson and Domm 1969; Eyal-Giladi, Ginsburg, and Farbarov 1981). Ebben a szakaszban tPGC -nek (tissue-PGC) nevezzük őket és pseudopodiát mutatnak, ami annak a jele, hogy a sejtek amőboid mozgást végeztek (Clawson and Domm 1969).

Az aktív migráció akkor ér véget, amikor elérik az ivarszerv kezdeményeket és megtörténik a beépülésük a gonádokba. Ez után gPGC-nek (gonadal-PGC) nevezzük őket (Clawson and Domm 1969).

Az ivarszervekbe történő bejutásban nagyon fontos a gonádok szintjén történő vaszkularizáció, vagyis az új erek kialakulásának és növekedésének folyamata (Pérez-Aparicio et al. 1998).

2.2.Ivarszerv fejlődés

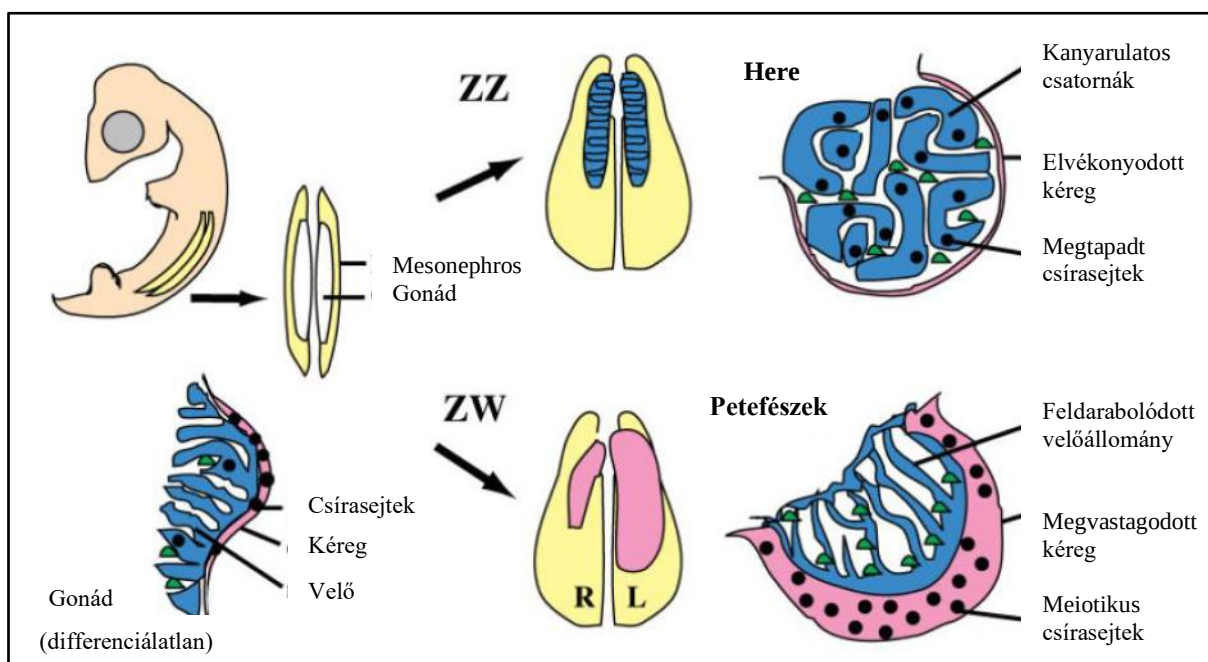
Az emlősök szimmetrikusan fejlődő ivarszerveivel ellentétben, a madarak esetében csak a hímek rendelkeznek bilaterális gonádokkal, a legtöbb fajta esetében a női nemi készülék aszimmetrikusan fejlődik és csak a bal oldalon fog funkcionálni. Ezt a gonád aszimmetriát számos madárfaj esetében leírták: kacsánál (V. Limborgh and Fassen 1960; J. van Limborgh 1970), pulykánál (Burke 1973), tyúknál (J. Van Limborgh 1954; V. Limborgh 1960; Calhim and Birkhead 2009; Hocking 1992).

A gonadogenezis kezdetén, a gonádok között nincs kimutatható morfológiai különbség, így az ivarok még nem különböztethetők meg egymástól. Indifferenciált szakasznak nevezzük fejlődés ezen első felét, ami az embrionális fejlődés 6. napjáig tart (McCarrey and Abbott 1979; Clinton 1998; Clinton and Haines 2001).

A gonádok szöveti szerkezetét tekintve, az emlősökhöz hasonlóan a tyúk embrionális gonádok is két rétegből állnak, a külső cortex, azaz kéregből és a belső medulláris, azaz velőállományból (Maraud, Vergnaud, and Rashedi 1987; Clinton 1998; Clinton and Haines 2001; Craig A. Smith and Sinclair 2004).

A gonádok differenciálódását az ivari kromoszómákon található gének irányítják (Stevens 1997; Craig A. Smith and Sinclair 2001; 2004; C. A. Smith et al. 2007; Craig A. Smith 2010; Chue and Smith 2011; Ayers, Smith, and Lambeth 2013). Emellett kiemelendő két független mechanizmus, a sejtek differenciálódását szabályozó genetikai kaszkádot és az ivardeterminációs mechanizmust, ami az ivarlécek differenciálódását szabályozza (Clinton 1998; Clinton and Haines 2001; Craig A. Smith and Sinclair 2001; 2004; C. A. Smith et al. 2007; Craig A. Smith 2010; Chue and Smith 2011; Ayers, Smith, and Lambeth 2013). A gonadogenezis a hímek esetében medulláris, míg nőivarban cortikális fejlődésű (Romanoff , 1960; McCarrey and Abbott 1979). Hímeknél a medulláris régió tartalmazza a spermatároló

tubulusokat, melyekben beágyazódva találhatók meg a PG sejtek. Nőtényeknél a külső réteg fejlődött ki erőteljesebben, ahova a PG sejtek rátapadtak.



1. kép. Az embrionális ivarszervek szöveti fejlődése
Forrás: (Craig A. Smith and Sinclair 2004)

2.2.1. Gonádok szöveti differenciálódásának kezdete

Az indifferenciált fejlődési fázis az inkubáció 3,5-4. napján indul meg és a 6,5. napig tart. Először a csíra-kordonok (kötegek) alakulnak ki, aminek a felülete megvastagszik és kéreg alakul ki rajta (Péczely 2013).

A keltetés 6,5. napja a fázishatár az differenciálatlan és a differenciált fejlődési állapot között. Ettől a ponttól az ivarok szövettanilag megkülönböztethetők egymástól (Romanoff , 1960). A sejtosztódás a herék fejlődése esetében gyorsabb a velőben, mint a kéregállományban. A velőben az elsődleges csírahám kordonok kanyarultatos, seminiferus rendszere másodlagos, majd harmadlagos ágakat fejleszt, ez a velő vastagodásához vezet. Eközben a kéregállomány vékonyodik, mert a csírahám corticalis része elsorvad, egyrétegű, vékony hámréteggé módosul (Romanoff , 1960; Romanoff 1961; Stahl and Carlon 1973; McCarrey and Abbott 1979).

A petefészek esetében ez pont fordítva zajlik le, a sejtosztódás a kéregállományban intenzívebb, a felületen lévő kordonok egyre vastagodó, kompaktálódó réteget hoznak létre, ami a kéreg vastagodását jelenti és a velő részvékonyodása figyelhető meg, az itt található kötegek feldarabolódása miatt (Romanoff , 1960; McCarrey and Abbott 1979; Clinton 1998).

Amíg a hím madarak esetében a jobb- és baloldali gonádok fejlődése közel azonosan zajlik le, addig nőivarban erős aszimmetria figyelhető meg. Csak a bal oldali gonád fog érett petefészekké fejlődni, a jobb oldali petefészek kezdemény növekedése lelassul, a kéreg degenerálódik, a velői kötegek feldarabolódnak. Ennek hatására a jobb oldali ivarszerv csökevényes formát vesz fel, vagy teljesen elsorvadhat (Carlson and Stahl 1985; Romanoff, 1960; Craig A. Smith and Sinclair 2001; 2004; Vaillant et al. 2001).

2.3. Ivardetermináció és szexuális differenciálódás

Ivardetermináció akkor következik be, amikor a két haploid ivarsejt egyesül és létrejön a diploid zigóta. Madarak esetében a hímeknél ZZ kromoszómák, míg nőtény egyedeknél ZW kromoszómák figyelhető meg. Az ivardeterminációt és differenciációt madarak esetében az ivari kromoszómákon található gének szabályozzák. Ezt követően megindulnak a szex determináns gének expressziói, melyek gén kaszkád jelenséget okoznak, aminek végkifejlete az ivarak szövetileg elkülönült kifejlődése (Clinton and Haines 2001; Ellegren 2001; Craig A. Smith and Sinclair 2001; 2004; Péczely 2013).

Az ivardeterminációs mechanizmust tekintve is eltérnek a madarak az emlősöktől. Nem ismert olyan korán expresszázó, rövid ideig aktív gén, mint az emlős Y kromoszómán található *SRY*, ami egy olyan gén-kaszkád rendszert aktivál a heterozigóta ivar egyedeiben, ami prioritást biztosít a szexuális differenciálódásban. Továbbá feltehetően madarakban nem létezik az a mechanizmus, ami a homogamétás ivar egyik kromoszómáját inaktíválja, mint emlősökben az X kromoszóma inaktivációért felelős *X-IST* gén. Ellenben nem jelentkezik a Z-gének megduplázódott expressziója, ami dóziskompensációs mechanizmusra utal (Mank and Ellegren 2009).

Madarakban jelenleg két iniciátor szex determináns funkciójú gént ismerünk. Az egyik a Z-kromoszómához kapcsolt *DMRT1* (*Dublesex and Mab-3 Related Transcription factor 1*), amely egy általános ivar determináns faktor. Hasonlóságot mutat egyes halak *DMY* génjével, de nincs rokonságban az emlős *SRY*-al (C. A. Smith 2007; Cutting et al. 2012).

A másik a W-kromoszómához kötött *HINTW* (*Histidine triad nucleotide binding protein, W-linked*), petefészek determináns gén, expressziója a fejlődés 4,5. napjától kimutatható (Craig A. Smith, Roeszler, and Sinclair 2009; Pace and Brenner 2003; Moriyama et al. 2006).

2.4.Gének

Az indifferens fázisban több specifikus gén expressziója is jelentkezik, melyek a szöveti proliferáció megindításában és szabályozásában játszanak szerepet (Yoshioka et al. 2005).

Számos, a fejlődésben szerepet játszó gén aszimmetrikusan expresszál különböző időpontokban, mindkét ivar esetében. Korai stádiumban, hímivarban főleg a *DMRT1* és a *SOX9* (Kent et al. 1996; Koba et al. 2008; Silva et al. 1996; Oréal et al. 2002; Raymond et al. 1999; Craig A. Smith, Katz, and Sinclair 2003; Craig A. Smith et al. 2009; Takada et al. 2006; Yamamoto et al. 2003; Yang et al. 2013) expresszál, míg nőivarban *HINTW*, *FET1*, *FOXL2* és az aromataz van jelen (Andrews, Smith, and Sinclair 1997; Hudson, Smith, and Sinclair 2005; Nakabayashi et al. 1998; K. J. Reed and Sinclair 2002; Craig A. Smith, Roeszler, and Sinclair 2009; C. A. Smith 2007; Yamamoto et al. 2003).

Az embrionális gonádban számos faktor szintén aszimmetrikusan expresszál, köztük pl. *PITX2*, ami a bal oldalon expresszál, a gonád fejlődésében és morphogenezisben van szerepe (Guioli and Lovell-Badge 2007; Ishimaru et al. 2008; Rodríguez-León et al. 2008). A *Bmp7* signaling molekula, mely az indifferenciált szakaszban bilaterálisan expresszál, majd az ivari differenciálódás után a bal petefészek mezenchimális sejtjeiben található (Hoshino et al. 2005; Carré et al. 2011). Az *ERα* mely mindkét ivar esetében csak a bal coretexben expresszál (Andrews, Smith, and Sinclair 1997; Nakabayashi et al. 1998; Guioli and Lovell-Badge 2007), valamint mátrix és adhéziós molekulák, mint a fibronectin és az N-cadherin, illetve *DMRT1* és *LHX9* transzkripció faktorok a bal oldalon expresszálnak mindkét ivar esetében (Guioli and Lovell-Badge 2007).

A csírasejteken (*CVH*-t expresszáló sejtek) kívül a szomatikus sejtek is aszimmetrikus expressziót mutatnak (Intarapat and Stern 2013b). Ez az embrionális gonádok sztróma sejtjeinek aszimmetrikus expresszióját jelzi, hasonlóképpen a stádium specifikus *SSEA1*-hez, mely erősen expresszál a tyúk embrionális- és csírasejteken is (Pain et al. 1996; Van De Lavoie et al. 2006; Choi et al. 2010; Macdonald et al. 2010; Intarapat and Stern 2013a).

2.4.1. PITX2

Az aszimmetrikus fejlődés és a jobb oldali petefészek degenerálódása mögött álló molekuláris mechanizmus nagyban függ a *PITX2*-től (Guioli and Lovell-Badge 2007; Ishimaru et al. 2008; Rodríguez-León et al. 2008). Kísérletesen bizonyították, hogy *PITX2*

expressziójának megzavarása a jobb oldali gonádban, nem csak szimmetrikus fejlődést okoz, de a jobb oldali petefészek degenerálódását is megakadályozza (Guioli and Lovell-Badge 2007).

2.4.2. DMRT1

A *DMRT1* valamennyi gerincesben, emlősökben ismert, emberben károsodása szex reverziót okoz. Expressziója a csirke embrió csíralécében és a Müller csőben a 3,5 – 4,5. napon indul meg, az ivari differenciálódás előtt (C. A. Smith 2007; Cutting et al. 2012). Több transzkripciós faktort képes indukálni, melyek expressziós erősségei eltérnek az ivarok között, de összességében ivarérett korra *DMRT1* expresszió már csak a herében mutatható ki (Zhao et al. 2007).

2.4.3. CYP19A1 – Aromatáz

A *CYP19A1* gén a cytochrom P450 család, 19 alcsalád tagja, 1. polipeptid gén, a szteroid bioszintézis monooxygenáz eleme. A *CYP19A1*, azaz az aromatáz gén aktivátora a *FOXL2*. A petefészek kezdeményben a keltetés 5. napján ez a fehérje váltja ki a *CYP19A1* gén expresszióját (Craig A. Smith, Andrews, and Sinclair 1997; Nakabayashi et al. 1998; Craig A. Smith et al. 2005).

A *CYP19A1* gén az ösztrogén-szintézis limitáló enzime, melynek működése madarakban is meghatározó szerepű, a petefészek fejlődés szabályozásában. Az ösztrogén a csíralécben kialakult ER α -hoz (alfa-ösztrogén receptor) kötődve fejt ki proliferatív hatását. Indifferens szakaszban mind a két ivarban jelen van, ami madár embrióban az ösztrogén korai szabályzó szerepére utal. A 3,5. napon mutatható ki először nőivarban, majd a 4,5. naptól már mindkét ivar gonádjaiban megfigyelhető. Kísérleti úton gátolták az aromatáz enzim működését a keltetés 3,5. napján, ami a genetikailag nőstény embriók bal oldali gonádkezdemény petefészekké történő alakulását megakadályozta, valamint a jobb oldali gonád pedig herévé fejlődött. Ez az ösztrogén ivari differenciálódásban játszott szerepére utal (Craig A. Smith and Sinclair 2004; Craig A. Smith, Andrews, and Sinclair 1997).

2.4.3.1. ER α

Az ER α mennyisége hímekben a 6.5 napot követően lecsökken, nőstényekben pedig jelentősen fokozódik a petefészek kezdemény kéregállományában (Craig A. Smith and Sinclair 2004; Craig A. Smith, Andrews, and Sinclair 1997). Míg az aromatáz gén expressziója főleg női ivarban specifikus, addig az ösztrogén receptor specifikusa a bal oldalra jellemző. Mindkét gén jelentős szereppel bír a szexdeterminációs mechanizmus során (Nakabayashi et al. 1998). Kiterjedt és kritikus fontosságú szerepet lát el a gonádok és a szaporító szervrendszer egészének kifejlődésében (Andrews, Smith, and Sinclair 1997).

2.4.4. SOX9

Sex-determining region-y gén, expresszáta az AMH gén fő regulátora (Péczy 2013).

A SOX9 a here Sertoli sejtjeinek differenciálódását és a seminiferus kordonok és csatornácskák aktivátora. Emlősök esetében a SOX9 expressziót az SRY gén fehérjéje váltja ki. Szexdeterminációs kaskád mechanizmus második tagja, transzkripciós faktora pedig a harmadik tag, az AMH aktivátora. Madarak esetében erre nincs lehetőség, mert a SOX9 később expresszál, mint az AMH, de idejét tekintve, funkciója szorosan kötődik a here szerkezet és a Sertoli sejtek kialakulásához (Oréal et al. 2002; Takada et al. 2006; Oreal et al. 1998).

2.4.5. GAPDH

Bár a quantitative PCR vizsgálatok standard eljárásnak tekinthetők gén expressziós vizsgálatok során, mindenképpen szükséges a mérések egységesítése, a technológia magas érzékenysége okán, az eltérések minimalizálása érdekében (Bustin 2000). Alkalmazható többek között, a minták egységes mennyiségének felvitele, az azonos izolálási protokollok használata (Huggett et al. 2005), de a legelterjedtebb és legmegbízhatóbb eljárás egy belső kontroll gén használata az amplifikáció során (Radonić et al. 2004).

A referenciagénnek általában az adott élőlény legtöbb sejtjében, minden korban azonos mértékben expresszál. Funkciójuk állandó és jól jellemzett.

A GAPDH membránfehérjeként szerepet játszik az endocitózisban, a citoplazmában kifejeződve részt vesz a génexpresszió transzlációs szabályozásában. A sejtmagban pedig a tRNS exportban, a DNS replikáció során (Sirover 1997).

Az egyik legstabilabb expresszióval rendelkező és leggyakrabban alkalmazott háztartási gén a *GAPDH*, (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz), ami alkalmassá teszi, gén expressziós mintázatok normalizálására tyúk esetében. Azon kívül szintén széles körben alkalmazzák még a β -actin -t (*ACTB*) és a *TBP*-t (TATA box kötő fehérje) (Borowska et al. 2016).

2.5. Ivarszerv kimérák és univerzális recipiensek szerepe a génmegőrzésben

Az embrionális eredetű őssejtek madarak esetén visszainjektálhatók és képesek beépülni a gazdaembrió szervezetébe. Az így létrejövő utódok kiméráknak tekinthetők, mert a szervezetükben két eltérő genotípusú sejtvonal található meg, a szétszórva a különféle szövetekben, szervekben (Petitte et al. 1990; Thoraval et al. 1995; Munro 1977; Nilsson and Cloud 1992). Amennyiben a donor sejtek beépülnek az ivarszervekben és ott szaporodóképes ivarsejteket képesek létrehozni, akkor ivari kimérákról beszélhetünk. A PGC mélyhűtésen és visszaültetésen alapuló génmegőrzési technika célja olyan ivarszerv kimérák létrehozása, melyek csak a donor egyedtől származó genotípust örökítik tovább, már az első generációs visszakeresztezés során is (Gócza, Lázár, and Patakiné Várkonyi 2017)

Alternatívaként szolgálhat steril interspecifikus hibrideket alkalmazása. Hibrid, steril recipiens embriókba történő PGC injektálással létrehozott utód embriókban a donor eredetű ősvarsejtek sikeresen vándoroltak el a steril ivarszervekbe. Ez alternatív megoldást jelenthet recipiensek keresésénél (Molnár et al. 2019).

3. A vizsgálatok módszerei

3.1. Vizsgálat helyszíne, állomány

Dolgozatomban erdélyi fekete kopasznnyakú házityúk faját használtunk modellállatnak. Az embrionális vizsgálatokhoz a tojásokat a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ gödöllői telephelyű Haszonállat Génmegőrzési Intézetből (NBGK-HGI) szereztük be. A vizsgálatba bevont állatok *ex vivo* körülmények között voltak tartva.

A kísérleteket a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetemen, a Genetika és Biotechnológia Intézet, Alkalmazott Embriológia és Össejt Biológia Csoport laboratóriumaiban végeztük.

3.2. Mintavétel

A tojásokat PL Machine keltetőgépben inkubáltuk az embrionális fejlődés megfelelő napjáig. A vizsgálatban az embrionális fejlődés 5. napjától a 15. napjáig elemeztük a mintákat. Az embriók vizsgálata Leica sztereo mikroszkóp alatt történt. Mikroszkóp alatt, petri csészében, streil 1X PBS pufferben távolítottam el az embrió ivarszervét, valamint a közvetlen felette elhelyezkedő mesonephros-t (elővese). A kioperált szerveket méretüktől függően 300-500 µL TRI Reagent-be helyeztem, majd inkubáltam 10 percet szobahőmérsékleten, végül -70°C -on tároltam RNS izolálásig. Minden embrióból begyűjtöttem szövetdarabot a későbbi ivarmeghatározás céljából, melyeket -20 °C -on tároltam. A vizsgálati időszakban (E5-E15), fejlődési naponként, az embrióktól 5 mintát vettem: 1 szövetmintát, valamint 2 mesonephros (bal-jobb), illetve 2 ivarszerv (bal-jobb) mintát. Fejlődési naponként minimum 4 egyedről, 2 hímivarú és 2 nőivarú embrióból történt meg a mintavételezés. Összesen 62 db embrióból izoláltam mintákat.

A mintavételhez steril PBS-t, 70%-os alkoholt, steril desztillált vizet, precíziós csipeszeket, ollót és petricsészéket használtam.

3.3. DNS izolálás, ivarmeghatározás

3.3.1. DNS izolálás

A szövetmintákhoz 100 µl proteináz K + lízis puffer oldatot adtam és vortexelés után 55 °C -on három órán keresztül inkubáltam, 400 rpm rázatással. A szöveti feltárás után a mintákat

vortexeltem, 1 percig centrifugáltam, majd 10 percig 100 °C -on inaktiváltam a proteináz K-t végül újból 5 percig használtam a centrifugát.

A műveletek során a centrifugát minden esetben 4 °C-ra hűtve, 13000 rpm fordulatszámon használtam.

A DNS tisztításhoz, mintánként 50 µl fenolt majd 50 µl kloroformot adtam hozzá, fülke alatt. Óvatos összerázás után 10 percig centrifugáltam. A felülúszót új, feliratozott csőbe pipettáztam át, majd azonos mennyiségű -20 °C-on tartott izopropanolt adtam hozzá, amivel a nukleinsav kicsapódását értem el. 5 perc centrifugálást követően láthatóvá vált a DNS pellet. A felülúszó alapos eltávolítása után a pelletet 500 µl 75%-os EtOH -val mostam, majd 5 percig centrifugáltam. A felülúszót újból eltávolítva, a mintákat a steril fülke levegőjén szárítottam, amíg a maradék alkohol el nem illant a csőből. A pelleteket 20-40 µL nukleáz-mentes (NFW) vízben oldottam vissza.

A DNS izolálás után a minták koncentrációját Nanodrop Spektrofotométerrel mértem le, majd az eredmények alapján hígítást végeztem 100 ng/µL, majd a későbbi PCR reakcióhoz szükséges 25 ng/µL-es koncentrációra. Az izolált DNS mintákat -20 °C -on tároltam, további felhasználásig.

3.3.2. Ivarmeghatározás

A genetikai ivar meghatározásához 25 ng/µl koncentrációra hígított DNS oldatokat használtam. A PCR-t MyTaQ polimerázzal, *CHD1* forward és reverse primerekkel és nukleáz mentes vízzel (NFW) készítettem el, 13 µl végtérfogatra számítva. PCR program: (1: 95 °C, 1min; 2: 95 °C, 15s, 48 °C, 30s, 72 °C, 10s, 28x; 3: 72 °C, 5 min).

A PCR termékeket gélelektroforézis segítségével vizsgáltam. Egy 1,5%-os agaróz gélét készítettem, 1X TAE puffer segítségével, 50 vagy 100 ml-es formában attól függően, hogy mennyi mintát vizsgáltam egy időben. Minden futtatáshoz 1 kb-os létrát, negatív, valamint hím és nőivarú pozitív kontrollt használtam.

3.4.RNS izolálás

RNS izolálás előtt a munkaterületet RNase ZAP-al mostam le, hogy a munkafelületen esetlegesen jelen lévő RNase-okat eltávolítsam a mintám környezetéből. A TRIzolban -70 °C -on tárolt, izolált szerv mintákat felolvasztás után 1,5 mL-es „Safe Lock” Eppendorf csövekbe

helyeztem, melybe korábban 2-2 db acél golyót osztottam szét a homogenizálás miatt. A mintákat homogenizáltam 1 percen keresztül 8-as fokozaton egy homogenizátor segítségével. Miután a minták megfelelően szétroncsolódtak kloroformot adtam hozzá a TRizolban álló mintákhoz és 15 mp-ig erősen összeráztam, amit 10 perc szobahőn történő inkubálás követett. A szobahőn tárolás után 15 percre centrifugába helyeztem a mintákat 13 000 rpm és 4 °C -os beállítások mellett. A nukleinsavat tartalmazó felülúszót, átpipettáztam egy új, feliratozott 1,5 mL-es Eppendorf csőbe. Az átpipettázott mintákhoz azonos mennyiségű tömény izopropanolt adtam, valamint 0,75 µl GlycoBlue festékkel vizualizáltam a néha nagyon kicsi pelletet. Ezt követően egy 30 perces inkubálásra volt szükség -20°C-on, hogy a festék hozzákössön a nukleinsavhoz.

Az inkubáció után szobahőmérsékleten további 10 percet vártam, majd egy 10 perces centrifugálás következett. A centrifuga lejárta utána láthatóvá válik a kékre festett nukleinsav pellet a cső alján. A pelletről eltávolítottam a folyadékot, majd háromszor mostam 75%-os etanollal. Minden mosási lépés után 5 percre centrifugába helyeztem a mintákat. A harmadik mosás után a pelletet steril fülke levegőjével szárítottam ki, majd 20-30 µL nukleáz mentes vízben oldottam vissza. Az izolált RNS koncentrációját Nanodrop Spektrofotométerrel mértem meg. A mintákat -70°C -on tároltam.

Az izolált RNS oldatokat a DNS-hez hasonlóan két lépésben hígítottam 25 ng/µl koncentrációra a további vizsgálatokhoz.

3.5.cDNS írás

A cDNS íráskor a 25 ng/µL koncentrációjú RNS mintákat használtam. Ehhez a következő paraméterekkel indítottam el a PCR reakciót. PCR program: (1: 25 °C, 10min; 2: 37 °C, 2h, 85 °C, 5min; 3: 4 °C).

20 µl-es végtérfogatú reakciókat készítettem, ahol 10 µl volt az RNS minta és 10 µl a MasterMix. A MasterMix összeméréséhez 10X dNTP-t, 10X Buffer-t, 10X Random primert, RNase inhibitort és Multi reverse Transcriptázt használtam

A cDNS-eket 8–10–12 napos ivarszerv RNS mintáiból írtam és használtam további vizsgálatokra, fejlődési állapotonként két hím és nőivarú egyedről.

3.6. Primer tervezés és kezelés

A primerek tervezése során dr. Hoffman Orsolya Ivett, a Modellállat Genetika csoport vezetője volt a segítségemre.

A tervezés során az NCBI adatbázist és a BLAST keresőt használtuk a megfelelő génszekvenciák keresésére. A primereket a Primer 3 Plus program segítségével terveztük meg, úgy, hogy génenként az első és a második exon határán legyenek, a termékek hossza pedig 150-200bp közé essen. A primereket a UCSC In-Silico PCR programmal ellenőriztük vissza. A következő génekre terveztünk primereket: *DMRT1*, *SOX9*, *PITX2*, *17βHSD*, *CYP19A1*, *ERα*. A tervezett primerek szekvenciái az 1. táblázatban láthatók.

Az érkezett liofilizált oligo primereket steril fülke alatt, megadott mennyiségű nukleáz mentes vízzel visszaoldottam 100 pg/μl-es koncentrációra. Az így kapott primereket egyenként 8x10 μl-es adagokba szétosztottam további felhasználásra. A beoldott és a szétosztott egységeket is -20 °C-on tárolom.

A kiosztott 10 μl, 100 pg/μl koncentrációjú forward és reverse primerekhez adtam 90 μl nukleáz mentes vizet, így kaptam 10 pg/μl koncentrációjú primereket.

A PCR-hez 6,0 μl MyTaq polimerázt, 0,5 μl forward és 0,5 μl reverse primert, valamint 4,0 μl NFW-t használtam. A PCR reakció végtérfogata 12 μl volt, 11 μl MasterMix + 1 μl minta. Génenként három tesztet végeztem: gDNS-t, cDNS-t, és negatív kontrollt. Ezeket gélelektroforézissel vizsgáltam, amihez 100 ml 2%-os agaróz gélt öntöttem. A futáshoz 1 Kb-os létrát használtam.

A primerek tesztelése után a következő génekkel végeztem a további vizsgálatokat: *DMRT1*, *CYP19A1*.

Gén	ID	Primer szekvencia (5' → 3')		Primer méret (bp)	T _m (°C)
PITX2	395862	FW	5' - GGCTGGAGGTGCACACTATC - 3'	20	61,4
		RW	5' - GCTGCTGGCTGGTGAAGT - 3'	18	58,2
ESR1	396099	FW	5' - AAATGAACAGGGCAGCTTTG - 3'	20	55,3
		RW	5' - TGAAGTGGGAATGATGAAAGG - 3'	21	55,9
17βHSD	395641	FW	5' - GTGCCGGTGGAGAAGACC - 3'	18	60,5
		RW	5' - GCAGCAGCTCCAGTGTGTC - 3'	19	61,0
DMRT1	769693	FW	5' - GACTGCCAGTGCAAGAAGTG - 3'	20	59,4
		RW	5' - CTGCAGGAGACAGGAGCTG - 3'	19	61,0
CYP19A1	414854	FW	5' - GAATTGGGCTCTCATTTC - 3'	20	55,3
		RW	5' - CGTGAAATACGCTGGAGGAT - 3'	20	57,3
SOX9	374148	FW	5' - AGGAAGCTGGCTGACCAGTA - 3'	20	59,4
		RW	5' - GTAGTCGGGGTGGTCCTTCT - 3'	20	61,4
GAPDH	374193	FW	5' - CAGATCAGTTTCTATCAGC - 3'	19	50
		RW	5' - TGTGACTTCAATGGTGACA - 3'	19	54,2
CHD1	395783	FW	5' - TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT - 3'	23	54
		RW	5' - CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT - 3'	23	53,2

1. táblázat. Tervezett és alkalmazott primerek

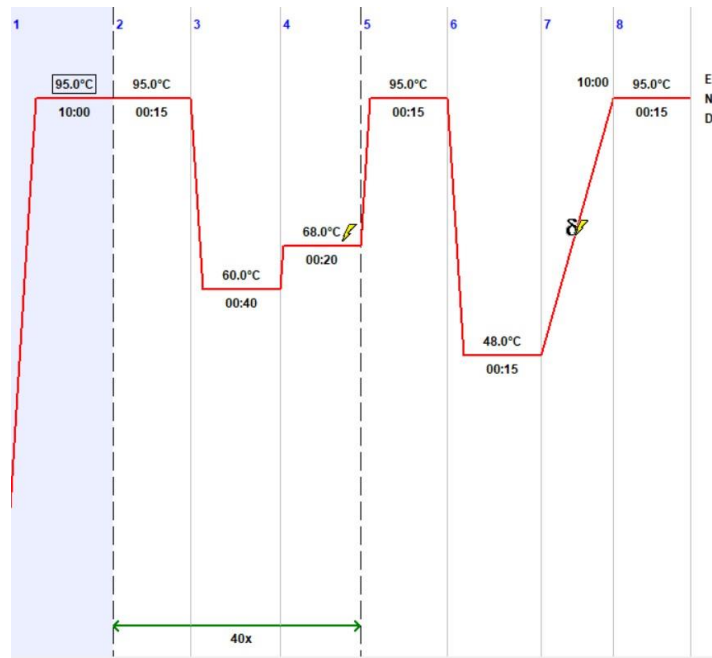
3.7.qPCR

PCR mix készítéséhez mintánként 5,25 µl NFW-t, 7,50 µl SYBR Green Master Mixet, 0,75 µl Forward és 0,75 µl Reverse primereket használtam. Egy mintához 14,25 µl-t master mixet osztottam ki wellenként. Ehhez 0,75 µl cDNS mintát használtam, 15,0 µl végtérfogatra számolva, de a mixet és a mintákat külön – külön pipettáztam a plate-re. A mintákat előre elkészített terv alapján egy 96-lyukú plate-re vittem fel. Minden minta esetében 3 párhuzamos mérést végeztem.

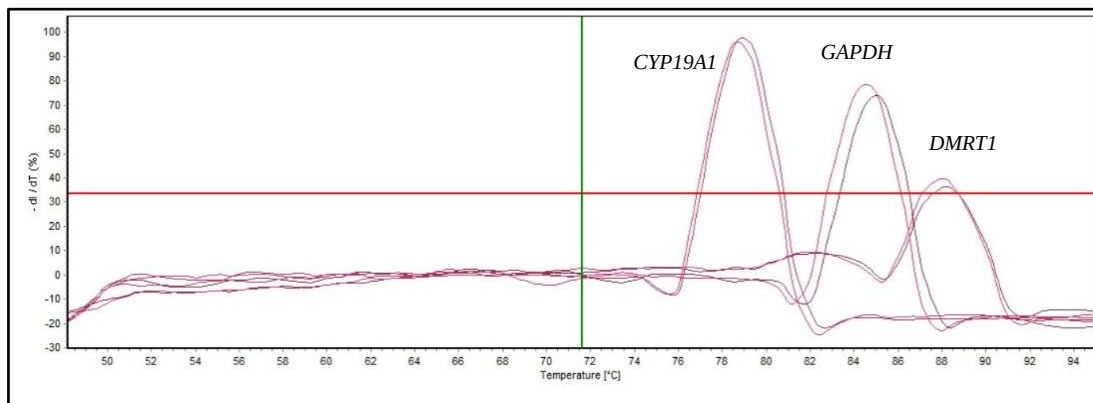
A cDNS mintákat vizsgáltuk valamennyi saját tervezett primerrel, valamint *GAPDH* primerrel, ami a leggyakrabban használt csirke háztartási gén. Kontrollként *GAPDH* primerrel vittünk fel csirke embrionális fibroblaszt (CEF) cDNS-t. Minden markerre végeztünk negatív kontroll vizsgálatot is.

A qPCR-eket két-két 8–10–12 napos hím és nőivarú embrió bal és jobb oldali ivarszerv cDNS mintáján végeztem el. A PCR program az 2. képen látható, míg az olvadási görbék a 3. képen.

A kapott eredményeket az Eppendorf Realplex programból exportáltuk, miután a három párhuzamos mérésből a legeltérőbbet kizártuk a későbbi analízis pontosítása érdekében.



2. kép. Alkalmazott qPCR program



3. kép. A qPCR analízis olvadási görbéi, egységes Threshold mellett.

Látható a két vizsgált marker, a CYP19A1 és a DMRT1, valamint a belső kontrollnak használt GAPDH háztartási gén, a 10 napos, baloldali, nőivarú embrionális gonád esetében, amit referencia mintaként alkalmaztunk a qPCR analízis során.

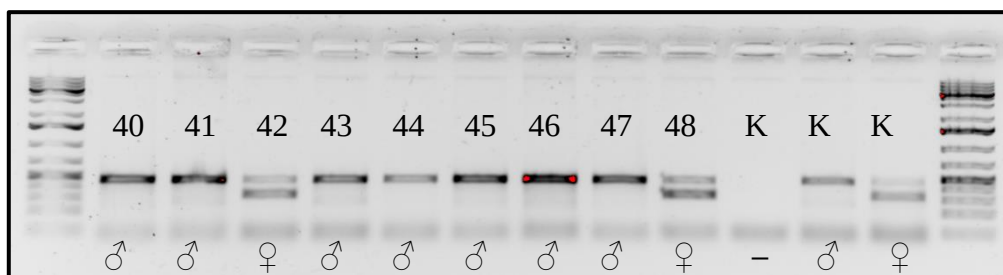
3.8. Adatelemzés

A Realplex programból kinyert adatokat Multid GenEx v.6 programmal elemeztem tovább. Első lépésként az ismételt mintáknak az átlag Ct értékeit határoztam meg. A három qPCR futás automatikusan beállított Threshold értékeit azonosra állítottam. Minden egyes lépés után a Genex szoftver által számolt értékeket Excelbe átmásoltam a későbbi átláthatóság érdekében. Az átlagokkal történő következő művelet a minták belső kontrollként alkalmazott *GAPDH* értékeihez való normalizálása volt. Végül a belső kontrollként használt 10 napos baloldali nőivarú ivarszerv minta értékeihez relatív expressziós értékeket számoltam, melyekből oszlopdiagrammon ábrázoltam a különböző korú és ivarú ivarszervekben expresszálo gének aktivitását.

4. Eredmények és értékelésük

4.1. Ivar meghatározás

Az összes vizsgálati napról legyűjtött szövetmintából megállapítottam minden egyed ivarát. A vizsgálati időszakon belül minden embrionális korban igyekeztem 2 hím és 2 nőivarú egyedtől mintát gyűjteni. Szex PCR-t követően kapott termékek gélen történő futásának eredménye a 4. képen látható.



4. kép Szex PCR eredménye gélelektroforézissel vizsgálva.

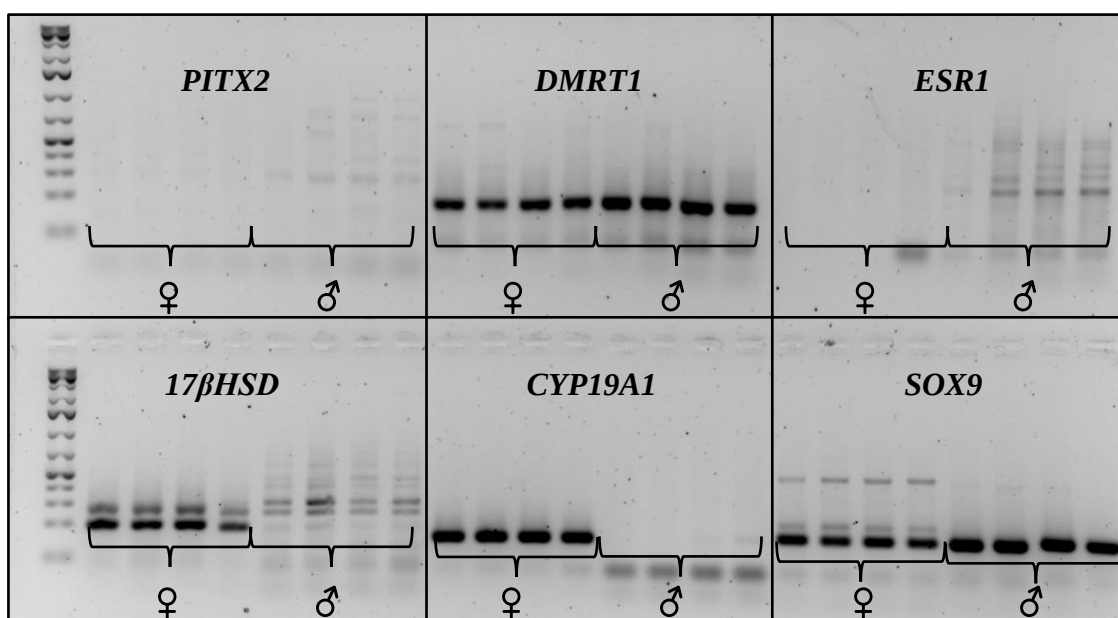
A minták 11 és 14 napos háztyúk embriók ivarszerveiből származnak. A 40 – 45 minták 11 napos a 45 – 48 közötti 14 napos embrióktól származik, végül egy negatív kontroll, valamint hím és nőivarú kontrollok láthatók.

4.2. Primerek tesztelése

A 2%-os agaróz gélen megfuttattam mind a hat markerből készült PCR terméket, a futásról készült gélkép a 5. képen látható. Minden génből 2–2 hím és nőivarú egyedtől bal és jobboldali embrionális ivarszerv mintákat vittem föl, 15 napos korból, valamint a futáshoz 1kb-os létrát használtam. Azért ezt a kort választottam, mert a legtöbb vizsgált génnek ilyenkor határozott eredményt kellene adnia. *PITX2* gén csak alig látható jeleket adott és csak hímivarban, számos aspecifikus jelek mellett, szintén alig látható primer dimerekkel. A *DMRT1* szépen látható, de túl erős expressziót mutat. A gélképen smir, illetve primer dimer figyelhető meg, ezek, illetve az erős jel a primerek túl tömény koncentrációjára utal. Valamint az egyik nőivarú mintán egy-egy aspecifikus band látható. Az *ESR1* gélképen nőivarban semmilyen eredményt nem kaptam. Hímivarban a futást smir és számos aspecifikus band jellemezte. A *17βHSD* esetében a nőivar szép jeleket adott a várt helyeken, de erős aspecifikus jeleket is kaptunk. Hímivarban nem kaptunk jelet, ami várható is, számos aspecifikus band látható, valamint primer dimerek mindkét ivarnál. *CYP19A1* nőivarban megfelelő eredményt adott. A hímivar nem adott jelet, ami várható eredmény, de erős primer dimerek láthatók. Végül a *SOX9* mindkét ivarban erős expressziós jelet adott, nőivarban két aspecifikus bandel együtt.

A kapott gélkép alapján az *ESR1*, *17βHSD* és a *PITX2* génre tervezett primereket szükséges újra tervezni. A *SOX9*-re tervezett primert nem használtuk a további vizsgálatokhoz, a nővarban jelentkező aspecifikus jelek miatt szükséges lenne a PCR programban alkalmazott hőmérsékletek optimalizálása, de mivel utána a többi primertől eltérő hőmérsékleten kellene a qPCR-t futtatni, ezért nem vizsgáltuk tovább.

Az eredmények alapján a további vizsgálatokhoz a *DMRT1* és a *CYP19A1* génekre tervezett primereket használtam a továbbiakban. Az erős expressziós jelek, a smires futás és a jelentkező primer dimerek kiküszöbölése érdekében a primerek koncentrációját újra hígítottam 10 pm/μl -ról 5 pm/μl -re a qPCR analízishez.



5. kép. Primerek tesztelése 2 %-os agaróz gélen, 1Kb-os létrával.
A gélen látható a hat általunk tervezett primer futási eredményei. Markerként 2 hím és 2 nőivarú, bal és jobb oldali embrionális ivarszerv minta.

4.3.qPCR analízis eredmények

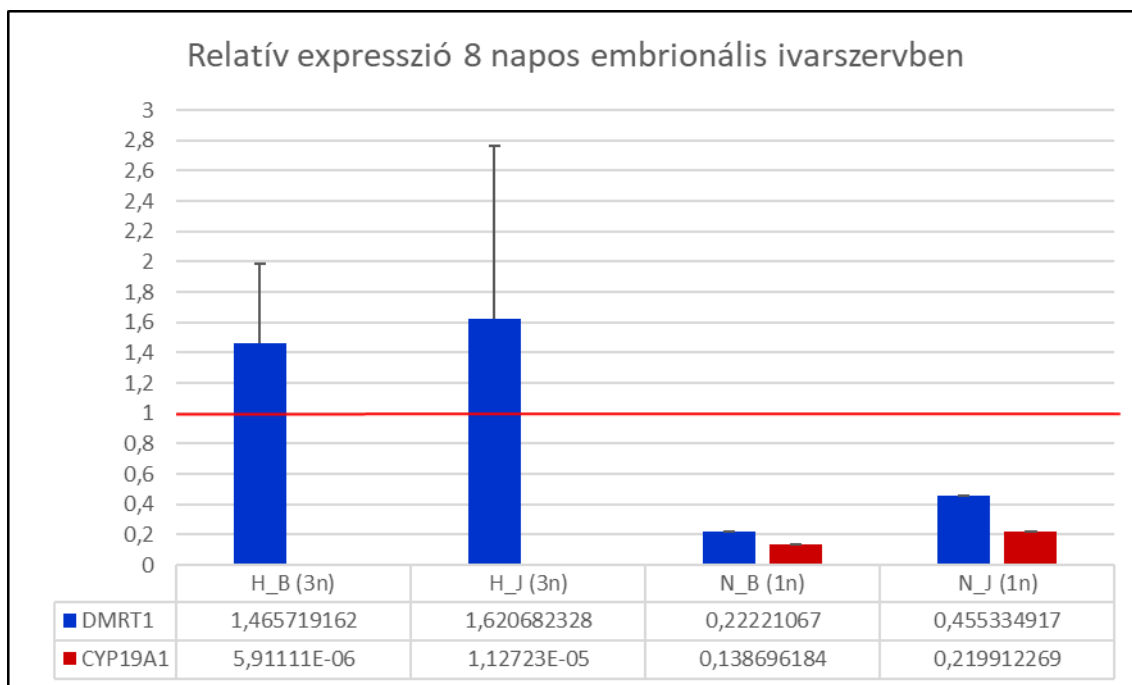
A qPCR analízisnél az általam vizsgált gének értékeit *GAPDH* -val normalizáltam, ezt a háztartási gént használtam belső kontrollként. Azért ezt választottam, mert ez az egyik legelterjedtebben alkalmazott kontroll baromfin végzett vizsgálatok esetén.

Belső kontrollnak az egyik 10 napos nőivarú, bal oldali ivarszervet választottam, ehhez viszonyítottam a többi minta eredményeit.

A 8 napos embrionális ivarszerv vizsgálatánál 3 hímivarú embriót és egy nőivarú embrió értékeit elemeztem ki. A *DMRT1* relatív expressziója hímivar esetében magasabb, mint a

nőivarnál, azonban lényeges különbségek nem mutathatók ki a bal és jobb oldali gonádok között egyik ivar esetében sem. A referencia mintához viszonyítva a hímivar értékei magasabbak, míg nőivarban alacsonyabbak.

CYP19A1 gén expressziója hímeknél csak minimális értéket mutat. Nőivarban az expresszió mértéke a jobb oldalon minimálisan magasabb, de közel azonosak, a 10 napos referenciánál alacsonyabb. Az eredmények az 1-es diagrammon láthatók.

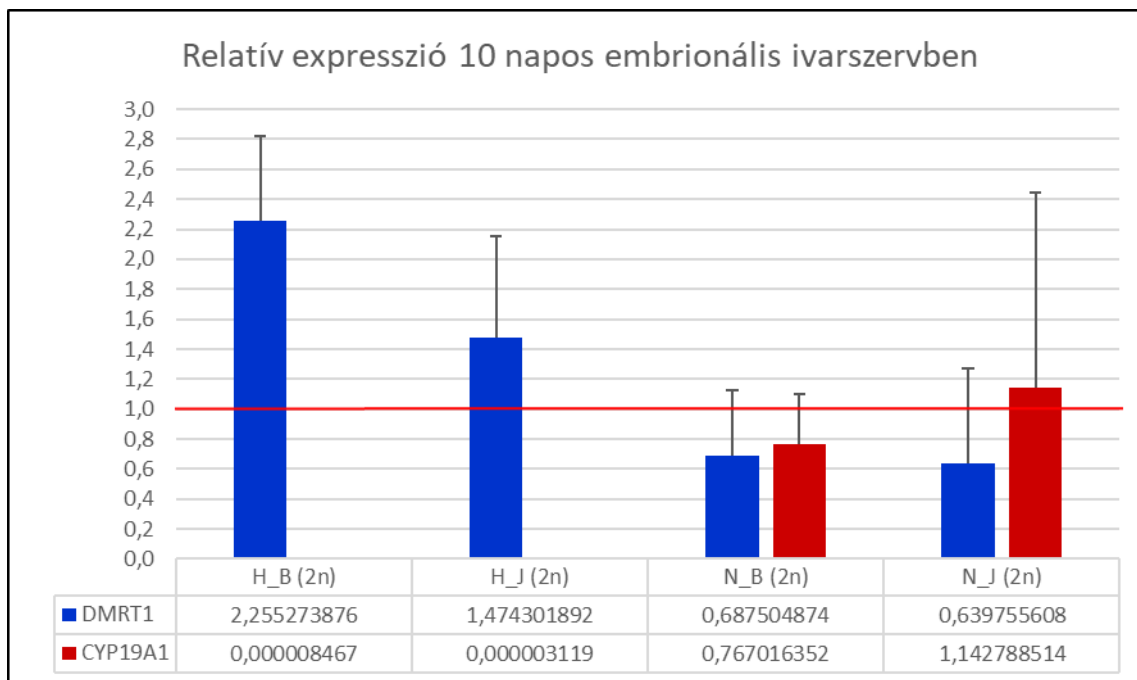


1. diagram. Relatív expresszió 8 napos embrionális ivarszervben.

DMRT1 és CYP19A1 géneket vizsgáltuk GAPDH háztartási génre normalizált értékekkel és 10 napos nőivarú bal oldali gonádhhoz viszonyítva, melynek értéke 1, amit a diagramon jelöltem. A DMRT1 expresszió hímivarban jelentősen magasabb, mint nőivarban, míg CYP19A1 expresszió ebben a korban még viszonylag alacsony szintet mutat nőivarban is. (H_B: hímivar, bal oldal; H_J: hímivar, jobb oldal; N_B: nőivar, baloldal; N_J: nőivar, jobb oldal, n: mintaszám.)

A 10 napos embrionális ivarszerv esetében, *DMRT1* gén expressziója jelentős aszimmetriát mutat a bal oldali gonád irányában, míg nőivarnál az értékek közel azonosak. Általában elmondható, hogy a hímek esetében az expresszió mértéke magasabb, mint a nőivarú egyedeknél és magasabb, mint a referencia minta értéke. A nőivar esetében az expresszió valamivel alacsonyabb, mint a referencia.

CYP19A1 expresszió erősebb a tojóknál, hímivarban elenyésző mértékű. Nőivarban a referencia mintához közeli értékeket kaptam. Érzékelhetően magasabb az expresszió a jobboldalon, mint a baloldalon. A 10 napos eredmények a 2. diagrammon láthatók.

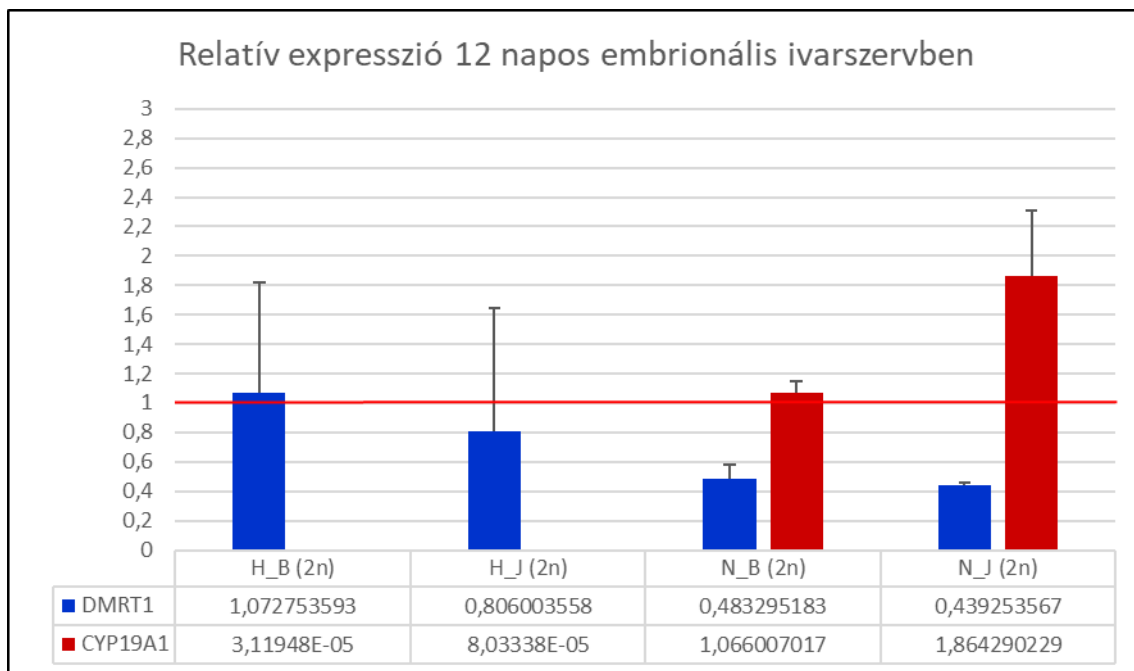


2. diagram. Relatív expresszió 10 napos embrionális ivarszervben

DMRT1 és CYP19A1 géneket vizsgáltuk GAPDH háztartási génre normalizált értékekkel és 10 napos nőivarú bal oldali gonádhhoz viszonyítva, melynek értéke 1, amit a diagramon jelöltem. A DMRT1 és a CYP19A1 gének expressziós mintázatai jelentős különbségeket mutatnak, mind a bal és jobb oldali gonádok között, mind az eltérő ivarok között. DMRT1 esetében a baloldalon, míg Aromatáz esetében a jobb oldalon figyelhetők meg magasabb expressziós értékek. (H_B: hímivar, bal oldal; H_J: hímivar, jobb oldal; N_B: nőivar, baloldal; N_J: nőivar, jobb oldal, n: mintaszám.)

A 12 napos embrionális ivarszerveknél, a *DMRT1* gén a hímek esetében magasabban expresszált, mint nőivarban és a bal oldalon valamivel szintén magasabb volt, mint a jobb oldalon. Az értékek a referencia minta értékei körül voltak. Nőivar esetében a különbség minimális a két oldal között, valamint az értékek nem érik el a referencia szintjét.

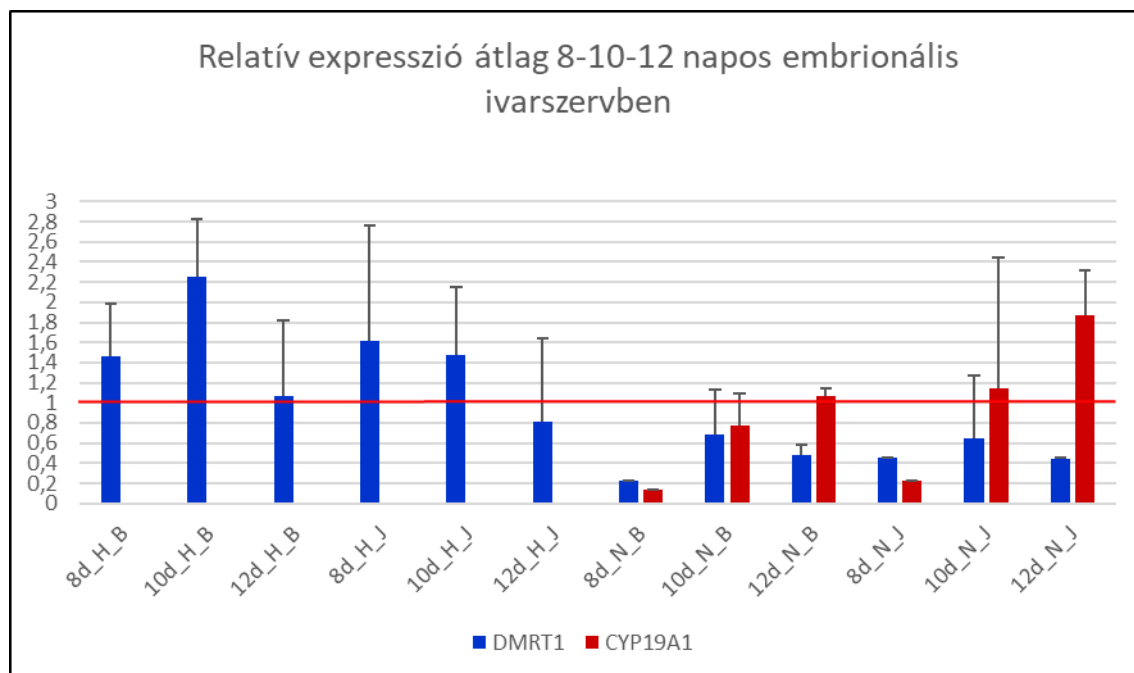
Aromatáz expresszió hímivarban alig megfigyelhető szinten van. Nőivarban mindkét oldalon erősebb a génexpresszió, mint a referencia mintában, illetve aszimmetria is megfigyelhető az expressziók szintjében, a jobb gonádban mértem magasabb értékeket.



3. diagram. Relatív expresszió 12 napos embrionális ivarszervben

DMRT1 és CYP19A1 géneket vizsgáltuk GAPDH háztartási génre normalizált értékekkel és 10 napos nőivarú bal oldali gonádhoz viszonyítva, melynek értéke 1, amit a diagramon jelöltem. A DMRT1 esetén csak a himivárban figyelhető meg különbség a két oldal között és himivárban magasabb az expresszió szintje. Aromatáz esetében a nőivar jobb oldalon jóval magasabb értéket kaptunk, mint baloldalon. (H_B: himivár, bal oldal; H_J: himivár, jobb oldal; N_B: nőivar, baloldal; N_J: nőivar, jobb oldal, n: mintaszám.)

A 8-10-12 napos embrionális ivarszervekben mért relatív expressziós átlag értékek a 4. diagrammon láthatók.



4. diagram. Relatív expresszió átlag 8-10-12 napos embrionális ivarszervekben.

DMRT1 és CYP19A1 géneket vizsgáltuk GAPDH háztartási génre normalizált értékekkel és 10 napos nőivarú bal oldali gonádhoz viszonyítva, melynek értéke 1, amit a diagramon jelöltem. (H_B: himivár, bal oldal; H_J: himivár, jobb oldal; N_B: nőivar, baloldal; N_J: nőivar, jobb oldal, d: vizsgálati nap.)

A teljes vizsgálati időszakban mért *DMRT1* eredmények jelentős különbségeket mutatnak a két ivar között. Minden vizsgálati napon a hímivarnál kaptam magasabb eredményeket, amit az irodalmi adatok alapján is így vártam ennél a génnél. Mindkét ivarnál és mindkét oldalon megfigyelhető egységes mintázat, miszerint 8. és 10. nap között az expresszió mértéke egységesen növekszik, majd pedig 10 és 12 nap között szintén egységesen csökken.

A *CYP19A1* gén expressziójáról a teljes vizsgálati időszakra vetítve, elmondható, hogy a kor előrehaladtával mind a bal és jobb oldali gonádban egyre erősödő génműködés figyelhető meg nőivarban. Minden vizsgált napon aszimmetria volt megfigyelhető a génexpresszióban. Minden esetben a jobb oldalon kaptam magasabb expressziós értékeket. A kapott értékek megfelelnek a szakirodalmi adatok alapján várt értékeknek. A hímivarban is megfigyelhető egy enyhe expresszió, de csak olyan alacsony szinten, ami nem alkalmas következtetések levonására.

A kapott párhuzamos mérések esetében megadtam az átlageltérések értékeit, de statisztikai elemzéseket az alacsony mintaszám miatt nem lehetett végezni. Ennek ellenére a kapott eredményekből levonható következtetések reálisnak tekinthetők, mind a két vizsgált marker esetében a 8 napos kortól kezdve nyomon követhető volt az expressziós értékek változása. Jól kivehető a mért különbség az eltérő ivarokban működő gének aktivitása között. A mintaszám növelésével áthidalhatók az embriók esetében látott egyéni különbségek - amik az adott napon izolált embriók fejlettségi állapotában meglévő eltérésekből adódhattak - lehetőség nyílik statisztikai számítások végzésére is. A továbbiakban magasabb mintaszám mellett, a többi kiválasztott génnel is szeretném a vizsgálatokat folytatni, amikkel még pontosabb képet kaphatunk a kiválasztott őshonos fajta embrionális ivarszervfejlődésének genetikai hátteréről.

5. Összefoglalás

Madaraknál – ellentétben az emlősökkel – a hímivar a homogamétás (ZZ), míg a tojó a heterogamétás (ZW) ivar, ami komoly kérdést jelent a génmegőrzés témakörében, mert a tojás mélyhűtés nem megoldható a magas szik tartalom miatt. Hatékony módszernek bizonyult az ősi varsejtek alkalmazása, melyek embrionális vérből izolálhatók. Segítségükkel sejtenyészetek alapíthatók, így a madarak teljes genetikai anyaga eltárolható hosszú távon, génmegőrzés céljából. Színén lényeges különbség, hogy az emlősökkel ellentétben a madaraknál aszimmetria figyelhető meg az ivarszervek fejlődésében, különösen a tojóknál, ahol a petefészek csak a bal oldalon fejlődik ki funkcionálisan. Ennek megfelelően a fejlődésben szerepet játszó gének működésében is megfigyelhető ez az aszimmetrikus mintázat. Ezért szükséges megértenünk az ivarszerv fejlődés genetikai hátterét az őshonos fajták esetében is.

Az őscsírasejtek visszajuttatásához szükség van a megfelelő recipiens fajta megtalálására. Miután a PG sejtek bekerülnek a befogadó embrió szervezetébe, a megfelelő szignálokat követve, a vándorlás végeztével beépülnek az embrionális ivarszerv kezdeményekbe.

Vizsgálatom során az ivarszerv fejlődésében résztvevő gének expressziós profilját határoztam meg 8-10-12 napos Erdélyi fekete kopasznakú embriókban. Ehhez a vizsgálati időszakból mindkét ivar esetében, bal és jobboldali ivarszervekből RNS-t izoláltam, melyből cDNS-t írtam. A vizsgálatra kiválasztott génekre primereket terveztünk. Két gén esetében az RNS expresszió szintjét qPCR-t alkalmazva vizsgáltam meg. A mért expressziós értékeket Genex szoftverrel analizáltam és viszonyítottam egymáshoz.

A vizsgálati időszakban, az eredmények alapján jól megfigyelhetők voltak a kiválasztott gének aktivitási mintázatainak változásai a fejlődési napok mentén haladva. Jól elkülönültek a hím és nőivarban detektálható markerek és a különbségek az embrionális gonádok két oldala között. A későbbiekben, ha lehetőség lesz további markereket is bevonni a kísérletbe, érdemes magasabb mintaszámmal dolgozni. A kapott eredmények hozzájárulnak a témában végzett kutatásokhoz, melyek egy őscsírasejt alapú őshonos génbank fejlesztése felé irányultak.

6. Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom mindenekelőtt témavezetőmnek, **Tóth Rolandnak**, amiért olyan sokat segített munkám során. Szaktudásával és tanácsaival, amikkel a laboratóriumi technikák elsajátításában nyújtott segítséget.

Köszönettel tartozom a csoport vezetőjének, **Dr. Gócza Elennek**, a kutatási munka végzése és a dolgozat megírása során nyújtott segítségéért és tanácsaiért.

Szeretném megköszönni **Dr. Hoffmann Orsolyának** a primerek tervezése során nyújtott segítségét és helyes meglátásait, amivel segítette a munkámat.

Valamint köszönettel tartozom a csoport valamennyi munkatársának, **Dr. Lázár Bencének**, **Urbán Martinnak** és **Ecker Andrásnak**, hogy mindig segítségemre voltak a munkám során. Szeretném megköszönni a NBGK-HGI munkatársainak a tojások biztosítását, amik a munkám alapjául szolgáltak.

Köszönettel tartozom a kísérlet anyagi támogatásáért a 2019-2.1.11-TÉT-2019-00036 és a TKP2020-NKA-24 projekteknek.

7. Irodalomjegyzék

- Andrews, Jane E., Craig A. Smith, and Andrew H. Sinclair. 1997. "Sites of Estrogen Receptor and Aromatase Expression in the Chicken Embryo." *General and Comparative Endocrinology* 108 (2): 182–90. <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6978>.
- Ayers, Katie L., Craig A. Smith, and Luke S. Lambeth. 2013. "The Molecular Genetics of Avian Sex Determination and Its Manipulation." *Genesis* 51 (5): 325–36. <https://doi.org/10.1002/dvg.22382>.
- Bogenfürst, Ferenc, Péter Horn, István Meleg, Sándor Mihók, and Zoltán Sütő. 2000. *Állattenyésztés 2. - Baromfi, Haszongalamb*. Edited by Péter Horn. Mezőgazda Kiadó.
- Borowska, D., L. Rothwell, R. A. Bailey, K. Watson, and P. Kaiser. 2016. "Identification of Stable Reference Genes for Quantitative PCR in Cells Derived from Chicken Lymphoid Organs." *Veterinary Immunology and Immunopathology* 170: 20–24. <https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2016.01.001>.
- Burke, W. H. 1973. "Testicular Asymmetry in the Turkey." *Poultry Science* 52 (4): 1652–54. <https://doi.org/10.3382/ps.0521652>.
- Bustin, S. A. 2000. "Absolute Quantification of Mrna Using Real-Time Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction Assays." *Journal of Molecular Endocrinology* 25 (2): 169–93. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0250169>.
- Calhim, Sara, and Tim R. Birkhead. 2009. "Intraspecific Variation in Testis Asymmetry in Birds: Evidence for Naturally Occurring Compensation." *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* 276 (1665): 2279–84. <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0134>.
- Carlson, N., and A. Stahl. 1985. "Origin of the Somatic Components in Chick Embryonic Gonads." *Archives d'anatomie Microscopique et de Morphologie Expérimentale*. 74 (1): 52–59.
- Carré, Gwenn Aël, Isabelle Couty, Christelle Hennequet-Antier, and Marina S. Govoroun. 2011. "Gene Expression Profiling Reveals New Potential Players of Gonad Differentiation in the Chicken Embryo." *PLoS ONE* 6 (9): 1–12. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023959>.
- Choi, Jin Won, Sujung Kim, Tae Min Kim, Young Min Kim, Hee Won Seo, Tae Sub Park, Jae Wook Jeong, Gwonhwa Song, and Jae Yong Han. 2010. "Basic Fibroblast Growth Factor Activates MEK/ERK Cell Signaling Pathway and Stimulates the Proliferation of Chicken Primordial Germ Cells." *PLoS ONE* 5 (9). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0012968>.

- Chue, Justin, and Craig A. Smith. 2011. "Sex Determination and Sexual Differentiation in the Avian Model." *FEBS Journal* 278 (7): 1027–34. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08032.x>.
- Clawson, Robert C., and L. V. Domm. 1969. "Origin and Early Migration of Primordial Germ Cells in the Chick Embryo: A Study of the Stages Definitive Primitive Streak through Eight Somites." *American Journal of Anatomy* 125 (1): 87–111. <https://doi.org/10.1002/aja.1001250105>.
- Clinton, Michael. 1998. "Sex Determination and Gonadal Development: A Bird's Eye View." *Journal of Experimental Zoology* 281 (5): 457–65. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-010X\(19980801\)281:5<457::AID-JEZ10>3.0.CO;2-6](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-010X(19980801)281:5<457::AID-JEZ10>3.0.CO;2-6).
- Clinton, Michael, and Lynne C. Haines. 2001. "An Overview of Factors Influencing Sex Determination and Gonadal Development in Birds." In *Genes and Mechanisms in Vertebrate Sex Determination*, edited by Michael Schmid (Department of Human Genetics University of Würzburg Biozentrum) (Institute of Human Genetics and Anthropology University of Freiburg), Gerd Scherer, EXS 91, 97–115. Springer Basel AG. <https://doi.org/10.1007/978-3-0348-7781-7>.
- Cutting, Andrew D., Stephanie C. Bannister, Tim J. Doran, Andrew H. Sinclair, Mark V.L. Tizard, and Craig A. Smith. 2012. "The Potential Role of MicroRNAs in Regulating Gonadal Sex Differentiation in the Chicken Embryo." *Chromosome Research* 20 (1): 201–13. <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9263-y>.
- Ellegren, Hans. 2001. "Hens, Cocks and Avian Sex Determination." *EMBO Reports* 2 (3): 192–96. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve050>.
- Eyal-Giladi, H., M. Ginsburg, and A. Farbarov. 1981. "Avian Primordial Germ Cells Are of Epiblastic Origin." *Journal of Embryology and Experimental Morphology* Vol. 65 (1): 139–47. <https://doi.org/10.1242/dev.65.1.139>.
- Gócza, Elen, Bence Lázár, and Eszter Patakiné Várkonyi. 2017. "Génbanki Kutatások Régi Haszonállataink Védelmében." In *Génbanki Kutatások Régi Haszonállataink Védelmében*, edited by István Szalay, 214.
- Guioli, Silvana, and Robin Lovell-Badge. 2007. "PITX2 Controls Asymmetric Gonadal Development in Both Sexes of the Chick and Can Rescue the Degeneration of the Right Ovary." *Development* 134 (23): 4199–4208. <https://doi.org/10.1242/dev.010249>.
- Hamburger, Viktor, and Howard Hamilton. 1992. "A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo." *Developmental Dynamics* 195 (4): 231–72. <https://doi.org/10.1002/aja.1001950404>.

- Hocking, P. M. 1992. "Bilateral Testicular Asymmetry and Supernumerary Testes in the Domestic Fowl (*Gallus Domesticus*)."
British Poultry Science 33 (2): 455–60.
<https://doi.org/10.1080/00071669208417483>.
- Hoshino, Anshin, Masafumi Koide, Tamao Ono, and Sadao Yasugi. 2005. "Sex-Specific and Left-Right Asymmetric Expression Pattern of Bmp7 in the Gonad of Normal and Sex-Reversed Chicken Embryos."
Development Growth and Differentiation 47 (2): 65–74.
<https://doi.org/10.1111/j.1440-169x.2004.00783.x>.
- Hudson, Quanah J., Craig A. Smith, and Andrew H. Sinclair. 2005. "Aromatase Inhibition Reduces Expression of FOXL2 in the Embryonic Chicken Ovary."
Developmental Dynamics 233 (3): 1052–55. <https://doi.org/10.1002/dvdy.20388>.
- Huggett, J., K. Dheda, S. Bustin, and A. Zumla. 2005. "Real-Time RT-PCR Normalisation; Strategies and Considerations."
Genes and Immunity 6 (4): 279–84.
<https://doi.org/10.1038/sj.gene.6364190>.
- Intarapat, Sittipon. 2011. "Isolation and Characterisation of Chick Embryonic Primordial Germ Cells." University College London.
- Intarapat, Sittipon, and Claudio D. Stern. 2013a. "Chick Stem Cells: Current Progress and Future Prospects."
Stem Cell Research 11 (3): 1378–92.
<https://doi.org/10.1016/j.scr.2013.09.005>.
- Intarapat, Sittipon, and Claudio D. Stern. 2013b. "Sexually Dimorphic and Sex-Independent Left-Right Asymmetries in Chicken Embryonic Gonads."
PLoS ONE 8 (7): 1–8.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069893>.
- Intarapat, Sittipon, and Claudio D. Stern. 2014. "Left-Right Asymmetry in Chicken Embryonic Gonads."
Journal of Poultry Science 51 (4): 352–58.
<https://doi.org/10.2141/jpsa.0140032>.
- Ishimaru, Yoshiyasu, Tomoko Komatsu, Megumi Kasahara, Yuko Katoh-Fukui, Hidesato Ogawa, Yoshiro Toyama, Mamiko Maekawa, et al. 2008. "Mechanism of Asymmetric Ovarian Development in Chick Embryos."
Development 135 (4): 677–85.
<https://doi.org/10.1242/dev.012856>.
- Kent, Jill, Susan C. Wheatley, Jane E. Andrews, Andrew H. Sinclair, and Peter Koopman. 1996. "A Male-Specific Role for SOX9 in Vertebrate Sex Determination."
Development 122 (9): 2813–22. <https://doi.org/10.1242/dev.122.9.2813>.
- Koba, Naomi, Toshimichi Ohfuji, Yonju Ha, Shusei Mizushima, Akira Tsukada, Noboru Saito, and Kiyoshi Shimada. 2008. "Profiles of mRNA Expression of FOXL2, P450arom, DMRT1, AMH, P450 C17, SF1, ER α and AR, in Relation to Gonadal Sex Differentiation

- in Duck Embryo.” *Journal of Poultry Science* 45 (2): 132–38.
<https://doi.org/10.2141/jpsa.45.132>.
- Kuwana, T, and T Rogulska. 1999. “Migratory Mechanisms of Chick Primordial Germ Cells toward Gonadal Anlage.” *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)* 45 (5): 725–36.
- Lavoir, Marie Cecile Van De, Christine Mather-Love, Philip Leighton, Jennifer H. Diamond, Babette S. Heyer, Rhys Roberts, Lei Zhu, et al. 2006. “High-Grade Transgenic Somatic Chimeras from Chicken Embryonic Stem Cells.” *Mechanisms of Development* 123 (1): 31–41. <https://doi.org/10.1016/j.mod.2005.10.002>.
- Limborgh, J van. 1970. “[Primary asymmetry of the gonadal primordia in the duck].” *Zeitschrift für Anatomie und Entwicklungsgeschichte* 130 (1): 37–79.
- Limborgh, J Van. 1954. “[Experimental study on gonadal asymmetry in female birds].” *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 98 (12): 807–9.
- Limborgh, Van. 1960. “[The origin of the primary asymmetry of bird gonads].” *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 104 (November): 2442–43.
- Limborgh, Van, and Van Fassen. 1960. “The Asymmetry of the Gonads in Duck Embryos Experimentally Turned on Their Right Side.” *Acta Morphologica Neerlando-Scandinavica* 3: 79–91.
- Macdonald, Joni, James D. Glover, Lorna Taylor, Helen M. Sang, and Michael J. McGrew. 2010. “Characterisation and Germline Transmission of Cultured Avian Primordial Germ Cells.” *PLoS ONE* 5 (11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015518>.
- Mank, J. E., and H. Ellegren. 2009. “All Dosage Compensation Is Local: Gene-by-Gene Regulation of Sex-Biased Expression on the Chicken Z Chromosome.” *Heredity* 102 (3): 312–20. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.116>.
- Maraud, R, O Vergnaud, and M Rashedi. 1987. “Structure of the Right Testis of Sexually Mature Genetically Female Fowl Experimentally Masculinized during Embryonic Life and Submitted to a Posthatching Left Castration.” *General and Comparative Endocrinology* 68 (2): 208–15. [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90031-1](https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90031-1).
- McCarrey, John R., and Ursula K. Abbott. 1979. “Mechanisms of Genetic Sex Determination, Gonadal Sex Differentiation, and Germ-Cell Development in Animals.” *Advances in Genetics* 20: 217–90. [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60547-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60547-7).
- Mellor, D. J., and T. J. Diesch. 2007. “Birth and Hatching: Key Events in the Onset of Awareness in the Lamb and Chick.” *New Zealand Veterinary Journal* 55 (2): 51–60. <https://doi.org/10.1080/00480169.2007.36742>.

- Mellor, D J, T J Diesch, and C B Johnson. 2010. "Legal and Animal Welfare Implications of When Consciousness First Appears in Developing Young and of the Potential for Delayed Onset of Increased Pain Sensitivity." *AAWS International Animal Welfare Conference*, 8.
- Molnár, Mariann, Bence Lázár, Nikoletta Sztán, Barbara Végi, Árpád Drobnyák, Roland Tóth, Krisztina Liptói, et al. 2019. "Investigation of the Guinea Fowl and Domestic Fowl Hybrids as Potential Surrogate Hosts for Avian Cryopreservation Programmes." *Scientific Reports* 9 (1): 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50763-3>.
- Moriyama, Shunsuke, Jun Ogihara, Jun Kato, Tetsuya Hori, and Shigeki Mizuno. 2006. "PKCI-W Forms a Heterodimer with PKCI-Z and Inhibits the Biological Activities of PKCI-Z in Vitro, Supporting the Predicted Role of PKCI-W in Sex Determination in Birds." *Journal of Biochemistry* 139 (1): 91–97. <https://doi.org/10.1093/jb/mvj004>.
- Munro, A. 1977. "Mammalian Chimaeras. Anne McLaren ." *The Quarterly Review of Biology* 52 (4): 416. <https://doi.org/10.1086/410186>.
- Nakabayashi, O., H. Kikuchi, T. Kikuchi, and S. Mizuno. 1998. "Differential Expression of Genes for Aromatase and Estrogen Receptor during the Gonadal Development in Chicken Embryos." *Journal of Molecular Endocrinology* 20 (2): 193–202. <https://doi.org/10.1677/jme.0.0200193>.
- Nilsson, E. E., and J. G. Cloud. 1992. "Rainbow Trout Chimeras Produced by Injection of Blastomeres into Recipient Blastulae." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (20): 9425–28. <https://doi.org/10.1073/pnas.89.20.9425>.
- Oréal, Emmanuelle, Séverine Mazaud, Jean Yves Picard, Solange Magre, and Danièle Carré-Eusébe. 2002. "Different Patterns of Anti-Müllerian Hormone Expression, as Related to DMRT1, SF-1, WT1, GATA-4, Wnt-4, and Lhx9 Expression, in the Chick Differentiating Gonads." *Developmental Dynamics* 225 (3): 221–32. <https://doi.org/10.1002/dvdy.10153>.
- Oreal, Emmanuelle, Claude Pieau, Marie Genevieve Mattei, Nathalie Josso, Jean Yves Picard, Danièle Carré-Eusébe, and Solange Magre. 1998. "Early Expression of AMH in Chicken Embryonic Gonads Precedes Testicular SOX9 Expression." *Developmental Dynamics* 212 (4): 522–32. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199808\)212:4<522::AID-AJA5>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199808)212:4<522::AID-AJA5>3.0.CO;2-J).
- Pace, Helen C., and Charles Brenner. 2003. "Feminizing Chicks: A Model for Avian Sex Determination Based on Titration of Hint Enzyme Activity and the Predicted Structure of an Asw-Hint Heterodimer." *Genome Biology* 4 (3). <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-r18>.

- Pain, B., M. E. Clark, M. Shen, H. Nakazawa, M. Sakurai, J. Samarut, and R. J. Etches. 1996. "Long-Term in Vitro Culture and Characterisation of Avian Embryonic Stem Cells with Multiple Morphogenetic Potentialities." *Development* 122 (8): 2339–48. <https://doi.org/10.1242/dev.122.8.2339>.
- Péczely, Péter. 2013. "Szex Determináció És Ivari Differenciálódás." In *Madár Szaporodásbiológia*, 13–31.
- Pérez-Aparicio, Francisco Javier, Ana Carretero, Marc Navarro, and Jesús Ruberte. 1998. "The Lack of Genital Ridge Vascularization in the Early Chick Embryo: Implications in the Migration of the Primordial Germ Cells." *The Anatomical Record* 251 (3): 398–405. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0185\(199807\)251:3<398::AID-AR16>3.0.CO;2-J](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0185(199807)251:3<398::AID-AR16>3.0.CO;2-J).
- Petitte, J. N., M. E. Clarck, G. Liu, A. M. Verrinder Gibbins, and R. J. Etches. 1990. "Production of Somatic and Germline Chimeras in the Chicken by Transfer of Early Blastodermal Cells." *Development* 108 (1): 185–89. <https://doi.org/10.1242/dev.108.1.185>.
- Radonić, Aleksandar, Stefanie Thulke, Ian M. Mackay, Olfert Landt, Wolfgang Siegert, and Andreas Nitsche. 2004. "Guideline to Reference Gene Selection for Quantitative Real-Time PCR." *Biochemical and Biophysical Research Communications* 313 (4): 856–62. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.11.177>.
- Raymond, Christopher S., Jae R. Kettlewell, Betsy Hirsch, Vivian J. Bardwell, and David Zarkower. 1999. "Expression of Dmrt1 in the Genital Ridge of Mouse and Chicken Embryos Suggests a Role in Vertebrate Sexual Development." *Developmental Biology* 215 (2): 208–20. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9461>.
- Reed, Kirsty J., and Andrew H. Sinclair. 2002. "FET-1: A Novel W-Linked, Female Specific Gene up-Regulated in the Embryonic Chicken Ovary." *Gene Expression Patterns* 2 (1–2): 83–86. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00288-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00288-5).
- Reed, Wendy L., and Mark E. Clark. 2011. "Beyond Maternal Effects in Birds: Responses of the Embryo to the Environment." *Integrative and Comparative Biology* 51 (1): 73–80. <https://doi.org/10.1093/icb/icr032>.
- Rodríguez-León, Joaquín, Concepción Rodríguez Esteban, Mercè Martí, Belén Santiago-Josefat, Ilir Dubova, Xavier Rubiralta, and Juan Carlos Izpisua Belmonte. 2008. "Pitx2 Regulates Gonad Morphogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (32): 11242–47. <https://doi.org/10.1073/pnas.0804904105>.
- Romanoff , Alexis Lawrence. 1960. *The Avian Embryo, Structural and Functional Development*. New York: Macmillan.

- Romanoff, Alexis L. 1961. "The Avian Embryo : Structural and Functional Development." *AIBS Bulletin* 11 (2): 42–43.
- Silva, Sara Morais da, Adam Hacker, Vince Harley, Peter Goodfellow, Amanda Swain, and Robin Lovell-Badge. 1996. "Sox9 Expression during Gonadal Development Implies a Conserved Role for the Gene in Testis Differentiation in Mammals and Birds." *Nature Genetics* 14: 62–68. <https://doi.org/doi.org/10.1038/ng0996-62>.
- Sirover, Michael A. 1997. "Role of the Glycolytic Protein, Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase, in Normal Cell Function and in Cell Pathology." *Journal of Cellular Biochemistry* 66 (2): 133–40. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-4644\(19970801\)66:2<133::AID-JCB1>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-4644(19970801)66:2<133::AID-JCB1>3.0.CO;2-R).
- Smith, C. A. 2007. "Sex Determination in Birds: HINTs from the W Sex Chromosome?" *Sexual Development* 1 (5): 279–85. <https://doi.org/10.1159/000108934>.
- Smith, C. A., K. N. Roeszler, Q. J. Hudson, and A. H. Sinclair. 2007. "Avian Sex Determination: What, When and Where?" *Cytogenetic and Genome Research* 117 (1–4): 165–73. <https://doi.org/10.1159/000103177>.
- Smith, Craig A. 2010. "Rowley Review. Sex Determination in Birds: A Review." *Emu* 110 (4): 364–77. <https://doi.org/10.1071/MU10030>.
- Smith, Craig A., Jane E. Andrews, and Andrew H. Sinclair. 1997. "Gonadal Sex Differentiation in Chicken Embryos: Expression of Estrogen Receptor and Aromatase Genes." *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 60 (5–6): 295–302. [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(96\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(96)00196-3).
- Smith, Craig A., Melissa Katz, and Andrew H. Sinclair. 2003. "DMRT1 Is Upregulated in the Gonads during Female-to-Male Sex Reversal in ZW Chicken Embryos." *Biology of Reproduction* 68 (2): 560–70. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007294>.
- Smith, Craig A., Peter J. McClive, Quanah Hudson, and Andrew H. Sinclair. 2005. "Male-Specific Cell Migration into the Developing Gonad Is a Conserved Process Involving PDGF Signalling." *Developmental Biology* 284 (2): 337–50. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.030>.
- Smith, Craig A., Kelly N. Roeszler, Thomas Ohnesorg, David M. Cummins, Peter G. Farlie, Timothy J. Doran, and Andrew H. Sinclair. 2009. "The Avian Z-Linked Gene DMRT1 Is Required for Male Sex Determination in the Chicken." *Nature* 461 (7261): 267–71. <https://doi.org/10.1038/nature08298>.
- Smith, Craig A., Kelly N. Roeszler, and Andrew H. Sinclair. 2009. "Genetic Evidence against a Role for W-Linked Histidine Triad Nucleotide Binding Protein (HINTW) in Avian Sex

- Determination.” *International Journal of Developmental Biology* 53 (1): 59–67.
<https://doi.org/10.1387/ijdb.082742cs>.
- Smith, Craig A., and Andrew H. Sinclair. 2001. “Sex Determination in the Chicken Embryo.” *Journal of Experimental Zoology* 290 (7): 691–99. <https://doi.org/10.1002/jez.1119>.
- . 2004. “Sex Determination: Insights from the Chicken.” *BioEssays* 26 (2): 120–32.
<https://doi.org/10.1002/bies.10400>.
- Stahl, A, and N Carlon. 1973. “[Morphogenesis of the sex cords and the significance of the medullary zone of the gonad in the chick embryo].” *Acta anatomica* 85 (2): 248–74.
- Stevens, L. 1997. “Sex Chromosomes and Sex Determining Mechanisms in Birds.” *Science Progress* 80 (Pt 3): 197–216.
- Swartz, William J., and L. V. Domm. 1972. “A Study on Division of Primordial Germ Cells in the Early Chick Embryo.” *American Journal of Anatomy* 135 (1): 51–69.
<https://doi.org/10.1002/aja.1001350106>.
- Takada, Shuji, Jun Ota, Norio Kansaku, Hideji Yamashita, Tokukazu Izumi, Madoka Ishikawa, Tomoaki Wada, et al. 2006. “Nucleotide Sequence and Embryonic Expression of Quail and Duck Sox9 Genes.” *General and Comparative Endocrinology* 145 (2): 208–13.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.08.009>.
- Theodosiou, Nicole. 2006. “The Atlas of Chick Development, Second Edition.” *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 42: 281. <https://doi.org/10.1290/050601.1>.
- Theodosiou, Nicole A. 2006. “The Atlas of Chick Development, Second Edition.” *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Animal* 42 (8): 281.
<https://doi.org/10.1290/050601.1>.
- Thoraval, Pierrick, Marielle Afanassieff, Francois Loic Cosset, Frederic Lasserre, Gerard Verdier, Francoise Coudert, and Ginette Dambrine. 1995. “Germline Transmission of Exogenous Genes in Chickens Using Helper-Free Ecotropic Avian Leukosis Virus-Based Vectors.” *Transgenic Research* 4 (6): 369–77. <https://doi.org/10.1007/BF01973755>.
- Tong, Q, C E Romanini, V Exadaktylos, C Bahr, D Berckmans, H Bergoug, N Eterradosi, et al. 2013. “Embryonic Development and the Physiological Factors That Coordinate Hatching in Domestic Chickens.” *Poultry Science* 92: 620–28.
<https://doi.org/http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02509> INTRODUCTION.
- Vaillant, Severine, Mireille Dorizzi, Claude Pieau, and Noelle Richard-Mercier. 2001. “Sex Reversal and Aromatase in Chicken.” *Journal of Experimental Zoology* 290 (7): 727–40.
<https://doi.org/10.1002/jez.1123>.
- Witschi, Emil. 1935. “Origin of Asymmetry in the Reproductive System of Birds.” *American*

- Journal of Anatomy* 56 (1): 119–41. <https://doi.org/10.1002/aja.1000560107>.
- Yamamoto, I., A. Tsukada, N. Saito, and K. Shimada. 2003. “Profiles of mRNA Expression of Genes Related to Sex Differentiation of the Gonads in the Chicken Embryo.” *Poultry Science* 82 (9): 1462–67. <https://doi.org/10.1093/ps/82.9.1462>.
- Yang, Y., Ping Gong, Yan P. Feng, S. J. Li, Xiu L. Peng, Z. P. Ran, Y. G. Qian, and Y. Z. Gong. 2013. “Temporospatial Expression of Dmrt1 in Chicken Urogenital System (Gallus Gallus) Using Whole Mount in Situ Hybridization.” *Acta Biologica Hungarica* 64 (2): 161–68. <https://doi.org/10.1556/ABiol.64.2013.2.3>.
- Yoshioka, Hidefumi, Yoshiyasu Ishimaru, Noriyuki Sugiyama, Naoki Tsunekawa, Toshiaki Noce, Megumi Kasahara, and Ken Ichirou Morohashi. 2005. “Mesonephric FGF Signaling Is Associated with the Development of Sexually Indifferent Gonadal Primordium in Chick Embryos.” *Developmental Biology* 280 (1): 150–61. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.011>.
- Zhao, Yang, Heng Lu, Hongshi Yu, Hanhua Cheng, and Rongjia Zhou. 2007. “Multiple Alternative Splicing in Gonads of Chicken DMRT1.” *Development Genes and Evolution* 217 (2): 119–26. <https://doi.org/10.1007/s00427-006-0117-0>.

8. Mellékletek

HÁZITYÚK EMBRIÓK IVARSZERVÉNEK FEJLŐDÉSÉBEN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK FELTÉRKÉPEZÉSE

Mapping of the gene expression under the embryonic gonadal development in chicken

Készítette: **TÓTH ARNOLD, MATE**, Szent István Campus, Mezőgazdasági biotechnológus MSc, 2. évfolyam

Témavezető: **Tóth Roland**, Tudományos segédmunkatárs, MATE, Genetika és Biotechnológia Intézet, Szent István Campus

Madarak esetében a heterogamétás ivar a nőivar (ZW), míg a hímeknél két ugyanolyan „Z” ivari kromoszómát találunk (ZZ), pont ellentétesen, mint az emlősöknél, ahol az X – Y kromoszóma rendszerrel a hímek a heterogamétások. Ez komoly kihívás elé állítja a génmegőrzést végző kutatókat, mert amíg az emlősöknél egy egyszerű sperma mélyhűtéssel megoldható a teljes genetikai anyag hosszútávú tárolása, addig madarak esetében a tojás mélyhűtése a magas szikanyag tartalom miatt nem kivitelezhető.

Kulcsfontosságú feladat feltérképezni, az ebben a folyamatban résztvevő géneket és megérteni azok működését az embrió fejlődése során, különös tekintettel a madarakra jellemző aszimmetrikus fejlődésű gonádokra. Néhány ragadozófaj kivételével a tojók petefészke csak a bal oldalon fejlődik funkcionális ivarszervvé, miközben a jobb oldali elcsökevényesedik. Ezzel ellentétben a herék mind a két oldalon kifejlődnek, de az integrálódott ősi varsejtek számán felül, számos ivarhoz köthető gén expressziós mintázatában aszimmetria mutatkozik a két oldal között.

Munkám célja az volt, hogy feltérképezsem és összehasonlítsam az ivarszerv fejlődésben szerepet játszó gének expressziójának változását az embrionális fejlődés során. Összehasonlítottam a DMRT1 és a CYP19A1 gének expressziós mintázatát hím és nőivarú gonádokban, a bal és jobb oldali ivarszervekben 8, 10, 12 napos korban.

Az embrionális fejlődés 5. napjától a 15. napjáig naponként minimum 4 egyedtől gyűjtöttem mintákat, ügyelve arra, hogy 2 hím és 2 nőivarú egyedtől mindenképpen legyen minta. Összesen 62 állatból vettem mintát. A fejlődés 7. napja előtt az ivarszerv aszimmetrikus fejlődése még nem látható, ezért az izomszövet mintákból izolált DNS-ből, ivarmeghatározást végeztem PCR segítségével. Az izolált RNS mintákból cDNS-t írtam. A vizsgálathoz igyekeztünk úgy kiválasztani a géneket, hogy azok a kor-ivar és bal-jobb oldali ivarszervben különbözőképpen expresszáljanak. A következő génekre esett a választásunk: DMRT1, SOX9, 17βHSD, CYP19A1, ESR1, PITX2. Minden génre terveztünk primert. A primerek tesztelése után a DMRT1, CYP19A1 géneken végeztem el a qPCR analíziseket, melyeknél GAPDH háztartási gént használtam az értékek normalizálására és 10 napos nőivarú embrió baloldali ivarszervét referencia mintaként, amihez viszonyítottam a kapott eredményeket.

A kapott eredményeim alapján elmondható, hogy a kiválasztott gének expressziója a hím és nőivarban különbséget mutatott, ugyan úgy az embrionális gonádok két oldala között is eltérést találtam. A későbbiekben, további markereket is szeretnék bevonni a vizsgálatokba. Ahhoz, hogy eredményeim statisztikai kiértékelése is lehetővé váljon magasabb mintaszámmal kell majd dolgoznom a jövőben.

A vizsgálatok során kapott eredmények segítséget jelenthetnek majd az ideális recipiens kiválasztásában, mely fontos lépés az őscsírsejtre alapú őshonos házityúk génbank technológia fejlesztésében.