

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

TOKODYNÉ SZABADI NIKOLETT

GÖDÖLLŐ

2024



MAGYAR AGRÁR- ÉS ÉLETTUDOMÁNYI EGYETEM

TYÚKOK FIATALKORI HŐKEZELÉSÉNEK HATÁSÁRA
LÉTREJÖVŐ HŐSTRESSZ INDUKÁLTA MIKRORNS-EK
EXPRESSZIÓJÁNAK VIZSGÁLATA

Készítette

TOKODYNÉ SZABADI NIKOLETT

GÖDÖLLŐ

2024

A doktori iskola

megnevezése: Állattenyésztési Tudományok Doktori Iskola

tudományága: Állattenyésztés-tudományok

vezetője: Prof. Dr. Szabó András
MTA doktora, Tanszékvezető, Egyetemi tanár
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Élettani és Takarmányozástani Intézet
Élettani és Állategészségügyi Tanszék

Témavezető: Dr. Gócza Elen
MTA levelező tagja, Tudományos tanácsadó
Tanszékvezető
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Genetika és Biotechnológia Intézet
Állatbiotechnológia Tanszék

.....
Az iskolavezető jóváhagyása

.....
A témavezető jóváhagyása

Tartalomjegyzék

1. A munka előzményei, célkitűzések.....	4
2. Anyag és módszer	6
2.1. A házityúk kísérleti állomány tartása és hőkezelése.....	6
2.2. PG sejtek gyűjtése, tenyésztése	7
2.3. PG sejtek karakterizálása	7
2.4. RNS izolálás és cDNS írás.....	8
2.5. RNS szekvenálás.....	9
2.6. Real-time PCR	9
2.7. DNS izolálás	9
2.8. Teljes genom biszulfid szekvenálás és metilációs mintázat elemzés	10
2.9. Statisztikai analízis	10
3. Eredmények és azok megbeszélése	11
4. Következtetések és javaslatok.....	22
5. Új tudományos eredmények	26
6. Publikációk	27

1. A munka előzményei, célkitűzések

A baromfitenyésztés jelentősége évről évre nő az egész világon. Az ENSZ Élelmezésügyi és Mezőgazdasági Szervezet (FAO - The Food and Agriculture Organization) kimutatásai szerint a háziállatokból előállított termékek uralták a piacot 2018-ban, az éves fogyasztás elérte a 114 millió tonnát (FAOSTAT, 2023). A világon a leginkább fogyasztott állati eredetű termékek a baromfitermékek, mivel nem vonatkoznak rájuk vallási vagy kulturális korlátozások (OECD-FAO *Agricultural Outlook 2020-2029*, 2020). A leghatékonyabb állati fehérje előállítását teszi lehetővé a baromfihús és tojástermelő ágazat, amely kulcsfontosságú gazdasági szerepet tölt be a mezőgazdasági termelésben. Az egyre emelkedő mennyiségi igény minőségi változásokat eredményezett a tenyésztésben és tartástechnológiában.

Ezzel szimultán napjainkban világviszonylatban növekszik a kihalással fenyegetett és kihalt fajok száma. Ez a tény egyre inkább átalakítja az emberiség szemléletét, elfogadottá vált a biodiverzitás fenntartására való törekvés, mind a növény-, mind az állatvilágban. Ennek egyik fontos eleme a ritka gének megmentésében és megőrzésében nyilvánul meg (FAO, 2007).

A növekvő kereslet kielégítését a nagyüzemi termelés próbálja kiszolgálni, amit az éghajlatváltozás következtében megemelkedett környezeti hőmérséklet nagy mértékben nehezít (Thornton, 2010; Rojas-Downing *et al.*, 2017). A környezeti tényezők, a hőmérséklet és a páratartalom változása hatással van az állatok anyagcseréjére és a hőszabályozási mechanizmusaira. A homeosztázis fenntartása energiaigényes folyamatok összessége, amelyet a környezeti tényezők kedvezőtlen változása tovább növel, és egy határon túl az állatok elhullásához vezethet (Leinonen, Williams and Kyriazakis, 2014). Az éghajlatváltozás tehát az egyik olyan probléma, amellyel az állattenyésztési ágazatnak meg kell küzdenie a következő években. Az éghajlatváltozás okozta negatív hatások közül a hőstressz tekinthető a baromfitenyésztés legsúlyosabb környezeti stresszorának világszerte.

A kutatókat már régóta foglalkoztatja, hogy hogyan lehetne megoldani a tyúkok akklimatizálását. Napjainkban már számos mérsékelt övi területen is igen hosszúak és forrók a nyarak, ezért a hőstressz okozta károk ma már a hazai nagyüzemek esetében is jelentősek. A jövő hatékony mezőgazdaságának kialakításában nagy szerepe lesz az állatok fokozott adaptációs képességének (Nawab *et al.*, 2018). A hőstressznek jobban ellenálló, illetve arra érzékeny tyúk fajták molekuláris genetikai összehasonlító

vizsgálatára van szükség. Az adatok tükrében optimális fiatalkori hőkezelési módszert kidolgozva a magasabb környezeti hőmérsékletet is tolerálni képes állomány lenne kialakítható (Dunnington and Siegel, 1984; Loyau *et al.*, 2016).

Kutatásunkban a házityúkra, mint a baromfifélék modell állatára fókuszáltunk, ahol a hőkondicionálást követően elvégeztük a szülői állományból, illetve az utód generációból származó szövetek molekuláris biológiai elemzését. A szülői generációból nyert adatok segíthetik a kezelések hatására aktiválódó molekuláris útvonalak megismerését, míg az utód generáció ősvarsejtjeinek, és az azokból létrehozott őscsírasejt vonalaknak a genetikai elemzése információval szolgálhat a generációkon átadódó öröklődési mechanizmusokról.

Vizsgálataim során a házityúkok hőadaptációs képességének hátterében meghúzódó molekuláris folyamatok feltérképezése volt a célom. Szerettem volna megismerni olyan speciális hőkezelési eljárás hatására lezajló molekuláris mechanizmusokat, amelyek segítik a magas környezeti hőmérséklet okozta stressz következményeinek mérséklését, ezáltal javítják a kezelt baromfiállomány hőtűrő képességét.

Kutatásaim során a kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkfajta agyszöveti mintáiban megvizsgáltam a hőkezelés hatására aktiválódó védekezési mechanizmusokban szerepet játszó messengerRNS-ek (mRNS) és mikroRNS-ek (miRNS) expressziós mintázatát.

Kutatásom másik fontos eleme a primordiális csírasejtek, vagy más néven őscsírasejtek, ősvarsejtek (PGC) tanulmányozása, karakterizálása, és a létrehozott tenyészetek hosszú távú fenntartása, illetve az ehhez szükséges tenyésztési körülmények optimalizálása volt. Célom az volt, hogy a megfelelő tenyésztési paraméterek kiválasztását biotechnológiai és molekuláris biológiai vizsgálatok eredményeivel is alátámasszam, és az így kialakított tenyésztési módszerekkel segítsen a házityúk génbank hatékonyabb létrehozását, fenntartását.

Hosszú távú célom a hazai génmegőrzés segítése, ősvarsejt alapú génbank létrehozása és optimális hosszú idejű tárolása házityúk esetében.

Célul tűztem ki a szülői generáción alkalmazott hőkondicionálás hatására létrejövő változások génexpressziós elemzését, valamint ezen kezelések hatására létrejövő epigenetikai változások kimutatását, azok örökölhetőségének igazolását is.

2. Anyag és módszer

2.1. A házityúk kísérleti állomány tartása és hőkezelése

Az állatkísérletek a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ, Haszonállat-génmegőrzési Intézetében (NBGK-HGI) folytak az állatok védelméről és kíméletéről szóló 1998. évi XXVIII. törvénynek megfelelően, amihez a Nemzeti Élelmiszerlánc-biztonsági Hivatal Állategészségügyi és Állatvédelmi Igazgatósága engedélyt (engedélyszám: PE/EA197-4/2016) adott.

A hőkondicionálási kísérlethez a kikelés utáni első 24 órában a csibéket (n=60) infravörös lámpa alatt (32°C-on) nedvszívó papíralmon tartották (Tóth *et al.*, 2021). A kikelést követő második napon a csibék felét (n=30) visszahelyezték a keltetőgépbe hőkondicionálás céljából. A hőmérsékletet 38,5°C-ra, a páratartalmat pedig 60%-ra állították be 12 órán keresztül. A kezelést követően a csirkéken nyaki diszlokációt végeztek, majd közösen megkezdtük a szöveti mintagyűjtést a kontroll (K-C, n=15) és a hőkondicionált csibék (HK-C, n=15) feléből. A kontroll és a kezelt csoportban az állatok másik felét (K-F, n=15 és HK-F, n=15) ivarérett korig (23 hetes korig) csoportonként egy légtérben, faforgács és zeolit keverék almon, 16 órás világítás mellett nevelték tovább. Az ivóvíz és a takarmány a teljes kísérlet során *ad libitum* elérhető volt az állatok számára. A mintavételhez a felnőtt egyedeken nyaki diszlokációt alkalmaztak (K-F, n=9 és HK-F, n=12), az agytörzs és köztiagyi részt kivágtuk és RNAlater™ oldatot (Thermo Fisher Scientific, 145 Waltham, MA, USA) tartalmazó steril fagyasztó csövekbe (Tokodyné Szabadi *et al.*, 2024) helyeztük. A mintákat két nap elteltével TRIzol®-ba (#15596026, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) helyeztem át, majd -70°C-on tároltuk RNS izolálásig.

A hőstressz következtében aktiválódó molekuláris útvonalak tanulmányozásához tartozó állatkísérleteket is az NBGK-HGI munkatársaival közösen végeztem. A kikelés utáni első 24 órában a csibéket infravörös lámpa alá helyezték 32°C-on nedvszívó papíralmon. Ezután a 2 napos fiókák harmadát visszahelyezték a keltetőgépbe hőkezelésre. A hőmérsékletet 38,5°C-ra, a páratartalmat pedig 60%-ra állították be 12 órán keresztül. A többi csibét mélyalmon, *ad libitum* takarmányozás mellett, 32°C-on tartották. Ezután a hőkondicionált és kezelést nem kapott állatokat azonos körülmények között nevelték. Ivarérést követően (23 hetesen) a hőkondicionált csoport (*heat treatment and heat stressed* – HTHS) és a kezelést nem kapott állatok

felét (*heat stressed* - HS) hőstresszelték, 30°C-on való tartással 12 hétig, egy légtérben, faforgács és zeolit keverék almon, 16 órás világítás mellett, a takarmány és víz *ad libitum* elérhető volt. Azok az állatok, amelyek nem kaptak sem hő-kondicionálást sem hőstresszt, azokat tekintették kontroll (K) csoportnak. Az utód generáció vizsgálatához a megtermékenyített tojásokat a három csoportba sorolt házityúkoktól gyűjtötték.

2.2. PG sejtek gyűjtése, tenyésztése

A kendermagos és fekete erdélyi kopasznyakú tyúkok utód generációinak embrióiból alapított sejttenyészeteket Lázár Bence kollégám alapította, majd a sikeresen felszaporított vonalakat génbankban helyezte el. A kiindulás a hőkezelési kísérletben részt vett kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkok tojásai voltak (47 db), amelyekből 26 primordiális ivarsejtvonalat sikerült létrehozni.

Lehetőségem volt ezeknek a mélyhűtött sejttenyészeteknek a felolvasztására, majd továbbtenyésztésére és azok vizsgálatára.

2.3. PG sejtek karakterizálása

Proliferációs teszt *ImageXpress Micro XLS*-sel

A házityúk PGC vonalak sejtszámlálását a sejtproliferációs vizsgálat elkészítése előtt végeztem *Arthur™ Novel Fluorescence Cell Counter* (NanoEnTek, Pleasanton, CA, USA) készülék segítségével. A mérés során négy fekete erdélyi kopasznyakú tyúk eredetű vonallal (két hímivarú M1: #508-ZZ; M2: #512-ZZ és két női ivarú F1: #509-ZW; F2: #513-ZW) dolgoztam, ahol háromféle kezelést (**K** - kontroll; **5P** - gga-miR-302b-5P gátlás; **3P** - gga-miR-302b-3P gátlás; **5P/3P** - gga-miR-302b-5P és gga-miR-302b-3P gátlás) és egy kontrollt alkalmaztam és minden esetet 6-6 párhuzamos lyukon vizsgáltam (Lázár *et al.*, 2021).

A lemezt egy beépített inkubátorral rendelkező *ImageXpress Micro XLS* készülékbe helyeztem és annak *High-Content Screening* képalkotó rendszere végezte a mérést lyukanként (A01-H12), minden lyuk 16 (S1-16) régiójában, 4 óránként 3 napon keresztül készített felvételekkel végeztem az adatok kiértékelését. Például a harmadik napon a proliferációs rátát úgy számítottam ki, hogy a harmadik napon megszámlált átlagos sejtszámot (h76) elosztottam a második napon (h52) mért értékkel. Összehasonlítottam a kontroll és a kezelt vonalak proliferációs rátáját az első

napon (28 óra/4 óra), a második napon (52 óra/28 óra) és a harmadik napon (76 óra/52 óra).

Immunfestés

A kendermagos és fekete erdélyi kopasznyakú tyúk eredetű sejtvonalakon elsődleges és másodlagos ellenanyaggal immunfestést végeztem. A fixálást követően az elsődleges ellenanyagokat (SSEA-1, CVH, DAZL, P63) különböző kombinációban alkalmaztam. A következő napon 0,01%-os BSA-PBS-el lemostam az elsődleges ellenanyagokat, majd rámértem a másodlagos ellenanyagokat (anti-egér(m)-IgM-D549(r), anti-nyúl(rab)-IgG-A488) (minden esetben hagytam egy-egy negatív kontrollt). Egy órával az első mosást követően (0,01% BSA-PBS, RT, 5 perc) mindkét vonal minden cseppjére To-Pro-3 sejtmagfestéket vittem fel. A lemezeket lefedtem és sötétben tároltam a Leica konfokális (TCS SP8) mikroszkóppal történő fotózásig.

2.4. RNS izolálás és cDNS írás

Az RNS izolálása a hőkondicionálási kísérletben a kontroll és hőkezelt csibék, illetve a kontroll és hőkezelt ivarérett kakasok és tyúkok agyszövetéből történt. A *TRIzol*®-ba (#15596026, *Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA*) legyűjtött mintákat felolvasztottam, majd homogenizáltam. Az izolálást a *TRIzol*® gyártói protokolljának megfelelően végeztem el. A folyamat eredményeként kapott RNS-ek koncentrációját *NanoDrop (ND-1000, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, UV-Vis)* spektrofotométerrel ellenőriztem.

A PGC vonalak karakterizálásához, illetve a hőstressz hatásának tanulmányozásához az RNS izolálása a három kezelési csoportból HTHS, HS és C származó kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkok 2,5 napos tojásaiban fejlődő, HH14-16-os fejlettségi állapotú embriókból létrehozott PGC tenyészetek sejteiből történt. A lízis pufferben gyűjtött PGC mintákat tartalmazó fagyasztó csöveket 90 másodpercre 37°C-os vízfürdőbe téve felolvasztottam, majd a PG-sejtekből *RNAqueous™ Total RNA Isolation Kittel*, a protokoll alapján elvégeztem az RNS izolálást. Az izolálás során kapott RNS koncentrációját szintén *NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific, UV-Vis)* spektrofotométerrel mértem.

A qPCR vizsgálatokhoz az RNS-ből reverz transzkripcióval cDNS-t szintetizáltam. A reakcióhoz az RNS mennyiségét a spektrofotométerrel mért értékek

alapján 25 ng/μl koncentrációra hígítottam. A cDNS íráshoz *High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit*-et (*Life Technologies, Carlsbad, CA*) használtam.

2.5. RNS szekvenálás

Az RNS szekvenálást Bertrand Pain (*Stem-Cell and Brain Research Institute, USC1361 INRA, U1208 INSERM, 69675 Bron, France*) és kutatócsoportja végezte a kezelési csoportonként összeállított RNS pool mintáinkból (C, HS, HTHS).

2.6. Real-time PCR

A hőkezelés hatására indukálódó markerek expressziós mintázat változásának nyomon követését real-time PCR (qPCR) technika segítségével végeztem. A qPCR-hoz 96 lyukú lemezt használtam, a reakciót *Mastercycler Realplex⁴ epGradient S* (*Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany*) készülékben végeztem (Tóth *et al.*, 2021). Az mRNA expressziók vizsgálatához az előzőleg elkészített cDNS oldatokból 0,75μl-t, a SYBR Green festéket és a primereket tartalmazó qPCR mixből 14,25μl-t mértem be lyukanként. Minden minta/primer esetben 3 párhuzamos mérést végeztem. Míg a miRNS-ek esetében speciális *TaqMan* próbákat alkalmaztam, ahol szintén a cDNS oldatokat használtam, amelyekből 1μl-t, a *TaqMan master mix*et és a primereket tartalmazó qPCR mixből 14μl-t mértem össze. Minden minta/primer esetben 3 párhuzamos mérést végeztem. Belső kontrollként (háztartási génként) *GAPDH*-t alkalmaztam, illetve a vizsgálandó markerek esetében a szakirodalomban is leírt primer párokat (*HSP70, HSP90, HSF1, HSF2, HSF3, HSF4, miR-92-3P, miR-138-5P*) használtam (Kisliouk, Yosefi and Meiri, 2011; Xie *et al.*, 2014).

2.7. DNS izolálás

A DNS izolálása a három kezelési csoportból HTHS, HS és K származó tyúkok 2,5 napos tojásaiban fejlődő, HH14-16-os fejlettségi állapotú embriókból létrehozott PGC tenyészetek sejtjeiből történt. Sejtpelletből végeztem a DNS izolálást, amit a *DNA Isolation Kit for Cells and Tissues* (*Roche® Life Science Products*) kittel végeztem a hozzá tartozó protokoll alapján. Az izolálás során kapott DNS minták koncentrációját *NanoDrop (ND-1000, Thermo Scientific, UV-Vis)* spektrofotométerrel mértem.

2.8. Teljes genom biszulfít szekvenálás és metilációs mintázat elemzés

A sejtvonalakból kapott DNS minták metilációs mintázatának feltérképezése céljából végzett teljes genom biszulfít szekvenálást az *UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft.* (Debrecen) szolgáltatta. A teljes genom biszulfít szekvenálás a nem-metilált citozin bázisok timinné konvertálásán alapul. A kapott DNS metilációs adatok elemzését Dr. Likó István (*UD-GenoMed Medical Genomic Technologies Kft.*) végezte a kezelési csoportonként (HS, HTHS) összeállított ivari (ZW – női, ZZ – hímivarú) pool DNS mintákból (HS-ZW, HTHS-ZW, HS-ZZ, HTHS-ZZ).

2.9. Statisztikai analízis

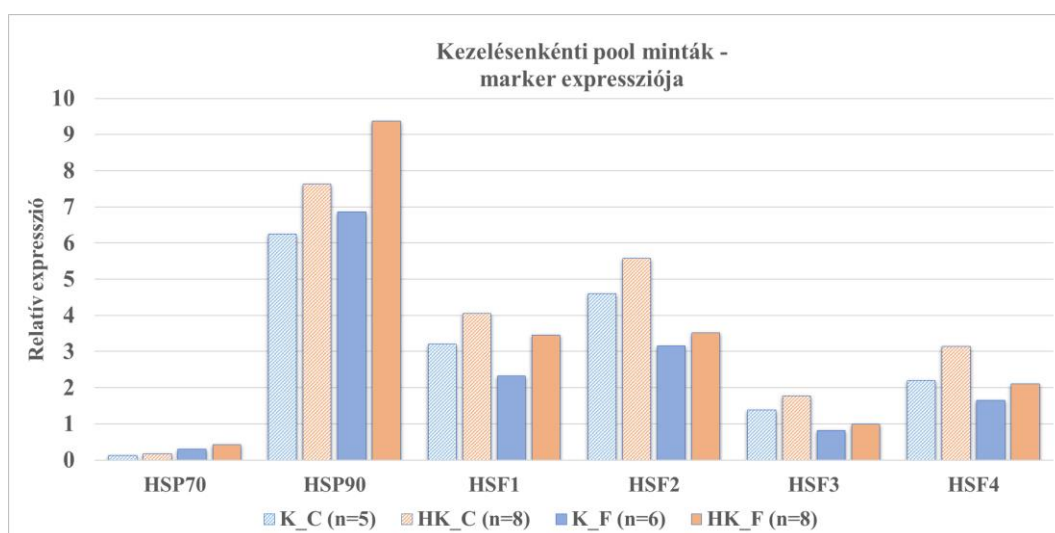
A célgén expresszióját, vagy represszióját a belső kontrollgénhez viszonyítva minden mintában *GenEx 7.0* program (*MultiD Company*) segítségével számítottam ki a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszer használatával (Rao és mtsai., 2013). Belső kontrollnak a konstitutívan expresszáldó *GAPDH* (NM204305.1) gén expresszióját mértem az 5'-AGCAATGCTTCCTGCACTAC-3' / 5'-CTGTCTTCTGTGTGGCTGTG-3' primer-pár alkalmazásával. A Ct küszöbértéket (*threshold cycle*) manuálisan határoztam meg. Minden cDNS reakció ΔCt értékeit a $(Ct_{\text{célgén}} - Ct_{\text{belső kontroll}})$ képlet alapján normalizáltam, majd a ΔCt értékek átlagait (átl. $\Delta Ct_{\text{gén}}$) határoztam meg. A $\Delta\Delta Ct$ értékek meghatározása során a kezelt minták (átl. $\Delta Ct_{\text{gén-kezelt}}$) értékeit a kezeletlen kontrollhoz (átl. $\Delta Ct_{\text{gén-kezeletlen}}$) normalizáltam (átl. $\Delta Ct_{\text{gén-kezelt}} - \text{átl. } \Delta Ct_{\text{gén-kezeletlen}}$).

Az adatok kiértékelését *GenEx 7.0* szoftver segítségével végeztem. ANOVA analízist követően Tukey-féle post hoc eljárást alkalmazva azonosítottam, hogy mely csoportok átlagai közötti eltérés szignifikáns, ahol a $p < 0,05$ értékeket vettem szignifikánsnak ($*p < 0,05$).

3. Eredmények és azok megbeszélése

Szülői generáció molekuláris biológiai vizsgálata

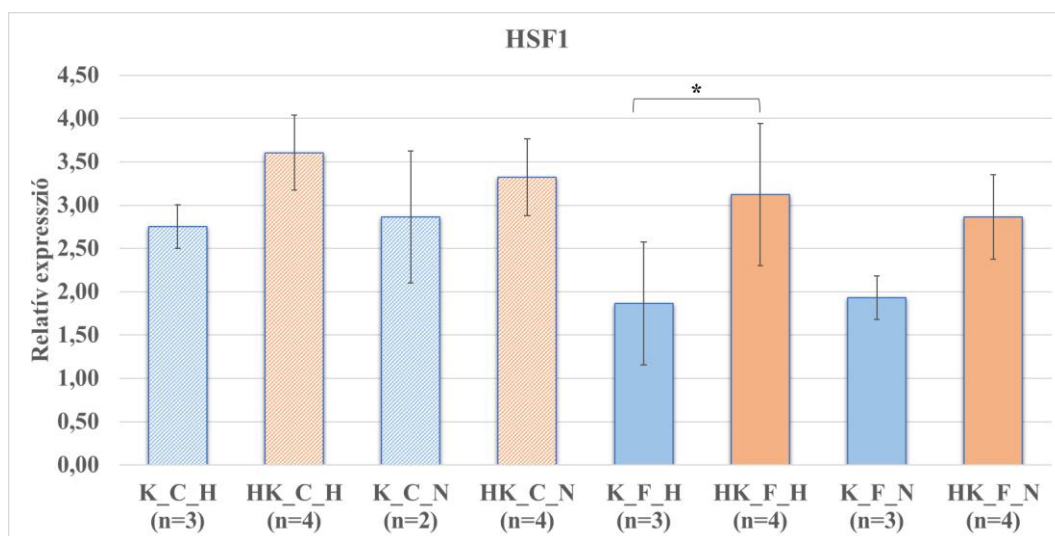
A qPCR vizsgálatokat kezelésenkénti (K-kontroll; HK-hőkoncionált) pool mintákkal (1. ábra), illetve egyedi házityúk agyszövetmintákkal végeztem, amelyeket kezelésenként (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) ábrázoltam csibe (C), illetve ivarérett/felnőtt (F) korban. Minden marker expressziója (*HSP70*, *HSP90*, *HSF1*, *HSF2*, *HSF3* és *HSF4*) esetében emelkedést tapasztaltam a kezelt csoportokban (HK-C; HK-F) a kontrollhoz képest. A *HSF1* expressziójának emelkedése az ivarérett hímek agyszövetében szignifikáns volt ($p = 0,0478$) (2. ábra) a hőkoncionálás hatására (Tokodyné Szabadi *et al.*, 2024).



1. ábra: Kezelésenként poolozott (K-kontroll; HK-hőkoncionált) csibe (C) és ivarérett/felnőtt (F) házityúkok agyszövetmintáiban mért hősokkfehérjék és hősokkfaktorok génexpressziós szintjei.

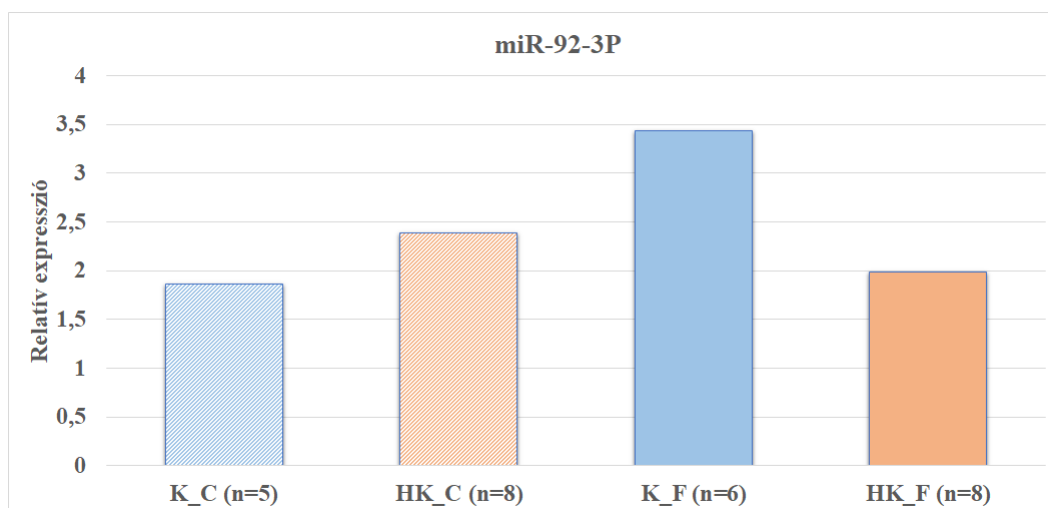
Megállapítottam, hogy a hősokkfehérjék (*HSP70*, *HSP90*) és hősokkfaktorok (*HSF1*, *HSF2*, *HSF3* és *HSF4*) expressziója kimutatható a kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúkok és kakasok agyszövet mintáiban. Az általunk alkalmazott hőkoncionálás okozta a génexpressziós szintemelkedést minden hősokkfehérje és hősokkfaktor esetében fiatal és felnőtt korban egyaránt. A *HSF1* expressziójának fokozódásához a hőmérséklet különbség járul hozzá, amihez egy bizonyos termikus küszöbértékre van szükség, azonban ennek pontos értéke még nem tisztázott (Tanabe *et al.*, 1997). Mivel akut hőkezelés esetén a HSF-ek kifejeződésének gyors emelkedése figyelhető meg, úgy gondolják, hogy a HSF-ek nélkülözhetetlenek lehetnek a HSP-k

gyors transzkripciójához (Xie *et al.*, 2014). Eredményeim a szakirodalmi adatokkal összhangban igazolják, hogy az előzetes hőkondicionálás befolyásolja a hőstresszel kapcsolt markerek kifejeződését.

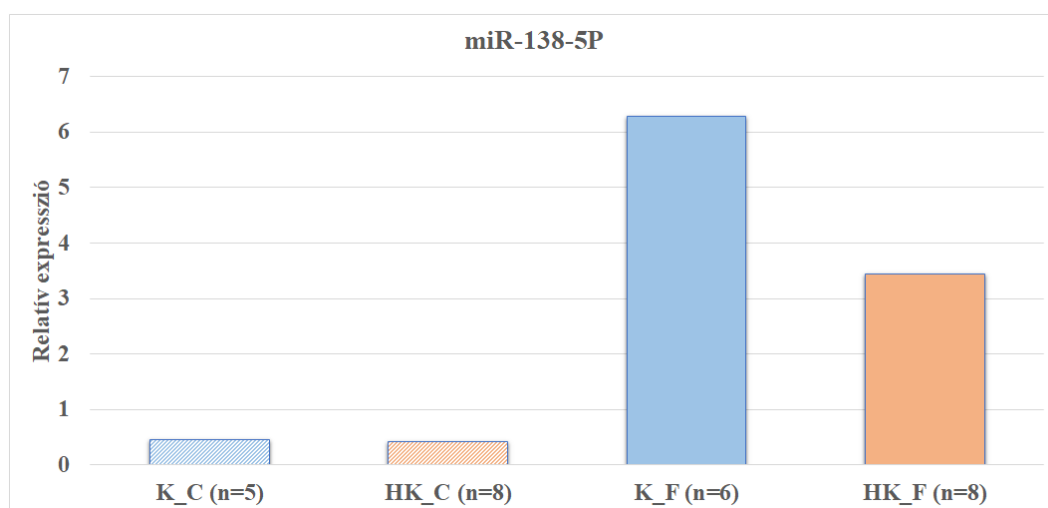


2. ábra: A *HSF1* marker expressziója az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H-hímivarú; N-nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén, ahol a $p < 0,05$ értékeket vettem szignifikánsnak (* $p < 0,05$).

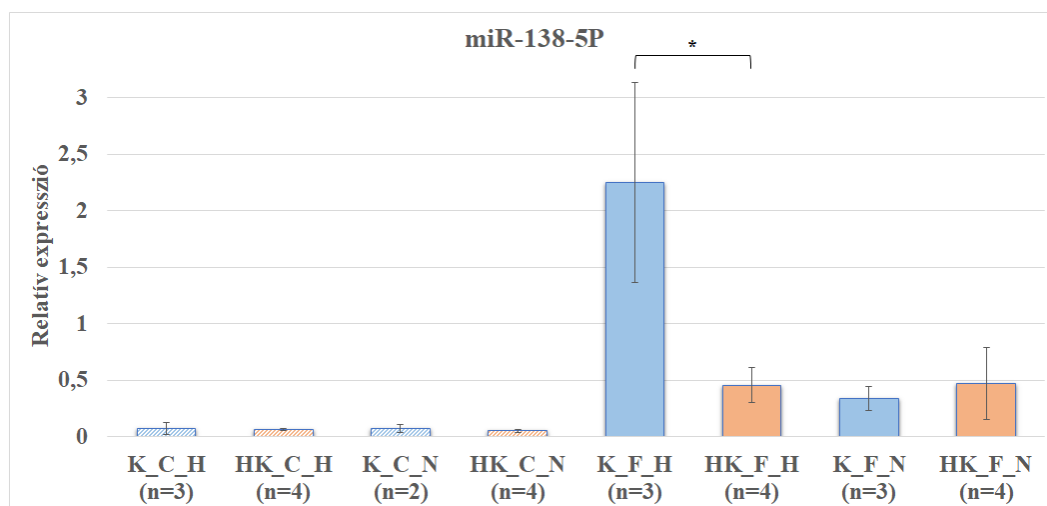
Megvizsgáltam két hőstresszel kapcsolt mikroRNS (miRNS) (miR-92-3P, miR-138-5P) expressziós mintázatát is, kezelt (HK) és nem kezelt (K) csibe (C) és ivarérett/felnőtt (F) házityúk agyszövetében. A miR-92-3P és a miR-138-5P csökkent expressziója figyelhető meg az ivarérett korú hőkondicionált csoportokban a kontrollokhoz viszonyítva (3, 4. ábra). Ahhoz, hogy megtudjam, hogy ezek a különbségek szignifikánsak-e, elvégeztem az analízist ivar szerint poolozott egyedi RNS mintákból is. Ezt követően azt találtam, hogy a miR-138-5P expresszió csak az ivarérett kakasok esetén mutatott szignifikánsan alacsonyabb ($p = 0,0043$) szintet a hőkondicionált egyedekénél (HK-F-H), a kontrollhoz (K-F-H) képest (5. ábra). Az egyedi RNS mintákból készített mérési eredmények jól átfednek a pool RNS mintákkal kapott eredményekkel (Tokodyné Szabadi *et al.*, 2024).



3. ábra. Kezelésként poolozott (K-kontroll; HK-hőkondicionált) csibe (C) és ivarérett/felnőtt (F) házityúkok agyszövetmintáiban mért miR-92-3P marker expressziója.



4. ábra. Kezelésként poolozott (K-kontroll; HK-hőkondicionált) csibe (C) és ivarérett/felnőtt (F) házityúkok agyszövetmintáiban mért miR-138-5P marker expressziója.



5. ábra: A miR-138-5P marker expressziójának értékei az egyedi mintákban, amelyek kezelés (K; HK) és ivar szerint (H–hímivarú; N–nőivarú) lettek ábrázolva a csibe és ivarérett korú állatok esetén, ahol a $p < 0.05$ értékeket vettem szignifikánsnak (* $p < 0.05$).

Házityúkban a miR-138-5P fő funkciója a testhő szabályozásért felelős jelátviteli útvonal szabályozása. Szakirodalmi adatok alapján a miR-138-5P szerepe a hipotalamikus neurogenesis szabályozásában (Kisliouk, Cramer and Meiri, 2014) alapvető, ugyanis a miR-138-5P kötődik a Reelin (RELN) 3'UTR régiójához, ennek következtében gátolja a RELN expresszióját, ami elősegíti a neuronális sejt vándorlást. Ez a megállapítás magyarázattal szolgál a hőkezelés elvégzésének időzítésére is, mivel madarak esetében fiatal korban még aktív a neuroplaszticitás (Kisliouk, Cramer and Meiri, 2014). A kutatócsoportunk által alkalmazott hőkondicionálás mellett ki tudtam mutatni a miR-138-5P expressziót a kontroll állatok agyszövetében, amely ivarérett korban szignifikánsan magasabb (hímivarban $p = 0.00000016$, nőivarban $p = 0.0186$) a csibéhez képest. Az általam vizsgált miRNS-ek expressziós szintje a hőkondicionálás hatására csökken ivarérett korban, ami igazolja a csibe korú hőkondicionálás hatásosságát.

Utód generáció molekuláris biológiai vizsgálata

A mikroRNS gátlás hatása PGC-kben

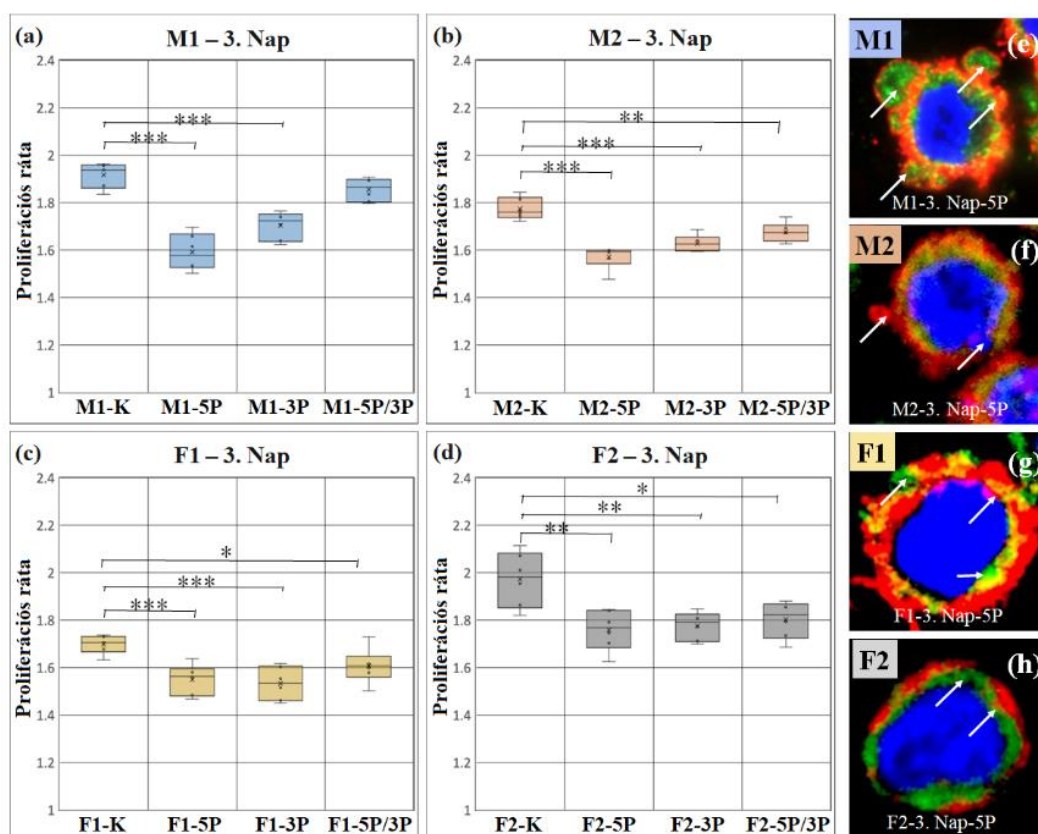
Ebben a vizsgálatban a sejtvonal karakterizáláshoz fekete erdélyi kopasznyakú tyúkfajta két hímivarú (M1: #508-ZZ; M2: #512-ZZ) és két nőivarú (F1: #509-ZW; F2: #513-ZW) PG-sejtvonalát használtam. Ezeknek a sejtvonalaknak a sejt számát három napon keresztül 4 óránként mérte egy beépített inkubátorral ellátott XLS készülék, *Imaging* rendszerrel. Meg szerettem volna vizsgálni a PGC-k proliferációs

sebességét az 1., 2. és 3. napon a gga-miR-302b-5P (**5P**) vagy gga-miR-302b-3P (**3P**) gátlása után, illetve anti- gga-miR-302b-5P és anti-gga-miR-302b-3P inhibitorok együttes (**5P/3P** gátlás) alkalmazását követően.

Eredményeim alapján megállapítható, hogy a kísérlet harmadik napján az 5P-vel és 3P-vel való gátlás minden sejtvonal esetében drasztikusan csökkentette a proliferációs rátát a kontrollhoz képest, azonban a gátlás időskálája eltérő volt ezekben a sejtvonalakban. Tehát a 6. ábra a proliferációs ráták összehasonlítását mutatja a 3. napon. Látható, hogy a kontroll minták szignifikánsan nagyobb proliferációt mutattak az M2, F1, F2 esetében (6. ábra, b, c, d) a kezelt mintákhoz képest. Az M1 PGC-k nem mutattak különbséget a kontrollhoz képest az 5P/3P gátlás után (6. ábra, a) (Lázár *et al.*, 2021).

A három napos tenyésztést követően fixáltam a vonalakat és immunfestést végeztem, ami azt is mutatja, hogy a különböző kombinációban gátolt vonalokban membrándifferenciálódás jelentkezett, amik a festés alapján csak citoplazmát tartalmaznak, tehát ezek citoplazma hólyagosodások, nukleáris degradáció nem volt megfigyelhető. A legtöbb hólyagos sejt az 5P gátlás kezelésnél jelentkezett (6. ábra, e, f, g, h) (Lázár *et al.*, 2021).

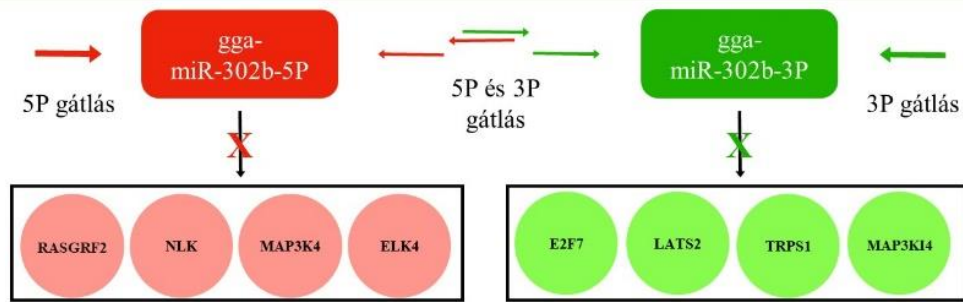
Kutatócsoportunk korábbi vizsgálataiban beszámolt arról, hogy a gga-miR-302b-5P magasabb expressziót mutatott a gga-miR-302b-3P-hez képest a magasabb proliferációs rátával rendelkező sejtek esetében (Lázár *et al.*, 2018). Erre az információra alapozva folytattam munkámat, amiben azt találtam, hogy a miR-302b-5P kar gátlása szignifikánsan csökkentette a proliferációt, ami a miR-302b-5P szerepére utal a sejtproliferációban. A gga-miR-302b-5P-vel gátolt sejtek esetében az apoptotikus sejtek aránya alacsonyabb volt, mint a kettős gátlást kapó sejtek esetében ez tapasztalható volt (Lázár *et al.*, 2021).



6. ábra: Az M1 (a), M2 (b) (ZZ genotípus) és F1 (c), F2 (d) (ZW genotípus) PGC-vonalak proliferációs sebességének összehasonlítása a 3. napon. Az immunfestést SSEA1-gyel (piros), CVH-val (zöld) és TO-PRO™-3 magfestéssel (kék) végeztem. A nyilak a sejtfelszínen lévő hólyagokat mutatják.

Ez az eredmény összhangban van korábbi szakirodalmi adatokkal (Wu *et al.*, 2019), ahol a miR-302b-5P proliferációs promoterként és oncomiRként működött. A miR-302b-5P gátlása csökkentette a proliferációs rátát és mérsékelte az apoptotikus sejtek arányát. Ez igazolja a miR-302b-5P miRNS szerepét a PGC-k *in vitro* és *in vivo* proliferációjának szabályozásában. Összeségében eredményeim megerősítették a proliferációs ráta csökkenését a gga-miR-302b-5P és gga-miR-302b-3P gátlása után (7. ábra).

A gga-miR-302b-5P/3P gátlás hatása házityúk PGC-ben



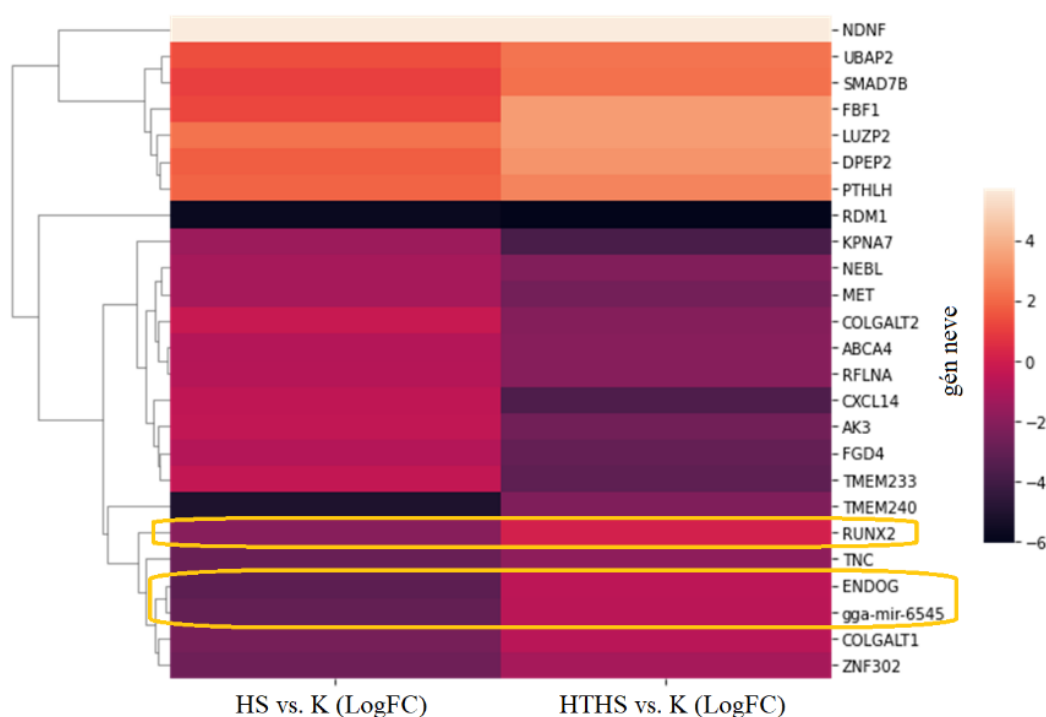
	kontroll	5P gátlás	3P gátlás	5P/3P gátlás
Sejt proliferációs ráta	++++	+	++	+++
Apoptotikus ráta	++	+	++	++++
Sejtmembrán elváltozások	+	++++	++	+++

7. ábra: A gga-miR-302b-5P és gga-miR-302b-3P legrelevánsabb célgénjei, korábban közölt adatok alapján (Cataldo és mtsai., 2016; Lázár és mtsai., 2018; Sun és mtsai., 2015).

Hőkezelt házityúkok embrióiból alapított PGC-k molekuláris diagnosztikai felhasználása a jelátviteli útvonalak feltárásához

A kutatócsoportunk által alapított kendermagos erdélyi kopasznyakú tyúk eredetű PGC-vonalakat kutatásomban molekuláris diagnosztikai vizsgálatokhoz használtam fel. A PGC-kból származó RNS mintákat kezelési csoportonként pooloztam, majd megszekvenáltattuk. Az eredményeket összegző *heat map* ábra az RNS szekvenálással detektált, stresszválaszban megváltozott expressziójú géneket tartalmazza. Ahol a bal oldali oszlop a hőstresszelt csoportból (HS) származó PGC mintákban mért expressziós értékeket színintenzitással jelzi a kontroll (K) értékekhez viszonyítva, míg a jobb oldali oszlop a hőkondicionált és hőstresszelt csoportból (HTHS) létrehozott PGC minták adatait szintén a kontrollhoz (K) viszonyítva. A világos szín az adott gén esetében kimutatott expressziós szint növekedését, a sötét szín az expressziós szint csökkenését jelzi (8. ábra). RNS szekvenálással több olyan gén esetében is kaptunk expressziós szintváltozást, amelyek a szakirodalmi adatok alapján (Tavares *et al.*, 2018) is fontos szerepet játszanak a hőstressz során aktiválódó molekuláris folyamatokban. A miR-6545, a *RUNX2* és *ENDOG*, amelyek eltérő mértékben expresszálódnak a hőkondicionált, majd hőstresszelt házityúkok, illetve

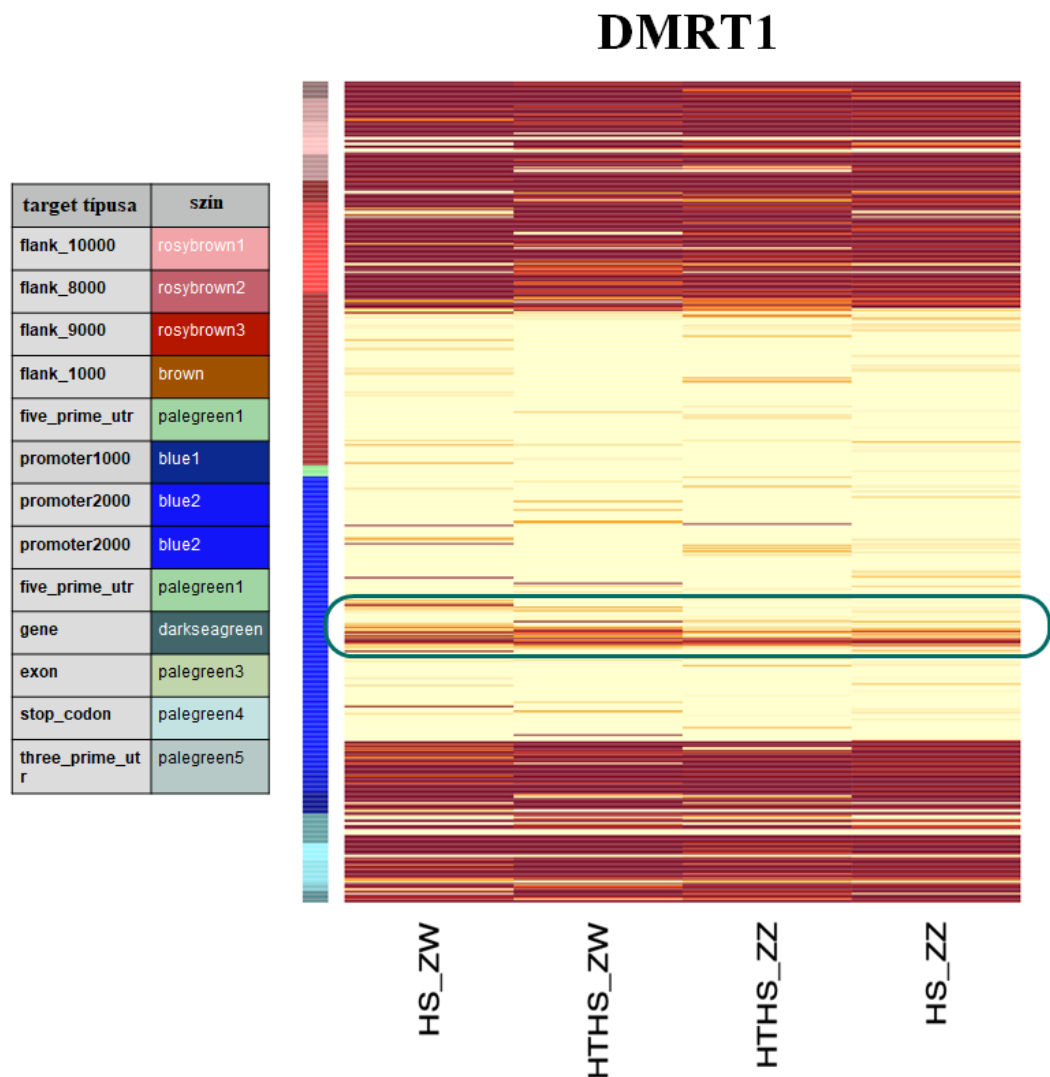
csak hőstresszelt állatok embrióiból származó PG-sejttenyészetekben. Elmondható, hogy a kutatócsoportunk által alkalmazott hőhatás, illetve hőhatások változtatták meg a génexpressziós mintázatot.



8. ábra: RNS szekvenálási adatok *heat map* ábrája.

A PGC-kból származó DNS mintákat kezelési csoportonként és ivarok szerint pooloztam, majd elküldtük teljes genom biszulfid metilációs szekvenálás analízisre (WGBS).

Az RNS szekvenálás alapján a miR-6545 expresszióját befolyásolja a hőkondicionálás. A miR-6545-nek target helye van a *DMRT1* génen (Prastowo and Ratriyanto, 2021), tehát jelenléte vagy hiánya hatással van ezen gén kifejeződésére. Ezek alapján megvizsgáltam a *DMRT1* gén genomi régiójának metilációs mintázatát. A *heat map* ábrán a *DMRT1* metilációs mintázata kezelésként és ivar szerinti poolok esetében vannak feltüntetve, ahol a vörös részek erősen metiláltak, míg a sárga régiókon aktív a génátírás. Jól látható, hogy különbség van a metilezettség mértékében a gén promóter régiójában, a hímivarnál kétszeres a génexpresszió a nőivarúakkal szemben, amit a gén lokalizációja is megerősít, mivel a *DMRT1* gén a Z ivari kromoszómán található. Valamint a HTHS csoportban alacsonyabb a metilezettség a HS csoportokhoz képest, tehát a HTHS csoportban magasabb a *DMRT1* gén expressziója (9. ábra).



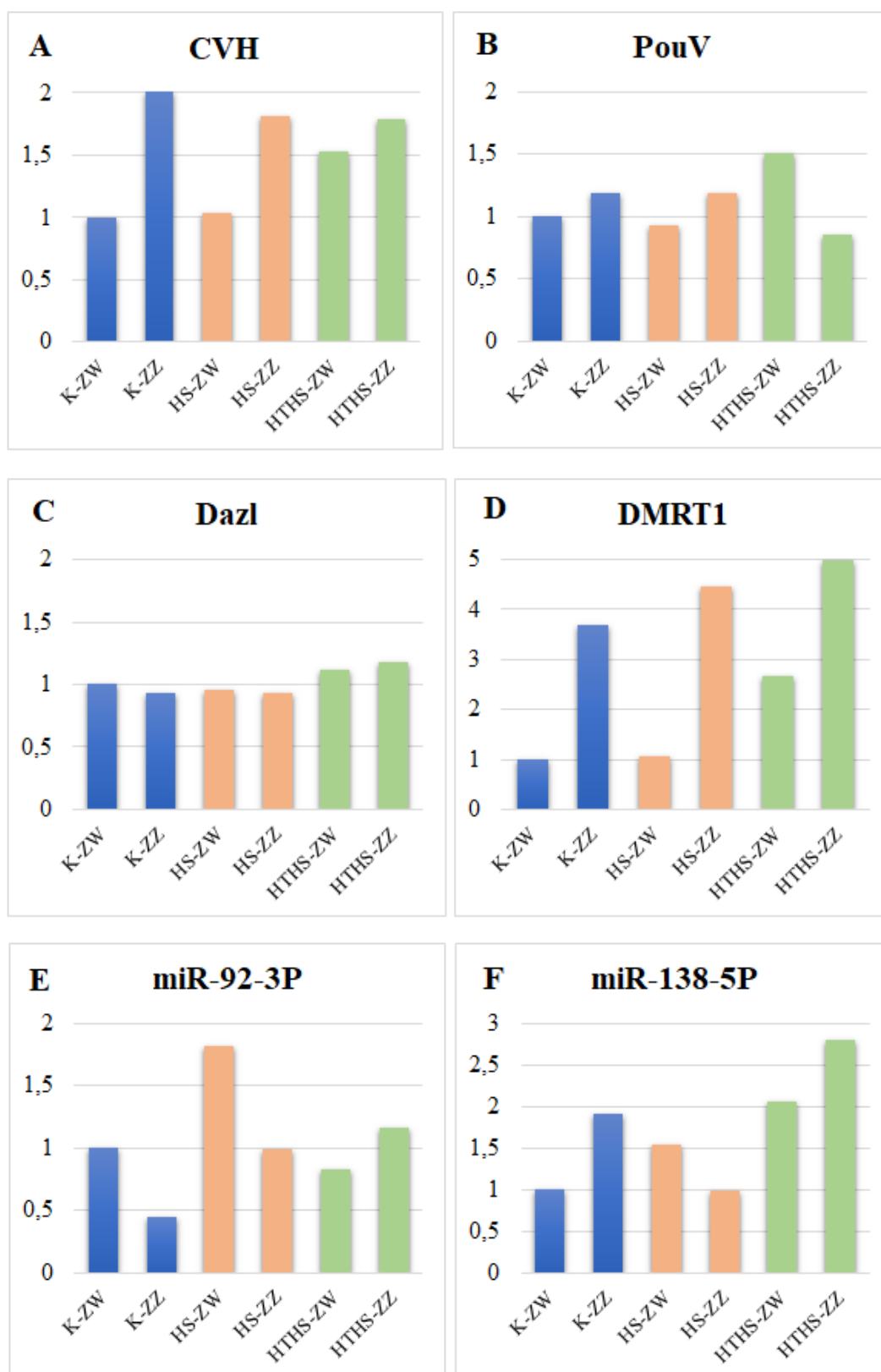
9. ábra: A WGBS analízis során kapott metilációs mintázat a *DMRT1* genomi régióin, a kezelési csoportokban (HS, HTHS) ivarok szerint (ZW, ZZ).

Az, hogy az utódokban megjelenő genetikai változások ténylegesen epigenetikai öröklődés eredménye, további molekuláris biotechnológiai módszerekkel való megerősítést tett szükségessé. Ennélfogva megvizsgáltam számos fejlődés-specifikus (miR-92-3P, miR-6545, *DMRT1*) és hőstresszel kapcsolt (miR-138-5P) marker metilációs mintázatát a kísérletben részt vett házityúk utód generációjából alapított PGC-tenyészetek DNS mintáinak teljes genom biszulfid metilációs szekvenálással kapott adatokban. Több gén esetében is eltérést találtam a CpG metilációs mintázatban (miR-92-3P, miR-138-5P, miR-6545, *DMRT1*), amelyekről már vannak szakirodalmi adatok, hogy szerepet játszanak az embrionális fejlődést szabályzó folyamatokban és a hőstressz által aktivált molekuláris jelátviteli útvonalakban (Tavares *et al.*, 2018). Mások a miRNS-ek és mRNS targeteik kapcsolatát írták le adatbázis elemzéseket követően, és azt találták, hogy számos miRNS-nek target helye van a házityúk *DMRT1*

gében (Dunislawska *et al.*, 2021; Prastowo and Ratriyanto, 2021). Ebből a listából a mi kísérleti mintáinkban a miR-92-3P, a miR-138-5P és miR-6545 esetében találtunk metilációs mintázatbeli változást.

Az RNS szekvenálás és WGBS eredményeit qPCR elemzésekkel és szakirodalomban leírt adatokkal is megerősítettem, ami alapján elmondható, hogy a miR-6545 befolyásolja a *DMRT1* kifejeződését, míg a miR-138-5P jelenléte hatással van a *RUNX2* expressziójára (Kisliouk, Yosefi and Meiri, 2011; Tavares *et al.*, 2018; Prastowo and Ratriyanto, 2021).

Megvizsgáltam ivarsejt-specifikus (*CVH*, *PouV*, *Dazl*) markerek, illetve hőstresszel kapcsolt (miR-92-3P, miR-138-5P, *DMRT1*) markerek expressziós mintázatát a kísérletben részt vett házityúkok utód generációjából alapított PGC-tenyészetekben. A *CVH* (10. ábra, A) és *PouV* (10. ábra, B) markerek expressziója ivari különbséget mutatott, míg a *Dazl* (10. ábra, C) egyenletes kifejeződését találtam minden csoportban, mindkét nemből. A hőhatás által befolyásolt gének közül a miR-92-3P, miR-138-5P és a *DMRT1* (10. ábra, D, E, F) esetében expressziós szintváltozást találtam. Ezen expressziós szintváltozások szignifikáns eltérésének megerősítésére további vizsgálatokra van szükség.



10. ábra: A hőkezelési kísérletben részt vett házityúkok utód generációjából alapított PGC-tenyészetekben vizsgált ivarsejt-specifikus markerek (a) *CVH*, (b) *PouV*, (c) *Dazl*, illetve hőstresszel kapcsolt (d) *DMRT1*, (e) *miR-92-3P* és (f) *miR-138-5P* markerek expressziós mintázatát összefoglaló oszlop diagrammok.

4. Következtetések és javaslatok

A baromfihús fogyasztása évről-évre a globális húsfogyasztás egyre nagyobb hányadát teszi ki. A megnövekedett piaci igények kielégítése céljából, egyre gyorsabban növekedő és nagyobb húshozamú fajták kerülnek a piacra. Ezzel párhuzamosan az új fajták globális klímaváltozás következtében a megemelkedett környezeti hőmérséklettel szembeni ellenállósága drasztikusan lecsökkent. A magas környezeti hőmérséklet esetében a húsminőség romlik, termékenység és tojásmennyiség csökkenése, illetve az állomány elhullása következhet be, ami egyre súlyosabb veszteségeket generál a baromfiágazatban. A hőstresszről szóló szakirodalom jelentősebb része a közvetett védekezési stratégiákra összpontosít, a tartástechnológia optimalizálása és táplálékkiegészítők alkalmazásának hatásait elemzik (Benton *et al.*, 1998; Daghir, 2009; Varasteh *et al.*, 2015).

A közelmúltban újabb módszerek is előtérbe kerültek, ideértve a baromfifajták genetikai marker alapú kiválasztását. A molekuláris technikák használata a baromfitenyésztésben egy fenntartható gazdaságot eredményezhet (Rajkumar *et al.*, 2011; Felver-Gant *et al.*, 2012).

A biotechnológia, illetve genomika területén zajló fejlesztések egyre inkább elősegítik a gyakorlatban zajló tenyésztőmunka sikerességét. Napjainkban már rendelkezésünkre áll a teljes tyúk genom szekvencia, több millió, már azonosított egyedi nukleotid polimorfizmussal (Hillier, 2004; Wong, 2004). Azonban fontos megjegyezni, hogy a genomanalízisek nem fogják kiváltani a hagyományos szelekciós módszereket, sokkal inkább a kettő szoros együttműködését teszik lehetővé a hatékonyság növelésével. Az innovációra, mint lehetőségre kell tekinteni, ami akár egy jól működő hálózattá kövacsolhatná a vállalkozás – oktatás – kutatás és fejlesztés intézményeit (Horn, 2008).

A molekulárisbiológiai eszközök elősegítik a jelátviteli útvonalak, élettani folyamatok és immunválaszok megértését, ami segítheti a fajták jobb adaptációját a változó éghajlathoz (Borges *et al.*, 2004; Cheng *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015).

Hőstresszre aktiválódó válaszreakciókban a HSP-k szerepe már bizonyított. A HSP-k expressziója növekszik, fehérjekárosodás megakadályozására irányuló jelátviteli utakat indukál (Xie *et al.*, 2014; Murugesan, Ullengala and Amirthalingam, 2017). A legújabb kutatások kiemelik az epigenetika adaptációs előnyeit (Deans and Maggert, 2015; Li *et al.*, 2015) a hőkondicionálás során (Kisliouk, Cramer and Meiri,

2017), azonban ennek a kezelésnek az optimalizálásához még további kísérletekre van szükség, illetve a HSP-k és más a hőszabályozásban szerepet játszó molekuláris jelátviteli útvonalak közötti kölcsönhatás részletesebb megismerése is fontos. Ezt követően lehetséges lenne egy minden fajtára egységesen alkalmazható eljárás kidolgozása.

A szakirodalomban már több különböző kombinációban alkalmaztak hőkezelést. Alkalmazták korábbi időintervallumban pl.: még tojásban, a keltetési hőmérséklet emelésével, ez azonban nem volt elég eredményes (Loyau *et al.*, 2016). Azt is leírták, hogy ha lépcsőzetesen emelik a hőmérsékletet, nincs jelentős eltérés az egyszeri hőkezeléssel elért hatáshoz viszonyítva (Xie *et al.*, 2014).

Korábbi kutatásaink eredményei alapján elmondható, hogy a reprodukív tulajdonságok a kontrollhoz képest kevésbé romlottak hőstressz esetén, ha előzőleg hőkondicionálást alkalmaztunk. A tojástermelés aránya is szignifikánsan magasabb volt a hőkondicionált csoportban hőstressz esetében, mint azoknál az állatoknál, amelyek csak hőstresszen estek át (Anand *et al.*, 2016; Tóth *et al.*, 2021). Kutatásaim során megerősítettem azon állítást, miszerint a hőkondicionálás javítja az életképes embriók arányát a házityúkokat ért hőstresszes körülmények között.

Úgy gondolom, hogy a miRNS-ek kifejeződési mintázatában a hőkezelés hatására létrejövő változások közvetlen információval szolgálhatnak az állatok adaptációs képességének hátterében meghúzódó molekuláris folyamatokról (Gebert and MacRae, 2019; Safdar and Özaslan, 2023). Ezek az eredmények alátámasztják a fiatal korban történő hőkondicionálás fontosságát. Tehát a hőkezelési eljárás optimalizálásával javíthatjuk a házityúk adaptációs képességét.

A PGC-k karakterizálásához megvizsgáltam az összejt specifikus miR-302b-5P és miR-302b-3P sejtprolifерációra és apoptózisra gyakorolt hatását, miRNS gátláson alapuló technika alkalmazásával. A miR-302 antagomirokkal (anti-miR) történő gátlása a hESC-k, hiPSC-k önmegújulási sebességének csökkenését eredményezte, amit sejtkolónia-képződést detektáló assay-t alkalmazva igazoltak (Wu *et al.*, 2019).

Napjainkban egyre több kutatás irányul az akklimatizációs tulajdonság örökölhetőségének meghatározására, ami az ivarsejtekben létrejövő epigenetikai változások átadásán keresztül valósulhat meg. Az adaptációt több gén is befolyásolja, vannak dominánsan és recesszíven öröklődő gének is. Vannak gének, amelyek nemhez kötötten öröklődnek, mint az általam is kiemelt *DMRT1* gén. A *DMRT1* gén a Z ivari kromoszómán helyezkedik el (Prastowo and Ratriyanto, 2021), így a női vonalon

néhány generációt követően csökken az állomány adaptációs képessége ismételt hőkondicionálás nélkül.

Mivel ezen képesség örökölhetőségét a metilációs mintázat vizsgálatokban is igazoltuk, úgy gondoljuk, hogy epigenetikai öröklődés lehet az öröklődés meghatározója. Az epigenetikai mintázatot az egyedi élet folyamán is sok paraméter befolyásolja. Hiába mutatható ki több generáción keresztül a kezelés hatására kialakuló ellenálló képességet meghatározó metilációs mintázatok, a ténylegesen gazdaságilag hasznos fenotípus stabilan tartásához a kezelést egy két generációt követően ismételni szükséges.

A transzgenerációs epigenetikai átvitel egyik generációról a másikra, csak akkor megkérdőjelezhetetlen, ha a hatást az F3 generációban vagy azon túl észlelik (Skinner, 2011). Emlősökben endokrinológiai jelátviteli útvonalak tanulmányozása során igazolták, hogy a szülői generáción alkalmazott kezelések hatása az F3 generáció egyedeiben is kimutatható (Anway *et al.*, 2005; Wolstenholme *et al.*, 2012).

Kutatásom során a PG-sejttenyészeteket, mint modell rendszert alkalmaztam, amellyel meghatározhatóak a hőkezelés hatására végbemenő molekuláris folyamatokat az utód generációban. A PG-sejttenyészetek tenyészetbe vételét és fenntartását a génbank bővítése mellett ezen biotechnológiai vizsgálatokra is felhasználtam. Modellrendszerként való alkalmazása lehetőséget nyújtott számos molekuláris folyamat vizsgálatára, mint például az epigenetikai módosulások feltárása, amely a szülői generációt ért kezelések hatására ment végbe.

Mindent összevetve a hőkondicionálás és hőstressz az ősvarsejteknél is kimutatható génexpressziós szintváltozásokat idéz elő, ami arra utal, hogy a kezelés okozta epigenetikai változások az utód generációkra átadódnak. Tehát a kutatócsoportunk által alkalmazott kísérleti paraméterek mellett is ki tudtam mutatni a hőstressz során szerepet játszó faktorok expressziós szintváltozását az utód generációban is, ami alátámasztja az állatok adaptációs képességének öröklődését.

A kutatásunk eredménye gazdaságilag is hasznosítható házityúk esetében. A hőkezelési rendszer gyakorlati alkalmazhatósága elérhető, ugyanis az általunk használt hőkezelési protokoll nem igényel nagyobb összegű beruházást, nem kell alkalmazni táplálékkiegészítőket és vakcinákat, amelyek felhalmozódhatnak a húsból és tojásban. A gazdasági igényeket kiszolgáló telepeken ipari méretű keltető gépeket használnak, így a hőkezelés kivitelezése lehetséges ezekben a gépekben, azáltal, hogy a kikelt csibéket két napos korukban visszahelyezzük, 12 órára 38°C-ra 60%-os páratartalom

mellett, biztosítva az ivóvizet és táplálékot. A hőkezelést követően lehetne folytatni a normál csibenevelési protokollt.

Ha a hőkezelési protokoll más házityúk fajták, illetve más baromfi fajok esetében is alkalmazható lenne, biztosítva lenne az, hogy eredményeink széles körben is hozzájárulhassanak a gazdasági termelés hatékonyságának növeléséhez. Tehát közvetlen segítheti a hőkondicionált állatok adaptációs képességét, növekedési paraméterekre, és a tojástermelésre nézve.

Továbbiakban, hogy az állatkísérletekben felhasznált állatok számát csökkenteni lehessen, egy *in vitro* hőkezelési eljárás kidolgozását tervezzük a PGC tenyészeteken végezve a hőkezelést. Ennek segítségével, a hőkezelés hatására a molekuláris jelátviteli útvonalakban létrejövő változások állatkísérlet nélkül is tanulmányozhatók lehetnek.

5. Új tudományos eredmények

1. Igazoltam, hogy az előzetes hőkondicionálás hatással van több hőstresszel kapcsolt gén kifejeződésére házityúk agyszövet mintákban. A *HSP70* és *HSP90* expresszió minden csoportban emelkedett a hőkondicionálás hatására, míg a *HSF2* és *HSF3* expressziója ivarérett korban csökkent, amit a hőkondicionálás mérsékelte. A *HSF1* és *HSF4* expressziója nő a kezelés hatására minden csoportban. A *HSF1* expressziója szignifikáns emelkedést mutatott ivarérett korban, a hímivarú egyedekben, a hőkezelés hatására.
2. Kimutattam a miR-138-5P expresszió szignifikáns csökkenését az ivarérett hímivarú egyedek agyszövetében, ezzel igazolva a 2 napos kori hőkondicionálás hosszú távú hatását.
3. Bizonyítottam a miR-302b-3P és miR-302b-5P szerepét a primordiális ivarsejtek (PGC) proliferációjának szabályozásában, ezen miRNS-ek inhibitorainak külön-külön, illetve együttes alkalmazásával. A miR-302-5P expressziójának csökkenésével párhuzamosan csökkent a sejtek proliferációs rátája mind a ZW, mind a ZZ genotípusú PGC-k esetében.
4. A PGC tenyészeteket, mint modell rendszert alkalmaztam a hőkezelés és hőstressz kapcsolt markerek kimutatására. Igazoltam, hogy a miR-92-3P expressziója női ivarban hőstressz hatására nő, míg hímivarban a hőkondicionált és előkezelést nem kapott csoportokban is emelkedett hőstressz esetén. A miR-138-5P expressziója a hőkondicionált és hőstresszelt állatok utód generációjából alapított PGC tenyészetekben volt magasabb mindkét nemben.
5. A PGC tenyészetek esetében igazoltam, hogy az általunk alkalmazott hőkondicionálást követően a *DMRT1*, *RUNX2*, miR-6545 expressziós szintje szignifikánsan megemelkedett.
6. Igazoltam, hogy a hőkezelt házityúkok embrióiból létrehozott PGC tenyészetek esetében a *DMRT1* gén promóter régiójának metilációs szintje csökkent, a kontroll tenyészetekben mérthez képest. A metilációs szint csökkenés következtében a *DMRT1* expressziója megnőtt, amit a qPCR, illetve az RNS szekvenálás eredményei is alátámasztottak. Ezzel igazoltam, hogy az ivarsejtekben a hőkezelés hatására létrejött epigenetikai változás hatása az utód generációban is kimutatható.

6. Publikációk

A disszertáció témaköréből megjelent publikációk

- **Tokodyné Szabadi Nikolett**, Tóth Roland, Lázár Bence, Ecker András, Urbán Martin, Várkonyi Eszter, Liptói Krisztina, Gócza Elen (2024). „Hőkonkondicionálás hatására létrejövő molekuláris változások vizsgálata a házityúkok agyszövetében/ Investigation of molecular changes in the brain tissue of Transylvanian naked neck chicken caused by heat conditioning” Magyar Állatorvosok Lapja, 146 (2), 67-75. [10.56385/magyallorv.2024.02.67-75](https://doi.org/10.56385/magyallorv.2024.02.67-75).
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Tóth Roland; Lázár Bence; Várkonyi Eszter; Liptói Krisztina; Tokody Dániel; Ady László; Gócza Elen (2023). „Klímaváltozás hatása a házityúk reproduktív rendszerére” Animal welfare etológia és tartástechnológia / Animal welfare ethology and housing systems 19: 1 pp. 92-101., 10 p.
- Bence Lázár*, **Nikolett Tokodyné Szabadi***, Mahek Anand, Roland Tóth, András Ecker, Martin Urbán, Maria Teresa Salinas Aponte, Ganna Stepanova, Zoltán Hegyi, László Homolya, Eszter Patakiné Várkonyi, Bertrand Pain, Elen Gócza (2022). "Effect of miR-302b MicroRNA Inhibition on Chicken Primordial Germ Cell Proliferation and Apoptosis Rate" Genes 13, no. 1: 82. <https://doi.org/10.3390/genes13010082>.
- Roland Tóth, **Nikolett Tokodyné Szabadi**, Bence Lázár, Kitti Buda, Barbara Végi, Judit Barna, Eszter Patakiné Várkonyi, Krisztina Liptói, Bertrand Pain, Elen Gócza (2021). "Effect of Post-Hatch Heat-Treatment in Heat-Stressed Transylvanian Naked Neck Chicken" Animals 11, no. 6: 1575. <https://doi.org/10.3390/ani11061575>.
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Sima Krisztina; Tóth Roland; Lázár Bence; Patakiné Várkonyi Eszter; Liptói Krisztina; Gócza, Elen (2020). „Hőstressz hatására aktiválódó fiziológiai válaszok házityúkban, a hőháztartás fenntartása érdekében” Állattenyésztés és takarmányozás” 69: 1 pp. 41-52., 12 p.
- Maraghechi Pouneh, Maria Teresa Salinas Aponte, András Ecker, Bence Lázár, Roland Tóth, **Nikolett Tokodyné Szabadi**, Elen Gócza (2023). "Pluripotency-Associated microRNAs in Early Vertebrate Embryos and Stem Cells" Genes 14, no. 7: 1434. <https://doi.org/10.3390/genes14071434>
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Tóth Roland; Lázár Bence; Ecker András; Várkonyi Eszter; Liptói Krisztina; Gócza Elen (2023). „Házityúk ősisvarsejt tenyészetek, mint a biotechnológiai kutatás modellrendszerei” In: Dániel, Molnár; Dóra, Molnár (szerk.). XXVI. Tavaszi Szél Konferencia 2023: Tanulmánykötet I. Budapest: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ) 572 p. pp 15-25., 11p.

- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Sima Krisztina; Tóth Roland; Lázár Bence; Molnár Mariann; Patakiné Várkonyi Eszter; Gócza Elen (2021). „Házityúk esetében alkalmazható in vitro génmegőrzés, az ősisvarsejt tenyészetek jelentősége” In: Szabó, Péter; Simon, Brigitta; Soós, Adrienn; Faludi, Gergely; Fitos, Gábor (szerk.). Kutatás-fejlesztés-innováció az agrárium szolgálatában II. kötet. Budapest, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ) 205 p. pp. 167-180., 14 p.
- **Tokodyné Szabadi Nikolett**; Tóth Roland; Lázár Bence; Gócza Elen. (2020) „KLÍMAVÁLTOZÁS KÁROS HATÁSAINAK KIVÉDESE BAROMFIBAN” In: Bihari, Erika; Molnár, Dániel; Szikszai-Németh, Ketrin (szerk.). Tavaszí Szél 2019 Konferencia = Spring Wind 2019: Konferenciakötet I. Budapest, Magyarország: Doktoranduszok Országos Szövetsége (DOSZ) 641 p. pp. 164-171., 8 p.

A disszertáció témakörén kívüli publikációk

- András Ecker, Bence Lázár, Roland Tóth, Martin Urbán, **Nikolett Tokodyné Szabadi**, Maria Teresa Salinas Aponte, Mahek Adnan, Eszter Várkonyi, Elen Gócza (2023). The Effects of Freezing Media on the Characteristics of Male and Female Chicken Primordial Germ Cell Lines. Life (Basel, Switzerland), 13(4), 867. <https://doi.org/10.3390/life13040867>
- Bence Lázár, Mariann Molnár, Nikolett Sztán, Barbara Végi, Árpád Drobnyák, Roland Tóth, **Nikolett Tokodyné Szabadi**, Michael J. McGrew, Elen Gócza, Eszter Patakiné Várkonyi (2021). Successful cryopreservation and regeneration of a partridge colored Hungarian native chicken breed using primordial germ cells. Poultry science, 100(8), 101207. <https://doi.org/10.1016/j.psj.2021.101207>
- Tóth, Roland; Lázár, Bence; **Tokodyné, Szabadi Nikolett**; Patakiné, Várkonyi Eszter; Gócza, Elen (2019). „Őshonos magyar tyúkfajták, mint lehetséges univerzális recipiensek az ősisvarsejt alapú génmegőrzésben/ Indigenous Hungarian chicken breeds as universal recipients for primordial germ cell-based gene conservation” Magyar Állatorvosok Lapja, 141 (7), 439-447., 9 p.

Irodalomjegyzék

- Anand, M. *et al.* (2016) 'Examination the Expression Pattern of HSP70 Heat Shock Protein in Chicken PGCs and Developing Genital Ridge', *Lucrari stiintifice zootehnie si biotehnologii / Scientific papers animal science and biotechnologies*, (49), pp. 78–82.
- Anway, M.D. *et al.* (2005) 'Epigenetic Transgenerational Actions of Endocrine Disruptors and Male Fertility', *Science*, 308(5727), pp. 1466–1469. Available at: <https://doi.org/10.1126/science.1108190>.
- Benton, C.E. *et al.* (1998) 'The Use of Dietary Minerals During Heat Stress in Broilers', *The Professional Animal Scientist*, 14(4), pp. 193–196. Available at: [https://doi.org/10.15232/S1080-7446\(15\)31828-3](https://doi.org/10.15232/S1080-7446(15)31828-3).
- Borges, S.A. *et al.* (2004) 'Physiological responses of broiler chickens to heat stress and dietary electrolyte balance (sodium plus potassium minus chloride, milliequivalents per kilogram)', *Poultry Science*, 83(9), pp. 1551–1558. Available at: <https://doi.org/10.1093/ps/83.9.1551>.
- Cataldo, A. *et al.* (2016) 'miR-302b enhances breast cancer cell sensitivity to cisplatin by regulating E2F1 and the cellular DNA damage response', *Oncotarget*, 7(1), pp. 786–797. Available at: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6381>.
- Cheng, C.-Y. *et al.* (2015) 'Annotation of Differential Gene Expression in Small Yellow Follicles of a Broiler-Type Strain of Taiwan Country Chickens in Response to Acute Heat Stress', *PLOS ONE*, 10(11), p. e0143418. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143418>.
- Daghir, N.J. (2009) 'Nutritional strategies to reduce heat stress in broilers and broiler breeders.', *Lohmann Info*, 44(1), pp. 6–15.
- Deans, C. and Maggert, K.A. (2015) 'What Do You Mean, “Epigenetic”?', *Genetics*, 199(4), pp. 887–896. Available at: <https://doi.org/10.1534/genetics.114.173492>.
- Dunislawska, A. *et al.* (2021) 'Comparison of the Transcriptomic and Epigenetic Profiles of Gonadal Primordial Germ Cells of White Leghorn and Green-Legged Partridge-like Chicken Embryos', *Genes*, 12(7), p. 1090. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes12071090>.
- Dunnington, E.A. and Siegel, P.B. (1984) 'Thermoregulation in Newly Hatched Chicks', *Poultry Science*, 63(7), pp. 1303–1313. Available at: <https://doi.org/10.3382/ps.0631303>.
- FAO (2007) *Interlaken Declaration on Animal Genetic Resources. Global Plan of Action for Animal Genetic Resources*. Available at: <http://www.fao.org/3/a-a1404e.pdf> (Accessed: 6 December 2023).
- FAOSTAT (2023). Available at: <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> (Accessed: 8 July 2023).
- Felver-Gant, J.N. *et al.* (2012) 'Genetic variations alter physiological responses following heat stress in 2 strains of laying hens', *Poultry Science*, 91(7), pp. 1542–1551. Available at: <https://doi.org/10.3382/ps.2011-01988>.
- Gebert, L.F.R. and MacRae, I.J. (2019) 'Regulation of microRNA function in animals', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), pp. 21–37. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0045-7>.

Hillier, L.A.W. (2004) 'Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution', *Nature*, 432(7018), pp. 695–716. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03154>.

Horn, P. (2008) 'A baromfitenyésztés fejlődésének kilátásai, új kihívások, veszélyforrások és lehetőségek. ', *Állattenyésztés és Takarmányozás*, 12(57), pp. 389–401.

Kisliouk, T., Cramer, T. and Meiri, N. (2014) 'Heat stress attenuates new cell generation in the hypothalamus: A role for miR-138', *Neuroscience*, 277, pp. 624–636. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2014.07.047>.

Kisliouk, T., Cramer, T. and Meiri, N. (2017) 'Methyl CpG level at distal part of heat-shock protein promoter HSP70 exhibits epigenetic memory for heat stress by modulating recruitment of POU2F1-associated nucleosome-remodeling deacetylase (NuRD) complex', *Journal of Neurochemistry*, 141(3), pp. 358–372. Available at: <https://doi.org/10.1111/jnc.14014>.

Kisliouk, T., Yosefi, S. and Meiri, N. (2011) 'MiR-138 inhibits EZH2 methyltransferase expression and methylation of histone H3 at lysine 27, and affects thermotolerance acquisition', *European Journal of Neuroscience*, 33(2), pp. 224–235. Available at: <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2010.07493.x>.

Lázár, B. *et al.* (2018) 'Comparison of the MicroRNA Expression Profiles of Male and Female Avian Primordial Germ Cell Lines', *Stem Cells International*, 2018, pp. 1–17. Available at: <https://doi.org/10.1155/2018/1780679>.

Lázár, B. *et al.* (2021) 'Effect of miR-302b MicroRNA Inhibition on Chicken Primordial Germ Cell Proliferation and Apoptosis Rate', *Genes*, 13(1), p. 82. Available at: <https://doi.org/10.3390/genes13010082>.

Leinonen, I., Williams, A.G. and Kyriazakis, I. (2014) 'The effects of welfare-enhancing system changes on the environmental impacts of broiler and egg production', *Poultry Science*, 93(2), pp. 256–266. Available at: <https://doi.org/10.3382/ps.2013-03252>.

Li, C. *et al.* (2015) 'DNA methylation and histone modification patterns during the late embryonic and early postnatal development of chickens', *Poultry Science*, 94(4), pp. 706–721. Available at: <https://doi.org/10.3382/ps/pev016>.

Loyau, T. *et al.* (2016) 'Thermal manipulation of the chicken embryo triggers differential gene expression in response to a later heat challenge', *BMC Genomics*, 17(1), p. 329. Available at: <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2661-y>.

Murugesan, S., Ullengala, R. and Amirthalingam, V. (2017) 'Heat Shock Protein and Thermal Stress in Chicken', in, pp. 179–193. Available at: https://doi.org/10.1007/978-3-319-73377-7_6.

Nawab, A. *et al.* (2018) 'Heat stress in poultry production: Mitigation strategies to overcome the future challenges facing the global poultry industry', *Journal of Thermal Biology*, 78, pp. 131–139. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.jtherbio.2018.08.010>.

OECD-FAO *Agricultural Outlook 2020-2029* (2020). OECD. Available at: <https://doi.org/10.1787/1112c23b-en>.

Prastowo, S. and Ratriyanto, A. (2021) 'miRNA target prediction of avian Z-linked DMRT1 gene during sex determination in chicken (*G. Gallus*)', *IOP Conference Series: Earth*

and Environmental Science, 905(1), p. 012148. Available at: <https://doi.org/10.1088/1755-1315/905/1/012148>.

Rajkumar, U. *et al.* (2011) 'Evaluation of Growth, Carcass, Immune Response and Stress Parameters in Naked Neck Chicken and Their Normal Siblings under Tropical Winter and Summer Temperatures', *Asian-Australasian Journal of Animal Sciences*, 24(4), pp. 509–516. Available at: <https://doi.org/10.5713/ajas.2011.10312>.

Rao, X. *et al.* (no date) *An improvement of the 2⁻(-delta delta CT) method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis*.

Rojas-Downing, M.M. *et al.* (2017) 'Climate change and livestock: Impacts, adaptation, and mitigation', *Climate Risk Management*, 16, pp. 145–163. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.crm.2017.02.001>.

Safdar, M. and Özaslan, M. (2023) 'MicroRNAs as potential biomarkers for heat stress in livestock', *Zeugma Biological Science*, 4, pp. 6–12. Available at: <https://doi.org/10.55549/zbs.1280878>.

Skinner, M.K. (2011) 'Environmental epigenetic transgenerational inheritance and somatic epigenetic mitotic stability', *Epigenetics*, 6(7), pp. 838–842. Available at: <https://doi.org/10.4161/epi.6.7.16537>.

Sun, Y. *et al.* (2015) 'Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis', *Journal of Receptors and Signal Transduction*, 35(6), pp. 600–604. Available at: <https://doi.org/10.3109/10799893.2015.1030412>.

Tanabe, M. *et al.* (1997) 'Different Thresholds in the Responses of Two Heat Shock Transcription Factors, HSF1 and HSF3', *Journal of Biological Chemistry*, 272(24), pp. 15389–15395. Available at: <https://doi.org/10.1074/jbc.272.24.15389>.

Tavares, A.L.P. *et al.* (2018) 'Runx2-I is an Early Regulator of Epithelial–Mesenchymal Cell Transition in the Chick Embryo', *Developmental Dynamics*, 247(3), pp. 542–554. Available at: <https://doi.org/10.1002/dvdy.24539>.

Thornton, P.K. (2010) 'Livestock production: recent trends, future prospects', *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 365(1554), pp. 2853–2867. Available at: <https://doi.org/10.1098/rstb.2010.0134>.

Tokodyné Szabadi, N. *et al.* (2024) 'Hőkonkondicionálás hatására létrejövő molekuláris változások vizsgálata a házityúkok agyszövetében', *Magyar Állatorvosok Lapja*, 146(2), pp. 67–75. Available at: <https://doi.org/10.56385/magyallorv.2023.02.67-80>.

Tóth, R. *et al.* (2021) 'Effect of Post-Hatch Heat-Treatment in Heat-Stressed Transylvanian Naked Neck Chicken', *Animals*, 11(6), p. 1575. Available at: <https://doi.org/10.3390/ani11061575>.

Varasteh, S. *et al.* (2015) 'Differences in Susceptibility to Heat Stress along the Chicken Intestine and the Protective Effects of Galacto-Oligosaccharides', *PLOS ONE*, 10(9), p. e0138975. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138975>.

Wang, S.-H. *et al.* (2015) 'Acute Heat Stress Induces Differential Gene Expressions in the Testes of a Broiler-Type Strain of Taiwan Country Chickens', *PLOS ONE*, 10(5), p. e0125816. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125816>.

Wolstenholme, J.T. *et al.* (2012) 'Gestational Exposure to Bisphenol A Produces Transgenerational Changes in Behaviors and Gene Expression', *Endocrinology*, 153(8), pp. 3828–3838. Available at: <https://doi.org/10.1210/en.2012-1195>.

Wong, G.K.-S. (2004) 'A genetic variation map for chicken with 2.8 million single-nucleotide polymorphisms', *Nature*, 432(7018), pp. 717–722. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature03156>.

Wu, H. *et al.* (2019) 'Evaluation of miR-302b-5p expression and molecular mechanism in hepatocellular carcinoma: Findings based on RT-qPCR and in silico analysis', *Pathology - Research and Practice*, 215(7), p. 152424. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.04.016>.

Xie, J. *et al.* (2014) 'Differential Expression of Heat Shock Transcription Factors and Heat Shock Proteins after Acute and Chronic Heat Stress in Laying Chickens (*Gallus gallus*)', *PLoS ONE*, 9(7), p. e102204. Available at: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0102204>.