

IVARSZERVFEJLŐDÉSBEN SZEREPET JÁTSZÓ GÉNEK VIZSGÁLATA ERDÉLYI KOPASZNYAKÚ TYÚKFAJTÁN

TÓTH ARNOLD - HOFFMANN ORSOLYA IVETT - GÓCZA ELEN - TÓTH ROLAND IMRE

ÖSSZEFOGLALÁS

Az emlősökkel ellentétben madaraknál a hím ivar a homogamétás, míg a tojók rendelkeznek a ZW kromoszómákkal. Ez komoly problémát jelent a teljes genetikai állomány hosszútávú megőrzésében, mert a teljes genom megőrzéséhez mindenképpen szükség van a W és a Z kromoszómákra is. Hatékony módszernek bizonyult a mindkét ivarból származó ősvasejtek (PGC, primordiális őscsírasejtek) mélyhűtése, melyek embrionális vérből izolálhatók. Az izolált vérből PGC tenyészetek alapíthatók, így a madarak teljes genetikai anyaga eltárolható lesz hosszú távon. Az ivari kromoszómákon kívül egy másik lényeges eltérés, hogy az emlősökkel ellentétben a madaraknál ivarszervi aszimmetria figyelhető meg. Ez a jelenség különösen szembetűnő a legtöbb madárfaj tojó egyedeinél, ahol a petefészkek csak a bal oldalon fejlődik ki funkcionálisan. Hímeknél a herében elhelyezkedő ősvasejtek számában figyelhető meg aszimmetria. Ezen ismeretek birtokában az ivarszerv fejlődésben szerepet játszó gének működésében is találhatók aszimmetrikus mintázatok.

A szerzőknek a vizsgálatok során sikerült a választott gének (*DMRT1*, *CYP19A1*, *DDX4*, *DAZL*) expressziós szintjeit meghatározni őshonos tyúkfajta esetében. Ezek egyezést mutattak a szakirodalomban fellelhető más házityúk fajtáknak az ivarszervben lévő expressziós mintázattal. A kapott eredmények hozzájárulnak a témában végzett kutatásokhoz, melyek egy őscsírasejt alapú őshonos génbank fejlesztése felé irányultak.

SUMMARY

Tóth, A. – Hoffmann, O. I. – Gócza, E. – Tóth, R. I.: EXAMINATION OF GENES INVOLVED IN REPRODUCTIVE ORGAN DEVELOPMENT IN BLACK TRANSYLVANIAN NAKED NECK CHICKEN

In contrast to mammals, in birds, the male is the homogametic sex with ZZ chromosomes and the female is the heterogametic sex with ZW chromosomes. It raises a serious problem in the long-term preservation of the avian genome, because the W chromosome is definitely needed to store the entire genome. Eggs cannot be frozen due to their high yolk content. An effective, proven method is based on the primordial germ cells (PGCs), which can be isolated from early embryonic blood. From the isolated PGCs, cell cultures can be established. After freezing of the PGCs, the avian genome can be stored for a long time. Apart from the sex chromosomes, another important difference compared to mammals is the asymmetry of the reproductive organs. This phenomenon is most conspicuous in the females where the ovary develops and functions only on the left side, while the right side regresses. Males have two testicles similar in size, however asymmetry can be observed in the number of the germ cells between the two testicles. Similarly, genes, involved in gonadal development, are also expressed asymmetrically.

In this study, the development of embryonic gonads of Black Transylvanian Naked Neck chicken breed were examined. The authors, during the experiments, could determine the expression patterns of the selected genes (*DMRT1*, *CYP19A1*, *DDX4*, *DAZL*) in indigenous poultry species. The results of the *DMRT1* showed a unified expression pattern between the two sexes. According to these results, from d8 to d10, the expression levels were increasing and to d12 they were decreasing. However, the differences between the two sexes were notable and in the male embryos, the expressions were usually higher on the left side. The *CYP19A1* was measurable only in the female gonads. At the female, there was a strong asymmetry between the gonads and interestingly, the expressions were higher on the right side at every day. Both *DAZL* and *DDX4* genes expressed higher in the left gonad, in both sexes, due to the higher PGC content. And the *DAZL* expressed higher in the male left gonad, than the female, but *DDX4* was on a similar level in both sexes.

The results can help in the subsequent characterization of ideal recipient breeds and finding the best breed, which is an important step in gene conservation efforts.

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

Az őscsírasejt (PGC) az egyetlen olyan sejttípus, mely képes a genetikai anyag átadására a következő generáció számára. Számos gerinces és gerinctelen állatfaj esetében az őscsírasejtek egyértelműen elkülöníthetők a szomatikus sejtektől, már az embrionális fejlődés korai szakaszában is. Habár a korai fejlődés során is már megtalálhatók az embrió szervezetében, származásuk nem az embrionális gonádokhoz köthető. Oda a fejlődés során vándorolnak el (*Tagami és mtsai, 2017*). Számos fajjal ellentétben a madár PGC vándorlás a csíralécek felé a véráramban történik (*Tagami és mtsai, 2017*). Az ősvarsejtek már a tojásrakás pillanatában, megtalálhatók, az *area pellucida* központi régiójában (*Intarapat, 2011*). Az ősvarsejtek a gaméták progenitor sejtjei, belőlük származtathatók a petesejtek és a hímivarsejtek is (*Tagami és mtsai, 2017*).

Az emlősök szimmetrikusan fejlődő ivarszerveivel ellentétben, a madarak esetében csak a hímek rendelkeznek szimmetrikus gonádokkal. A legtöbb madár faj esetében a női ivarszerv aszimmetrikusan fejlődik és csak a bal oldalon fog funkcionálni. Ezt a gonád aszimmetriát számos madárfaj esetében leírták: kacsánál (*Van Limborgh és Fassen, 1960; Van Limborgh, 1970*), pulykánál (*Burke, 1973*), tyúknál (*Van Limborgh, 1954, 1960; Calhim és Birkhead, 2009*). Ez alól kivételt képeznek a ragadozómadarak, mint például a sólyomalakúak családja, továbbá még a kivi is, melyeknél mind a két oldalon megtalálható a petefészkek (*Guioli és mtsai, 2014*).

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

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

A keltetés 6,5. napja a fázishatár a differenciálatlan és a differenciált fejlődési állapot között. Ettől a ponttól az ivarok szövettanilag megkülönböztethetők egymástól (*Romanoff, 1960*). A sejtosztódás a herék fejlődése esetén gyorsabb a velőben, mint a kéregállományban. A gonádok szöveti szerkezetét tekintve, az emlősökhöz hasonlóan a házityúk embrionális gonádok is két rétegből állnak, a külső *cortex*, azaz kéregből és a belső *medulla*, azaz velőállományból (*Maraud et al., 1987; Clinton, 1998; Clinton és Haines, 2001; Smith és Sinclair, 2004*). A velőben az elsődleges csírahám kordonok kanyarulatok, *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 és Carlon, 1973; McCarrey és Abbott, 1979*).

A petefészkek 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 velői rész elvékonyodása figyelhető meg, az itt található kötegek feldarabolódása miatt (*Romanoff, 1960; McCarrey és Abbott, 1979; Clinton, 1998*).

Amíg a hím madarak esetében a jobb- és baloldali gonádok fejlődése közel

azonosan zajlik, addig a tojóknál erős aszimmetria figyelhető meg. Csak a bal oldali gonád fog érett petefészekké fejlődni, a jobboldali petefészek kezdemény növekedése lelassul, a kéreg degenerálódik, a velői kötegek feldarabolódnak. Ennek hatására a jobboldali ivarszerv csökevényes formát vesz fel, vagy teljesen elsorvadhat (Carlon és Stahl, 1985; Romanoff, 1960; Smith és Sinclair, 2001; 2004; Vaillant és mtsai, 2001).

Az ivardeterminációt és differenciációt madarak esetében az ivari kromoszómákon található gének szabályozzák. Ezt követően kaszkádszerűen indulnak el a szex determinációt befolyásoló gének expressziói, aminek végkifejlete a szöveti szerkezetében eltérő ivarszervek kifejlődése (Clinton és Haines, 2001; Smith és Sinclair, 2001; Péczely, 2013).

Madarakban jelenleg két *iniciátor* szex determináns funkciójú gént ismerünk. Az egyik a Z-kromoszómához kapcsolt *DMRT1* (Doublesex 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 (sex determining region Y) (Raymond és mtsai, 1999; Smith, 2007; Cutting és mtsai, 2012).

A másik a W-kromoszómához kötött *HINTW* (Histidine triad nucleotide binding protein, W-linked), petefészek determináns gén, melynek expressziója a fejlődés 4,5. napjától mutatható ki (Pace és Brenner, 2003; Moriyama és mtsai, 2006; Smith és mtsai, 2009a).

Az indifferens fázisban több specifikus gén expressziója is jelentkezik, melyek a szöveti proliferáció megindításában és szabályozásában játszanak szerepet (Yoshioka és mtsai, 2005). Számos, a fejlődésben közreműködő gén aszimmetrikusan expresszál különböző időpontokban, mindkét ivar esetében. Korai stádiumban, hímivarban főleg a *DMRT1* és a *SOX9* (Sex-determining region-y gén) (Kent és mtsai, 1996; Silva és mtsai, 1996; Raymond és mtsai, 1999; Oréal és mtsai, 2002; Smith és mtsai, 2003; Yamamoto és mtsai, 2003; Takada és mtsai, 2006; Koba és mtsai, 2008; Smith és mtsai, 2009b; Yang és mtsai, 2013) expresszál, míg tojóban a *HINTW* (Histidine triad nucleotide binding protein, W-linked), *FET1* (Female Expressed Transcript 1), *FOX L2* (Forkhead transcription factor 2) és az aromatáz (*CYP19A1*) van jelen (Andrews és mtsai, 1997; Nakabayashi és mtsai, 1998; Reed és Sinclair, 2002; Hudson és mtsai, 2005; Smith és mtsai, 2009a). A csírasejteken (CVH-t expresszáló sejtek) kívül a szomatikus sejtek is aszimmetrikus expressziót mutatnak (Intarapat és Stern, 2013).

A *DMRT1* valamennyi gerincesben ismert, emberben károsodása szexreverziót okoz. Expressziója a házityúk embrió csíralécében és a Müller csőben a 3,5 – 4,5. napon indul meg, az ivari differenciálódás előtt (Smith, 2007; Cutting és mtsai, 2012), a hímivarban magasabb expresszióval, mint a tojóban (Raymond és mtsai, 1999). A *DMRT1* jelenléte elengedhetetlen a here fejlődésének szempontjából, a petefészek fejlődésének korai szakaszában azonban jelenléte nem elengedhetetlen (Ioannidis és mtsai, 2021).

Az ösztrogén termelődés egy másik kulcs faktornak számít az ivardetermináció szempontjából, azonban ennek mennyisége is kötődik a *DMRT1* expressziójához (Ioannidis és mtsai, 2021).

A *CYP19A1* gén a cytochrom P450 család, 19 alcsoport tagja, 1. polipeptid gén, a szteroid bioszintézis monooxygenáz eleme (Smith és mtsai, 1997; Nakabayashi

és mtsai, 1998; Smith és mtsai, 2005). Működése során olyan szteroid típusú hormonokat szabályoz, amelyek részt vesznek az ivari differenciálódásban (Elbrecht és Smith, 1992; Crews és Bergeron, 1994; Kitano és mtsai, 2000; Sakata és mtsai, 2005).

A CYP19A1 (aromatáz) génaktivátora a csak a nőivarú csíralécben expresszálló FOXL2. A petefészek kezdeményben a keltetés 5. napján ez a fehérje váltja ki a CYP19A1 gén expresszióját (Smith és mtsai, 1997; Nakabayashi és mtsai, 1998; Smith, 2005).

A CYP19A1 gén az ösztrogén-szintézis limitáló eleme, melynek működése madarakban is meghatározó szerepű a petefészek fejlődés szabályozásában. Az ösztrogén a csíralécben kialakult alfa-ösztrogén receptorhoz (ER α) 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 gonádjában megfigyelhető, de mennyisége hímekben 6,5 nap után lecsökken. Expressziós mintázatára ivari aszimmetria jellemző és erősen expresszáll a nőivarú gonád velőállományában (Jin és mtsai, 2020).

A referenciagének általában az adott élőlény legtöbb sejtjében, minden korban azonos mértékben expresszállnak. Funkciójuk állandó és jól jellemzett (Sirover, 1997). Az egyik legstabilabb expresszióval rendelkező és leggyakrabban alkalmazott belső kontroll gén (referencia, vagy más néven háztartási gén) a GAPDH (glicerinaldehid-3-foszfát dehidrogenáz), ami alkalmassá teszi génexpressziós mintázatok normalizálására házityúk esetében. 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).

Kutatásaink célja az őshonos magyar házityúk fajták esetében univerzális recipiens fajtaként alkalmazni kívánt tyúkok embriójának az ivarszervfejlődését jobban megismerni. Ebből adódóan a jövőben tervezett kísérletekhez már egy jól megismert recipiens embriót használhatunk a génmegőrzési törekvésekhez.

Jelen vizsgálat célja volt megvizsgálni és összehasonlítani az ivarszervfejlődésben szerepet játszó gének expressziójának változását az embrionális fejlődés több fázisában. Összehasonlítani a génexpressziót hím és nőivarú gonádokban, a bal és jobb oldali ivarszervekben 8, 10, 12 napos korban. A kapott eredmények alapján következtetéseket vonhatnánk le további vizsgálatok tervezéséhez.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A kísérleteket a Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem, Genetika és Biotechnológia Intézet, Alkalmazott Embriológia és Össejt Biológia Csoportjának laboratóriumában végeztük. A vizsgálatokhoz fekete erdélyi kopasznnyakú házityúk fajtát használtunk. Az embrionális vizsgálatokhoz a tojásokat a Nemzeti Biodiverzitás- és Génmegőrzési Központ gödöllői telephelyű Haszonállat Génmegőrzési Intézetből (NBGK-HGI) szereztük be. A vizsgálatba bevont állatok extenzív körülmények között voltak tartva.

A tojásokat PL Machine keltetőgépben inkubáltuk az embrionális fejlődés megfelelő napjáig. A vizsgálati periódus az embrionális fejlődés 5. napjától a 15. napjáig

tartott. Minden embrióból öt mintát gyűjtöttünk naponta: izomszövetet, későbbi ivarmeghatározás céljából, bal- és jobboldali ivarszerveket, valamint a közvetlen alattuk elhelyezkedő bal- és jobboldali *mesonephros*-t (elővese). Naponta minimum 4 egyedből (2 hímivarú és 2 tojó embrióból) történt meg a mintavételezés. Összesen 62 embrióból izoláltunk mintákat. A szervek kioperálása mikroszkóp alatt történt, steril PBS pufferben, majd a méretüktől függően 300-500 μ l Trizol (ThermoFisher Scientific, USA) reagensbe helyeztük őket és inkubáltuk 10 percig szobahőmérsékleten, végül -70 °C-on tároltuk a további felhasználásig.

A szövetminták feltárását lízis puffer és proteináz K eleggyel végeztük. A DNS izolálásához, egy általános fenol-kloroformos extrakció alapú módszert használtunk. Az izolált DNS koncentrációját Nanodrop Spektrofotométerrel mértük le majd végül a PCR reakcióhoz szükséges 25 ng/ μ l-es koncentrációra hígítottuk.

A genetikai ivar meghatározásához MyTaQ mix-et (ThermoFisher Scientific, USA) használtunk. Ivarspecifikus CHD1 primerek (1. táblázat) segítségével szaporítottuk fel a női ivarnak megfelelő Z (461 bp) és W (322 bp) kromoszómákról, és a hímivarnak megfelelő W kromoszómáról íródó 322 bp hosszúságú amplikonokat. A PCR termékeket gélelektroforézissel vizsgáltuk 1,5%-os agaróz gélen.

A szervmintákból ezután RNS-t izoláltunk. A homogenizálást követően a Trizolhoz kloroformot adtunk, majd a nukleinsavat tartalmazó felülúszót, egy új csőbe pipettáztuk át. A nukleinsavat izopropanollal csaptuk ki, majd 75%-os etanollal tisztítottuk háromszor. Az RNS pelletet a DNS-hez hasonlóan nukleázmentes vízben oldottuk vissza és koncentrációmérést követően 25 ng/ μ l-re hígítottuk ki.

Olyan géneket választottunk ki a vizsgálatra, melyek expressziója a két ivarszervben, valamint a két ivarban az embrionális kor előrehaladtával változik. A kiválasztott gének a *DMRT1*, *SOX9*, *PITX2*, *17 β HSD*, *CYP19A1*, *ER α* voltak (1. táblázat). Ezek mindegyikére primereket terveztünk az NCBI adatbázist és a BLAST keresőt, valamint a Primer 3 Plus programot használva. Génenként az első és a második exon határára terveztük a primereket, úgy, hogy a termékek hossza 150-200 bp közé essen. A primereket a UCSC In-Silico PCR programmal ellenőriztük vissza. A beérkezett primereket PCR-rel, gélelektroforézissel valamint qPCR-el teszteltük. A primerek tesztelése után a következő génekkel végeztük el a további vizsgálatokat: *DMRT1*, *CYP19A1*. Ezeknek a primereknek a hatékonyságát is ellenőriztük. Végül a 10 napos ivarszerv mintákat megvizsgáltuk *DDX4* (*DEAD-box helicase 4*) és *DAZL* (*deleted in azoospermia like*) génekre is.

A vizsgálatra kiválasztott 8–10–12 napos ivarszerv RNS mintáiból cDNS-t írtunk a gyártó által meghatározott protokoll alapján (High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems), fejlődési állapotunként két hím és két tojó egyedet választottunk.

A qPCR reakcióhoz SYBR Green Master Mix-et (ThermoFisher Scientific, USA) használtunk, és Eppendorf (AG 22331 Hamburg) típusú készüléken történtek a qPCR mérések.

A vizsgálat során háztartási génként a *GAPDH*-t alkalmaztuk, ami a leggyakrabban használt házityúk referencia gén, valamint házityúk embrionális fibroblaszt (CEF) cDNS-t tettünk fel minden plate-re a futások összehasonlíthatósága érdekében. A relatív expressziókat 10 napos tojó bal oldali ivarszervből származó minta esetében mért expresszióikhoz viszonyítottuk, mert irodalmi adatok alapján ebben a korban, ivarban és oldalon minden géntől stabil expressziót várhattunk.

1. táblázat

Tervezett és alkalmazott primerek

Gén (1)	Azonosító (2)	Primer szekvencia (5' → 3') (3)		Termék méret (bp) (4)	T _m (°C) (5)
PITX2	395862	FW	5' - GGCTGGAGGTGCACACTATC - 3'	153	61,4
		RW	5' - GCTGCTGGCTGGTGAAGT - 3'		58,2
ESR1	396099	FW	5' - AAATGAACAGGGCAGCTTTG - 3'	169	55,3
		RW	5' - TGAAGTGGGAATGATGAAAGG - 3'		55,9
17βHSD	395641	FW	5' - GTGCCGGTGGAGAAGACC - 3'	190	60,5
		RW	5' - GCAGCAGCTCCAGTGTGTC - 3'		61,0
DMRT1	769693	FW	5' - GACTGCCAGTGCAGAAGTG - 3'	192	59,4
		RW	5' - CTGCAGGAGACAGGAGCTG - 3'		61,0
CYP19A1	414854	FW	5' - GAATTGGCCTCTCATTTCA - 3'	153	55,3
		RW	5' - CGTGAAATACGCTGGAGGAT - 3'		57,3
SOX9	374148	FW	5' - AGGAAGCTGGCTGACCAAGTA - 3'	156	59,4
		RW	5' - GTAGTCGGGGTGGTCCTTCT - 3'		61,4
GAPDH	374193	FW	5' - CAGATCAGTTTCTATCAGC - 3'	112	50
		RW	5' - TGTGACTTCAATGGTGACA - 3'		54,2
CHD1	395783	FW	5' - TATCGTCAGTTTCCTTTTCAGGT - 3'	Z: 461	54
		RW	5' - CCTTTTATTGATCCATCAAGCCT - 3'	W: 322	53,2
DDX4	395447	FW	5' - GAACCTACCATCCACCAGCA - 3'	113	59,38
		RW	5' - ATGCTACCGAAGTTGCCACA - 3'		59,96
DAZL	374054	FW	5' - TTGCTTGAAGGCCTCGTTT - 3'	136	57,66
		RW	5' - ATCCTTGGCAGGTTGTTGAC - 3'		58,38

Table 1: Designed and used primers

gene name (1); gene ID (2); primer sequence (3); product size, bp (4); T_m, °C (5)

Ezek a minták minden plate-en fent voltak. Minden markerre végeztünk negatív kontroll vizsgálatot is.

A három qPCR futás automatikusan beállított Threshold értékeit azonosra állítottuk manuálisan, az összehasonlíthatóság érdekében. A Realplex programból kinyert adatokat MultiD GenEx v.6 programmal elemeztük tovább. Első lépésként az ismétléseknek az átlag Ct értékeit határoztuk meg. Az átlagértékeket a belső kontrollként alkalmazott *GAPDH* értékeivel normalizáltuk. Végül a relatív expressziós értékeket a belső kontrollként használt 10 napos bal oldali tojó ivarszerv minta értékeivel számítottuk ki.

EREDMÉNYEK

A 8 napos embrionális ivarszerv vizsgálatánál a *DMRT1* relatív expressziója hímivar esetében magasabb, mint tojónál, azonban határozott különbségek nem mutathatók ki a bal és jobboldali gonádok között egyik ivar esetében sem. Az értékek a 10 napos referencia mintánál magasabbak. 10 napos korban a hím embrionális ivarszervekben mért *DMRT1* gén expressziója jelentős aszimmetriát mutat a bal oldali gonád irányában, míg tojóknál az értékek közel azonosak. A 12 napos embrionális ivarszerveknél, a *DMRT1* gén a hímek esetében maga-

sabban expresszált, mint a tojóknál és a bal oldalon valamivel szintén magasabb volt, mint a jobboldalon. Az értékek a referencia minta értékei körül voltak. Tojóknál az expressziós különbség minimális volt a két oldal között, valamint az értékek nem érték el a referencia szintjét.

A teljes vizsgálati időszakban mért *DMRT1* eredmények jelentős különbségeket mutatnak a két ivar között. Minden vizsgálati napon a hímivarnál kaptunk magasabb expressziós értéket, ahogy azt az irodalmi adatok alapján is vártuk. Mindkét oldalon és ivarnál megfigyelhető egy egységes mintázat, a 8. és 10. nap között az expresszió mértéke egységesen növekszik, majd a 10. és 12. nap között szintén egységesen csökken. A *DMRT1* relatív génexpressziós értékei az 1. ábrán láthatók.

A *CYP19A1* gén expressziója 8 napos embrionális korban, tojók esetében a jobboldali gonádban kétszer magasabb a bal oldalihoz viszonyítva. A 10 napos referencia mintánál alacsonyabb mind a két esetben. A 10 napos *CYP19A1* expresszió erősebb a tojóknál, hímivarban elenyésző mértékű. Tojóknál a referencia mintához közeli értékeket kaptunk. Érzékelhetően magasabb az expresszió a jobboldalon, majdnem a kétszerese, mint a baloldali gonádban. A 12 napos embrionális ivarszervek vizsgálatánál az aromatáz expresszió tojók esetében mindkét oldalon erősebb, mint a referencia mintában, illetve aszimmetria is megfigyelhető, a jobbgonádban kaptunk jóval magasabb értékeket.

1. ábra *DMRT1* relatív expressziója 8 – 10 – 12 napos embrionális ivarszervben GAPDH háztartási génre normalizálva. Kontroll mintaként 10 napos tojó bal oldali gonádot használtuk (piros vonal)

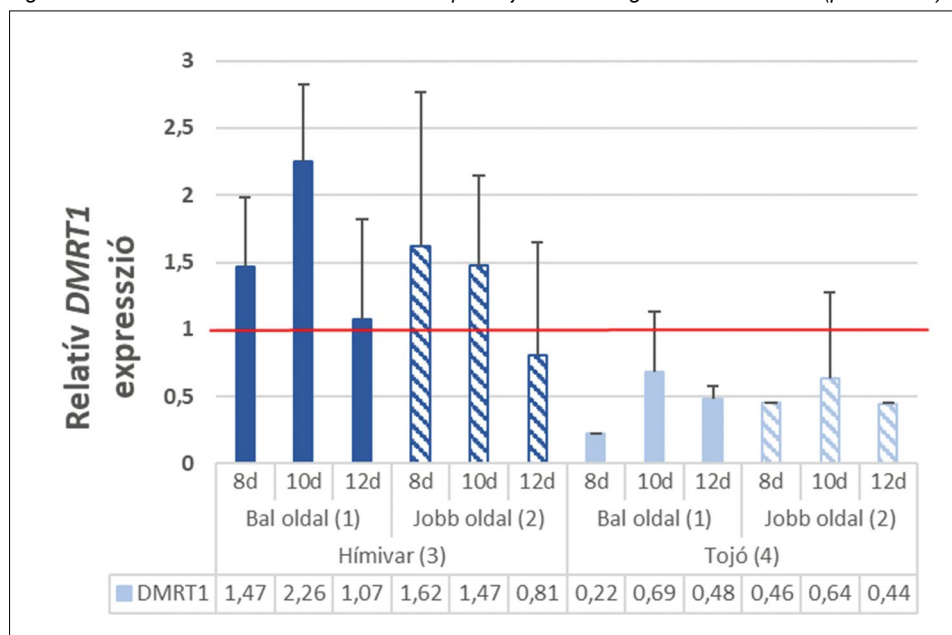


Figure 1. *DMRT1* relative gene expression at 8 – 10 – 12 days old embryonic gonads in both sexes normalised with GAPDH housekeeping gene. The reference sample was the d10 left female gonad, (red line).

left side (1); right side (2); male (3); female (4)

A *CYP19A1* gén expressziójáról a teljes vizsgálati időszakban, elmondható, hogy a kor előrehaladtával mind a két oldali gonádban egyre erősödő génműködés figyelhető meg tojóknál. Minden vizsgált napon aszimmetria volt megfigyelhető a génexpresszióban. Minden esetben a jobboldalon kaptunk magasabb expressziós értékeket. A kapott értékek megfelelnek a szakirodalmi adatok alapján várt értékeknek. A hímivarban is megfigyelhető egy enyhe expresszió, de olyan alacsony szinten, ami nem alkalmas következtetések levonására. A *CYP19A1* relatív génexpressziós értékei a 2. ábrán láthatók.

A 10 napos embrionális ivarszerv mintákat megvizsgáltuk *DDX4* és *DAZL* ősvarsejt specifikus markerekre is, melyek eredményei a 3. ábrán láthatók. *DDX4* esetében a baloldali gonád expressziós értékei közel hasonlóak, a referencia minta értékéhez közel vannak. A jobboldali ivarszerv csak hímivarban volt megvizsgálható, melynek értéke fele annyi, mint a bal oldali gonád esetében. A *DAZL* gén expressziója hímivar bal gonádjában több mint kétszer olyan erősen expresszált, mint a jobboldalon. A tojó ivarú bal oldali gonád értékei a referenciával közel azonos eredményeket mutattak.

2. ábra *CYP19A1* gén relatív expresszió értékei 8 – 10 – 12 napos embrionális ivarszervben GAPDH háztartási génre normalizálva. GAPDH háztartási génre normalizálva. Kontroll mintaként 10 napos tojó bal oldali gonádot használtuk (piros vonal)

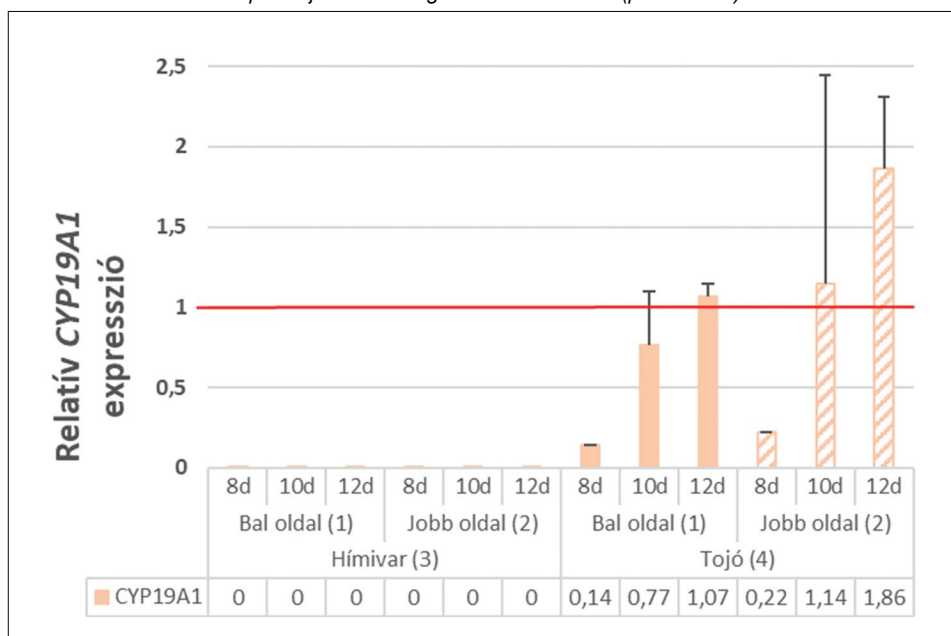


Figure 2. *CYP19A1* relative gene expression at 8 – 10 – 12 days old embryonic gonads in both sexes, normalised with GAPDH housekeeping gene. The reference sample was the d10 left female gonad, (red line).

left side (1); right side (2); male (3); female (4)

3. ábra DDX4 és DAZL gének relatív expressziós értékei 10 napos embrionális ivarszervben GAPDH háztartási génre normalizálva. Kontroll mintaként 10 napos tojó bal oldali gonádot használtuk (piros vonal)

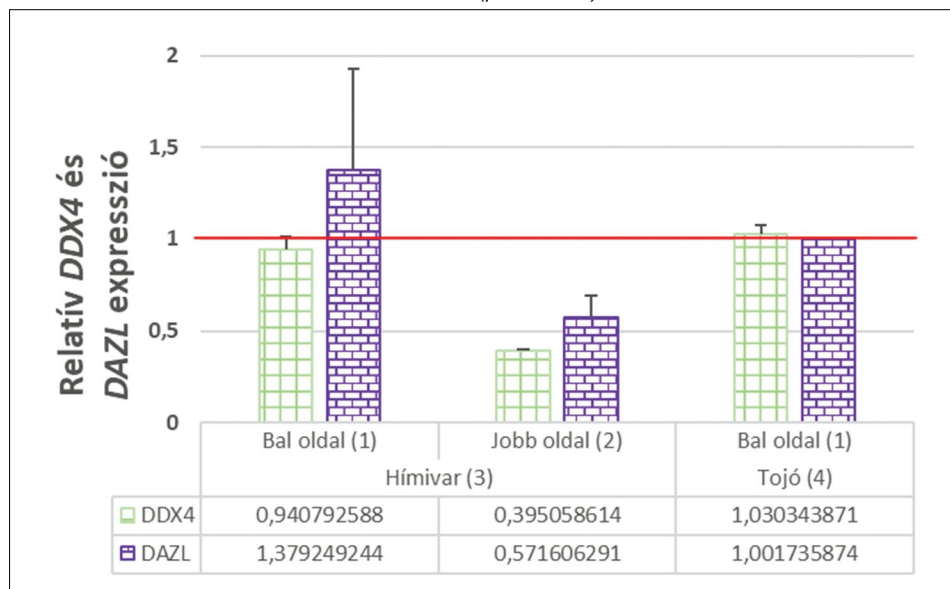


Figure 3. DDX4 and DAZL relative gene expressions at 10 days old embryonic gonads in both sexes normalised with GAPDH housekeeping gene. The reference sample was the d10 left female gonad, (red line).

left side (1); right side (2); male (3); female (4)

KÖVETKEZTETÉSEK

A vizsgálati időszakban mind a *DMRT1*, mind a *CYP19A1* markerek esetében, 8 napos kortól kezdve jól nyomon követhető volt az expressziós értékek változása. Jól megfigyelhető volt a különbség a két ivar között, ahol a *DMRT1* a hímivarban mutatott magasabb értékeket az ivari fejlődés korai szakaszában. Ez a gén az egyik kulcseleme az embriók ivari elköteleződésének, így eredményeink megfelelnek az általánosan leírt adatoknak.

Aromatáz esetében, az expressziós mintázatban a *DMRT1*-gyel ellentétes eredményeket kaptunk. A tojóknban volt megfigyelhető a magasabb génexpresszió, mely eredmény jól reprezentálja az irodalomban is fellelhető adatokat, miszerint az aromatáz gén felülszabályozódik az ivarszervekben, a hím ivarhoz képest.

Mind a *DAZL*, mind a *DDX4* esetében magasabban expressziót találtunk a bal oldali gonádban, mivel mind a két ivar esetében ezen az oldalon több ősvarsejt található. Így real-time PCR-rel is bizonyítottuk, hogy a bal oldali ivarszervben mind hím, mid pedig tojó ivarú embriók ivarszervében több ősvarsejt található.

Az eddig kapott eredményeinkből levonható következtetések a szakirodalomban fellelhető adatokkal jó egyezést mutatnak. További markerek vizsgálatával még pontosabb képet kaphatunk a kiválasztott őshonos fajta embrionális ivar-

szerv fejlődésének genetikai hátteréről. Tervezzük a kísérletben vizsgált minták számának növelését, hogy a kapott különbségek statisztikai módszerekkel is alátámaszthatóak legyenek.

Kutatásunk eredményei hozzájárulhatnak őscsírasejt alapú házityúk génbank sikeres létrehozásához.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A kutatásokat a GÉNNET21 (VEKOP-2.3.2-16 - 2016-00012), 2019-2.1.11-TÉT-2019-00036 és NKFIH OTKA FK124708 azonosítójú pályázataink, továbbá az Agrár-biotechnológia és precíziós nemesítés az élelmiszerbiztonságért című és RRF-2.3.1-21-2022-00007 azonosító számú pályázat támogatták.

IRODALOMJEGYZÉK

- Andrews, J. E. - Smith, C. A. - Sinclair, A. H. (1997): Sites of estrogen receptor and aromatase expression in the chicken embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 108. 182–190. DOI: <https://doi.org/10.1006/gcen.1997.6978>.
- Bogenfürst, F. - Horn, P. - Meleg, I. - Mihók, S. - Sütő, Z. (2000): Állattenyésztés 2. - Baromfi, Haszon-galamb. Szerk.: Horn P. Mezőgazda Kiadó.
- Burke, W. H. (1973): Testicular asymmetry in the turkey. *Poult. Sci.*, 52. 1652–1654. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps.0521652>.
- Calhim, S. - Birkhead, T. S. (2009): Intraspecific variation in testis asymmetry in birds: evidence for naturally occurring compensation. *Proc. Biol. Sci.*, 276. 2279–2284. DOI: <https://doi.org/10.1098/rspb.2009.0134>.
- Carlson, N. - Stahl, A. (1985): Origin of the somatic components in chick embryonic gonads. *Arch. Anat. Microsc. Morphol. Exp.*, 74. 52–59.
- Clinton, M. (1998): Sex determination and gonadal development: a bird's eye view. *J. Exp. Zool.*, 281 (5): 457–65. DOI: [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, M. - Haines, L. (2001): An overview of factors influencing sex determination and gonadal development in birds. *CMLS, Cell. Mol. Life Sci.*, 55. 876–886. DOI: <https://doi.org/10.1007/s000180050341>.
- Crews, D. - Bergeron, M. J. (1994): Role of reductase and aromatase in sex determination in the red-eared slider (*Trachemys Scripta*), a turtle with temperature-dependent sex determination. *J. Endocrin.*, 143. 279–289. DOI: <https://doi.org/10.1677/joe.0.1430279>.
- Cutting, A. D. - Bannister, S. C. - Doran, T. J. - Sinclair, A. H. - Tizard, M. V. - Smith, C. A. (2012): The potential role of micro RNAs in regulating gonadal sex differentiation in the chicken embryo. *Chromosome Res.*, 20. 201–213. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10577-011-9263-y>.
- Elbrecht, A. - Smith, R. G. (1992): Aromatase enzyme activity and sex determination in chickens. *Science*, 255. 467–470. DOI: <https://doi.org/10.1126/science.1734525>.
- Guioli, S. - Nandi, S. - Zhao, D. - Burgess-Shannon, J. - Lovell-Badge, J. - Clinton, M. (2014): Gonadal asymmetry and sex determination in birds. *Sex. Dev.*, 8. 227–242. DOI: <https://doi.org/10.1159/000358406>.
- Hudson, Q. J. - Smith, C. A. - Sinclair, A. H. (2005): Aromatase inhibition reduces expression of FOXL2 in the embryonic chicken ovary. *Dev. Dyn.*, 233. 1052–1055. DOI: <https://doi.org/10.1002/dvdy.20388>.

- Intarapat, S.* (2011): Isolation and characterisation of chick embryonic primordial germ cells. University College London.
- Intarapat, S. - Stern, C. D.* (2013): Sexually dimorphic and sex-independent left-right asymmetries in chicken embryonic gonads. *PLoS. ONE*, 8 (7): 1–8. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0069893>.
- Ioannidis, J. - Taylor, G. - Zhao, D. - Liu, L. - Idoko-Akoh, A. - Gong, D. - Lovell-Badge, R. - Guioli, S. - McGrew, M. J. - Clinton, M.* (2021): Primary sex determination in birds depends on DMRT1 dosage, but gonadal sex does not determine adult secondary sex characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 118. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1073/pnas.2020909118>.
- Jean, C. - Oliveira, N. M. M. - Intarapat, S. - Fuet, A. - Mazoyer, C. - De Almeida, I. - Trevers, K. - Boast, S. - Aubel, P. - Bertocchini, F. - Stern, C. D. - Pain, B.* (2015): Transcriptome analysis of chicken es, blastodermal and germ cells reveals that chick ES cells are equivalent to mouse ES cells rather than EpiSC. *Stem. Cell. Res.*, 14. 54–67. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.11.005>.
- Jin, K. - Zuo, Q. - Song, J. - Zhang, Y. - Chen, G. - Li, B.* (2020): CYP19A1 (Aromatase) dominates female gonadal differentiation in chicken (*Gallus gallus*) embryos sexual differentiation. *Biosci. Rep.*, 40. 1–10. DOI: <https://doi.org/10.1042/BSR20201576>.
- Kent, J. - Wheatley, S. C. - Andrews, J. E. - Sinclair, H. A. - Koopman, P.* (1996): A male-specific role for SOX9 in vertebrate sex determination. *Development*, 122. 2813–2822. DOI: <https://doi.org/10.1242/dev.122.9.2813>.
- Kitano, T. - Takamune, K. - Nagahama, Y. - Abe, S. I.* (2000): Aromatase inhibitor and 17 α -methyltestosterone cause sex-reversal from genetical females to phenotypic males and suppression of P450 aromatase gene expression in japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Mol. Reprod. Dev.*, 56. 1–5. DOI: [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-2795\(200005\)56:1<1::AID-MRD1>3.0.CO;2-3](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-2795(200005)56:1<1::AID-MRD1>3.0.CO;2-3).
- Koba, N. - Ohfujii, T. - Ha, Y. - Mizushima, S. - Tsukada, A. - Saito, N. - Shimada, K.* (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. *J. Poult. Sci.*, 45. 132–138. DOI: <https://doi.org/10.2141/jpsa.45.132>.
- Van Limborgh, J.* (1970): Primary asymmetry of the gonadal primordia in the duck. *Z. Anat. Entwicklungsgesch.*, 130. 37–79.
- Van Limborgh, J.* (1954): Experimental study on gonadal asymmetry in female birds. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 98. 807–809.
- Van Limborgh, J.* (1960): The origin of the primary asymmetry of bird gonads. *Ned. Tijdschr. Geneesk.*, 104. 2442–2443.
- Van Limborgh, J. - Van Fassen* (1960): The asymmetry of the gonads in duck embryos experimentally turned on their right side. *Acta. Morphol. Neerl. Scand.*, 3. 79–91.
- Maraud, R. - Vergnaud, O. - Rashedi, M.* (1987): Structure of the right testis of sexually mature genetically female fowl experimentally masculinized during embryonic life and submitted to a posthatching left castration. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 68. 208–215. DOI: [https://doi.org/10.1016/0016-6480\(87\)90031-1](https://doi.org/10.1016/0016-6480(87)90031-1).
- McCarrey, J. R. - Abbott, U. K.* (1979): Mechanisms of genetic sex determination, gonadal sex differentiation, and germ-cell development in animals. *Adv. Genet.*, 20. 217–290. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0065-2660\(08\)60547-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2660(08)60547-7).
- Mellor, D. J. - Diesch, T. J.* (2007): Birth and hatching: key events in the onset of awareness in the lamb and chick. *N. Z. Vet. J.*, 55. 51–60. DOI: <https://doi.org/10.1080/00480169.2007.36742>.
- Mellor, D. J. - Diesch, T. J. - Johnson, C. B.* (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.
- Morais da Silva, S. - Hacker, A. - Harley, V. - Goodfellow, P. - Swain, A. - Lovell-Badge, R.* (1996): Sox9 expression during gonadal development implies a conserved role for the gene in testis differentiation in mammals and birds. *Nat. Genet.*, 14. 62–68. DOI: <https://doi.org/doi.org/10.1038/ng0996-62>.

- Moriyama, S. - Ogihara, J. - Kato, J. - Hori, T. - Mizuno, S. (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. *J. Biochem.*, 139. 91–97. DOI: <https://doi.org/10.1093/jb/mvj004>.
- Nakabayashi, O. - Kikuchi, H. - Kikuchi, T. - Mizuno, S. (1998): Differential expression of genes for aromatase and estrogen receptor during the gonadal development in chicken embryos. *J. Mol. Endocrinol.*, 20. 193–202. DOI: <https://doi.org/10.1677/jme.0.0200193>.
- Oréal, E. - Mazaud, S. - Picard, J. Y. - Magre, S. - Carré-Eusébe, D. (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. *Dev. Dyn.*, 225. 221–232. DOI: <https://doi.org/10.1002/dvdy.10153>.
- Pace, H. C. - Brenner, C. (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 Biol.*, 4. DOI: <https://doi.org/10.1186/gb-2003-4-3-r18>.
- Péczei, P. (2013): Szex determináció és ivari differenciálódás. *Madár szaporodásbiológia*, 13–31.
- Raymond, S. - Kettlewell, J. R. - Hirsch, B. - Bardwell, V. J. - Zarkower, D. (1999): Expression of *Dmrt1* in the genital ridge of mouse and chicken embryos suggests a role in vertebrate sexual development. *Dev. Biol.*, 215. 208–220. DOI: <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9461>.
- Reed, K. J. - Sinclair, H. A. (2002): FET-1: a novel W-Linked, female specific gene up-regulated in the embryonic chicken ovary. *GEP.*, 2. 83–86. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(02\)00288-5](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(02)00288-5).
- Romanoff, A. L. (1960): The avian embryo, structural and functional development. New York: Macmillan.
- Romanoff, A. L. (1961): The avian embryo : structural and functional development. *AIBS. Bulletin*, 11 (2): 42–43.
- Sakata, N. - Tamori, Y. - Wakahara, M. (2005) P450 aromatase expression in the temperature-sensitive sexual differentiation of salamander (*Hynobius retardatus*) gonads. *Int. J. Dev. Biol.*, 49. 417–425. DOI: <https://doi.org/10.1387/ijdb.041916ns>.
- Sirover, M. A. (1997): Role of the glycolytic protein, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, in normal cell function and in cell pathology. *J. Cell. Biochem.*, 66. 133–140. DOI: [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? *Sex. Dev.*, 1. 279–285. DOI: <https://doi.org/10.1159/000108934>.
- Smith, C. A. - Andrews, J. E. - Sinclair, A. H. (1997): Gonadal sex differentiation in chicken embryos: expression of estrogen receptor and aromatase genes. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 60. 295–302. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0960-0760\(96\)00196-3](https://doi.org/10.1016/S0960-0760(96)00196-3).
- Smith, C. A. - Katz, M. - Sinclair, A. H. (2003): DMRT1 is upregulated in the gonads during female-to-male sex reversal in ZW chicken embryos. *Biol. Reprod.*, 68. 560–570. DOI: <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.007294>.
- Smith, C. A. - McClive, P. J. - Hudson, Q. - Sinclair, A. H. (2005): Male-specific cell migration into the developing gonad is a conserved process involving PDGF signalling. *Dev. Biol.*, 284. 337–350. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.05.030>.
- Smith, C. A. - Roeszler, K. N. - Sinclair, A. H. (2009a): Genetic evidence against a role for W-linked histidine triad nucleotide binding protein (HINTW) in avian sex determination. *Int. J. Dev. Biol.*, 53. 59–67. DOI: <https://doi.org/10.1387/ijdb.082742cs>.
- Smith, C. A. - Roeszler, K. N. - Ohnesorg, T. - Cummins, D. M. - Farlie, P. G. - Doran, T. J. - Sinclair, H. A. (2009b): The avian Z-linked gene DMRT1 is required for male sex determination in the chicken. *Nature*, 461. 267–271. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature08298>.
- Smith, C. A. - Sinclair, A. H. (2001): Sex determination in the chicken embryo. *J. Exp. Zool.*, 290. 691–699. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1119>.
- Smith, C. A. - Sinclair, A. H. (2004): Sex determination: insights from the chicken. *BioEssays*, 26. 120–132. DOI: <https://doi.org/10.1002/bies.10400>.

- Stahl, A. - Carlon, N.* (1973): Morphogenesis of the sex cords and the significance of the medullary zone of the gonad in the chick embryo. *Acta. Anat. (Basel)*, 85. 248–274.
- Tagami, T. - Miyahara, D. - Nakamura, Y.* (2017): Avian primordial germ cells. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 1001. 1–18. DOI: https://doi.org/10.1007/978-981-10-3975-1_1.
- Takada, S. - Ota, J. - Kansaku, N. - Yamashita, H. - Izumi, T. - Ishikawa, M. - Wada, T. - Kaneda, R. - Choi, Y. L. - Koinuma, K. - Fujiwara, S. - Aoki, H. - Kisanuki, H. - Yamashita, Y. - Mano, H.* (2006): Nucleotide sequence and embryonic expression of quail and duck Sox9 Genes. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 145. 208–213. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2005.08.009>.
- Theodosiou, N. A.* (2006): The Atlas of chick development, second edition. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Animal*, 42. 281. DOI: <https://doi.org/10.1290/050601.1>.
- Vaillant, S. - Dorizzi, M. - Pieau, C. - Richard-Mercier, N.* (2001): Sex reversal and aromatase in chicken. *J. Exp. Zool.*, 290. 727–740. DOI: <https://doi.org/10.1002/jez.1123>.
- Yamamoto, I. - Tsukada, A. - Saito, N. - Shimada, K.* (2003): Profiles of mRNA expression of genes related to sex differentiation of the gonads in the chicken embryo. *Poult Sci.*, 82. 1462–1467. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/82.9.1462>.
- Yang, Y. - Gong, P. - Feng, Y. P. - Li, S. J. - Peng, X. L. - Ran, Z. P. - Qian, Y. G. - Gong, Y. Z.* (2013): Temporospatial expression of DMRT1 in chicken urogenital system (*Gallus gallus*) using whole mount in situ hybridization. *Acta. Biol. Hung.*, 64. 161–168. DOI: <https://doi.org/10.1556/ABiol.64.2013.2.3>.
- Yoshioka, H. - Ishimaru, Y. - Sugiyama, N. - Tsunekawa, N. - Noce, T. - Kasahara, M. - Morohashi, K. I.* (2005): Mesonephric FGF signaling is associated with the development of sexually indifferent gonadal primordium in chick embryos. *Dev. Biol.*, 280. 150–161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.01.011>.

Érkezett: 2022. november

Szerzők címe: Tóth A. – Hoffmann O. – Gócza E. – Tóth R.
Magyar Agrár- és Élettudományi Egyetem
Szent István Campus
Genetika és Biotechnológia Intézet
Állatbiotechnológia Tanszék

Authors' adress: Hungarian University of Agriculture and Life Science
Szent István Campus
Institute of Genetics and Biotechnology
Animal Biotechnology Department
H-2100 Gödöllő, Szent-Györgyi Albert str. 4.
gocza.elen@uni-mate.hu
goczaelen@me.com