



## Balık Kök Hücreleri: Sınıflandırma, Kaynakları, Karakteristik Özellikleri ve Uygulama Alanları

Şehriban ÇEK<sup>1\*</sup>, Mei SHANG<sup>2</sup>, Dayan A. PERERA<sup>3</sup>, Baofeng SU<sup>2</sup>, Rex A. DUNHAM<sup>3</sup>

<sup>1</sup>İskenderun Teknik Üniversitesi Deniz Bilimleri ve Teknoloji Fakültesi, 31200 İskenderun/HATAY

<sup>2</sup>Ministry of Agriculture Key Laboratory of Freshwater Aquatic Biotechnology and Breeding, Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070, China

<sup>3</sup>Auburn University, Alabama Agricultural Experiment Station, Department of Fisheries and Allied Aquacultures, AL 36849, USA

### ÖZ

Kök hücreler farklılaşmamış hücre sınıfından, kendilerini yenileyebilme özelliğine sahip, özelleşmiş hücrelere farklılaşabilen hücrelerdir. Balıklarda ilk kök hücre çalışmaları 1992 yılında zebra balığı ile başlamıştır. Bu derlemede balık kök hücrelerin sınıflandırılması, kaynakları, önemleri, karakteristik özellikleri ve uygulama alanlarına değinilmiştir.

**Anahtar kelimeler:** Hücre hattı, yarı-klonlama, transplantasyon, farklılaşma, eşey hücreleri

### MAKALE BİLGİSİ

#### DERLEME

Geliş : 23.03.2016

Düzeltilme : 11.08.2016

Kabul : 12.08.2016

Yayın : 20.08.2016



DOI: 10.17216/LimnoFish-5000182817

#### \* SORUMLU YAZAR

sehriban101@hotmail.com

Tel : +90 536 987 67 77

Faks : +90 326 614 18 77

### Fish Stem Cells: Classification, Resources, Characteristics and Application Areas

**Abstract:** Stem cells are a class of undifferentiated cells, have the potential for self-renewal that can differ to the specialized cells. First studies on stem cells in fish started with zebra fish in 1992. In this review, classification, resources, vital importance, characteristics and application areas of fish stem cell were clarified.

**Keywords:** Cell line, semi-cloning, transplantation, differentiation, germ cells

#### Alıntılama

Çek Ş, Shang M, Perera DA, Su B, Dunham RA. 2016. Balık kök hücreleri: Sınıflandırma, kaynakları, karakteristik özellikleri ve uygulama alanları. LimnoFish. 2(2):107-119. doi: 10.17216/LimnoFish-5000182817

### Giriş

Canlı organizmalarda kök hücreler, bölünerek kendilerini yenileme ve aynı zamanda özelleşmiş hücrelere dönüşebilen, farklılaşma yetenekleri olan hücrelerdir. Kendilerini yenileyebilme ve diğer hücrelere dönüşebilme yetenekleri, onları vücuttaki diğer hücrelerden farklı kılmaktadır. Farelerden ilk kök hücrelerin elde edilmesi ile birlikte, temel araştırmalarda, tıp alanında, hayvan biyoteknolojilerinde kök hücreler araştırmaların odak noktası olmuştur (Evans ve Kaufman 1981). İnsan embriyonik kök hücreleri 1998 yılında Thomson ve arkadaşları tarafından elde edilmişken, balık kök hücreleri üzerindeki araştırmalar 25 yıl önce

başlamıştır. Balık kök hücreleri üzerine yapılan çalışmaların gözden geçirildiği birkaç derleme bulunmaktadır (Hong vd. 2011; Wong ve Collodi 2012; Yoshizaki vd. 2012). Primordial germ hücreleri bir çeşit kök hücre olarak bilinmektedir (Nagasawa vd. 2013; Nakajima vd. 2014). *Salmo salar* türünde vasa, dnd ve lenfosit antijen 75 genlerinin bu kök hücrelerin belirteçleri olup olmadıkları Nagasawa vd. (2013) tarafından araştırılmıştır. *Thunnus orientalis* balıklarında dnd geninin spermatogonial kök hücre belirteci olduğu Yazawa vd. (2013) tarafından ileri sürülmüştür. Germ kök hücre hattının mikro çevre ile ilişkileri gökkuşağı alabalıkları (*Oncorhynchus mykiss*)'nda

Nakajima vd. (2014) tarafından araştırılmıştır. Gökkuşluğu alabalıklarında spermatogonial kök hücre transferi Shikina vd. (2013) ve Sato vd. (2014) tarafından tilapia (*Oreochromis niloticus*)'larda germ kök hücre transferi ise Farlora vd. (2013) tarafından araştırılmıştır. Spermatogonial kök hücreler Hayashi vd. (2014) tarafından araştırılmış ve yan hücre popülasyonları tarafından zenginleştirildikleri kaydedilmiştir. Okutsu vd. (2015) kök hücre transplantasyon tekniğini kullanarak YY süper gökkuşluğu alabalıklarını elde etmeyi başarmışlardır. Oogonial ve spermatogonial kök hücrelerin ataları olan primordial germ hücrelerinin gonadlara taşınmaları, çoğalmaları ve kolonize olmaları sarıkuyruk kral balıkta (*Seriola lalandi*) Fernández vd. (2015) tarafından çalışılmıştır. Kanal (*Ictalurus punctatus*) ve mavi kedi (*I. furcatus*) balıklarında spermatogonial kök hücre belirteçleri Shang vd. (2015) tarafından araştırılmıştır. Çalışma sonucunda yazarlar *Plzf* ve *Integrin6* genlerinin spermatogonial kök hücre belirteçleri olarak kullanılabilirliğini önermişlerdir.

Bu derlemede balık kök hücreleri hakkında genel bilgilere, özellikle kök hücre sınıflandırması, kaynakları, özellikleri ve biyoteknolojideki kullanım alanlarına değinilecektir.

### Kök hücre çeşitleri

Kök hücreler farklılaşma yeteneklerine göre totipotent, pluripotent, multipotent, oligopotent ve unipotent olmak üzere beş farklı kategoriye ayrılmıştır. Erkek balığın spermi ile dişi balığın yumurtasının birleşmesi ile oluşan döllenmiş yumurta hücresi veya zigot tek başına tüm organizmayı meydana getirebilecek genetik potansiyele sahiptir ve totipotent olarak tanımlanmıştır. Totipotent kök hücreler bütün bir organizmayı oluşturabilecek kapasiteye sahiptirler. Balık embriyonik kök hücreleri, orta-blastula aşamasında olan embriyolardan elde edilir ve vücuttaki tüm doku ve organlara dönüşebilen anlamına gelen totipotent kök hücre denilmektedir. Balıklarda ilk embriyonik kök hücre ise Collodi vd. (1992) tarafından elde edilmiştir. Bu hücreler tam bir balığı oluşturabilecek potansiyele sahiptirler (Wakamatsu vd. 1993; Hong vd. 2004). Pluripotent hücre ise, vücuttaki fazla sayıda hücrelere farklılaşabilen hücreler olarak tanımlanmıştır ve medaka (*Oryzias latipes*) balıklarında Hong vd. (1996) tarafından çalışılmıştır. Yine aynı balıklar üzerine pluripotent kök hücre hattı Wakamatsu vd. (1994) tarafından araştırılmıştır. Pluripotent bir hücrenin morfolojik özellikleri Alvarez vd. (2007) tarafından tanımlanmıştır. Bütün hücrelere farklılaşabilme

yeteneğinde olan ancak otonom embriyo oluşturamayan kök hücreler için omnipotent (Denker 2014) veya plenipotent (Condic 2014) tanımının kullanılması önerilmiştir. Diğer bir ifade ile Condic (2014) pluripotent kök hücre terimi yerine plenipotent teriminin kullanılması gerektiğini, Denker (2014) ise pluripotent terimi yerine omnipotent teriminin kullanılması gerektiğini önermiştir.

Balıklarda totipotent ile pluripotent kök hücre arasındaki başlıca farklılık, pluripotent hücreler vücutta birçok doku ve organa farklılaşabilir ancak yeni bir canlıyı oluşturabilecek kapasiteye sahip değildirler. Multipotent kök hücre ise, özelleşmiş birkaç hücre tipine farklılaşabilen kök hücrelerdir. Örneğin dişi balıklardan elde edilen oogonia ve erkek balıklardan elde edilen spermatogonia birer multipotent kök hücre olarak tanımlanmıştır (Yoshizaki vd. 2010a, b; Hayashi vd. 2014; Shang vd. 2015). Gökkuşluğu alabalığında yapılan *in vitro* ve *in vivo* çalışmalarda oogoninin yumurta ve sperm hücrelerine dönüşebildiği (Yoshizaki vd. 2010a), aynı şekilde spermatogoninin de sperm ve yumurta hücresine dönüşebildiği gösterilmiştir (Yoshizaki vd. 2010b). Aynı balık türü üzerinde Okutsu vd. (2006) yapmış oldukları çalışmalarında spermatogoninin fonksiyonel yumurta hücresine dönüştüğünü kaydetmişlerdir. Balıklarda kan kök hücreleri zebra (*Danio rerio*) türünde Ma vd. (2012) tarafından çalışılmış ve multipotent özellikleri tanımlanmıştır. Bir hücrenin multipotent olup olmadığı öncelikle o hücrenin içinde bulunduğu mikro çevreden (kendisini çevreleyen, dokulardan ve diğer hücrelerden) izole edilebilmesi ve tek hücre düzeyinde kendisini yenileyebilme ve başka hücrelere farklılaşabilme kapasitesi ile belirlenebilmektedir. Oligopotent kök hücreler, multipotent kök hücrelerden daha fazla özelleşmiş olan hücrelerdir. Bu hücreler sınırlı sayıda hücrelere farklılaşabilmektedirler. Unipotent kök hücreler ise en düşük farklılaşma kapasitesine sahip olan hücreler olarak tanımlanmıştır. Bu tür kök hücreler tek bir hücreye farklılaşabilmektedir. Örneğin unipotent hepatoblast hücreler kendilerini yenileyip karaciğer dokusunun büyük çoğunluğunu oluşturan hepatosit hücrelere dönüşebilmektedirler (Brian 2014; He vd. 2014; Choi vd. 2015).

### Kök hücrelerin kaynakları

Balıklarda kök hücreler üç farklı kaynaktan elde edilmektedir. Bunlardan ilki balık embriyosundan, diğer bir ifade ile yumurta döllendikten bir süre sonra, orta-blastula aşamasında olan embriyodan elde edilmekte ve buna embriyonik kök hücre denilmektedir

(Yi vd. 2009; Dash vd. 2010). Orta-blastula aşamasına gelme süresi balık türleri arasında ve su sıcaklığına bağlı olarak farklılık göstermektedir. Orta-blastula süresi, gökkuşağı alabalığında, yumurta döllendikten sonra 6 saattir (Yoshizaki vd. 2010a). Ho vd. (2014) tarafından zebra balığından elde edilen embriyonik kök hücreler, besleyici bir tabakaya ihtiyaç duyulmadan iki yıl süresince yaşatılmıştır. Orta-blastula aşamasında medaka (*Oryzias dancena*) balığından elde edilen embriyonik kök hücrelerin aktiviteleri Lee vd. (2015) tarafından çalışılmıştır.

İkincisi ise, ileride sperm veya yumurta hücresi olabilecek üreme hücreleri olan primordiyal eşey hücreleri (PEH'leri) kök hücre kaynağı olarak kullanılmaktadır (Lacerda vd. 2006; Fan vd. 2008; Hong vd. 2010; Tanaka vd. 2011; Hong vd. 2016). Medaka balığında Dnd, PEH'leri kök hücrelerin belirteci olduğu Hong vd. (2016) tarafından ileri sürülmüştür. Kök hücrelerin bir diğer kaynağı ise ergin balıklarda bulunan ergin kök hücrelerdir. Ergin kök hücreler, balık yaşadığı süre boyunca kendilerinin kopyalarını üreterek çoğalmaktadır. Bu hücreler buldukları dokulardaki yaşlanan, hastalanan veya ölen hücrelerin yerine yenilerini üreterek yedek hücre kaynakları olarak görev yapmaktadırlar. Balıklarda ergin kök hücreler ve kan kök hücreleri Catton (2012) ve Ma vd. (2012) tarafından çalışılmıştır. Ausoni ve Sartore (2009) yapmış oldukları derlemelerinde balıklarda ve memelilerde kalp kök hücreleri üzerine yapılmış olan çalışmalara yer vermişlerdir. Jopling vd. (2010) zebra balığı üzerine yapmış oldukları çalışmalarında, kalbin kendisini yenilemesi (rejenerasyonu) üzerine kök hücrelerin çok fazla etkisi olmadığını öne sürmüşlerdir. Zebra balıklarında böbreğin rejenerasyonu ise Diep vd. (2011) tarafından araştırılmıştır. Galindo-Villegas (2016) yapmış olduğu derlemesinde hematopoetik kök hücrelerin araştırılmasında zebra balığının iyi bir model teşkil ettiğini önermiştir. Hall vd. (2016) ise derlemelerinde hematopoetik kök hücreler üzerine yapılan araştırmalara değinmişlerdir. Kobayashi vd. (2016) kemikli balıklarda hematopoetik kök hücrelerin izolasyonunu ve sınıflandırmasını yapmışlardır. Zebra balıkları üzerine yapılan çalışmalarda kan kök hücrelerinin kemik iliğinden ziyade böbreklerde depolandıkları De Jong vd. (2011) tarafından rapor edilmiştir. Sinir kök hücreleri, zebra balığında Grandel vd (2006), retinal kök hücreler ise (Otteson ve Hitchcock 2003; Wan vd. 2016) tarafından çalışılmıştır.

### Balık kök hücreleri neden önemlidir?

Kök hücre teknolojisini geliştirmek için balıkların model olarak kullanılması önerilmiştir. Kök hücre çalışmalarında, diğer omurgalılarda birçok zorlukla karşılaşılmasına rağmen, teknik üstünlüklerinden dolayı balıklarda bu sorunlarla karşılaşılmaz. Yüksek yumurta verimliliği, büyük şeffaf embriyolar, kısa nesil verme süresi ve hızlı gelişim gibi teknik üstünlükleri vardır. Bu özellikler manipülasyonları kolaylaştırır ve erken gelişim aşamalarında kök hücre işaretleyicilerinin fenotipik olarak incelemelerine izin verir (MeiSheng vd. 2010; Hong vd. 2011). Balıklar temel moleküler çalışmalarda, hücrenel, gelişimsel biyolojide ve ticari amaçlar için denek olarak kullanılmaktadır. Omurgalılarda, memelilerde ve insanlarda hematopoetik kök hücre çalışmaları için zebra balığının kullanılması önerilmiştir (Hall vd. 2016; Galindo-Villegas, 2016). İnsanlarla ilgili genlerin fonksiyonlarını araştırmada fareler yerine omurgalılardan zebra (Taylor vd. 2010; Prykhozhiy vd. 2016) ve medaka (MeiSheng vd. 2010) balıklarının model olarak kullanılmaları önerilmiştir. Zebra balığında bulunan genlerin büyük çoğunluğunun insanlarda bulunan genlerin homologları olduğu ve insan sağlığı ve hastalıkları hakkında daha fazla bilgi edinmenin zebra balığı kullanılarak mümkün olabileceği ileri sürülmüştür (Howe vd. 2013). İnsanlarda bulunan proteinlerin %70' i zebra balığında da kaydedilmiştir ve bu proteinlerin bazılarının kök hücrelerin bölünmelerinde, çoğalmalarında, farklılaşmalarında ve göçlerinde etkili oldukları saptanmıştır (Howe vd. 2013). Zebra balığı başta olmak üzere birçok balık türünde döllenme dış kaynaklı ve embriyolar transparandır. Bu durum, embriyonun uterusda büyüdüğü fareler ile kıyaslandığı zaman önemli bir avantaj sağlamaktadır. Zebra balığında embriyonik gelişimin çok hızlı olması diğer bir üstünlüktür. Çok sayıda yumurta vermesi ise bilim insanlarına istatistiksel bir güç ve güven vermektedir. (MeiSheng vd. 2010; Hong vd. 2011). İnsan CD34<sup>+</sup> kök hücreleri zebra balığına transfer edilerek, bölünmeleri, farklılaşmaları ve göçleri kolaylıkla incelenmiştir (Staal vd. 2016). İnsanlarda görülen kanser ve kan hastalıklarının araştırılması ve tedavilerinde birçok hastane ve enstitünün yanında Harvard Kök Hücre Enstitüsü de zebra balığını model olarak kullanmaktadır. Bu balığın dişileri her hafta 300 adet yumurta vermekte ve nesil verme süresi kısadır. Kök hücre teknolojisi söz konusu olduğunda balıkların farelerden çok önemli bir diğer üstün özelliği ise, zarar görmüş olan kalp, beyin, böbrek, yüzgeç, karaciğer, omurilik, retina hücrelerini rejenerasyon ile yenileyebilmeleridir.

Balıklarda rejenerasyonda etkili olan hücrelerin kök hücreleri oldukları ileri sürülmüştür (Diep vd. 2011; Lenkowski ve Raymond, 2014; Wan vd. 2016). Eğer balıkların rejenerasyon ile erişkin dokuları oluşturmada kullandıkları prensipler ve moleküller anlaşılabilirse, bulgular insan doku mühendisliğinde ve rejenerasyonunda kullanılabilir (Diep vd. 2011; Lenkowski ve Raymond, 2014; Wan vd. 2016). Örneğin zebra balığının beyin ve retinal hücrelerini rejenerasyon ile nasıl yenilediği tam olarak anlaşılabilir ise, insanlarda görme kayıpları ve körlüğün tedavi edilmesine olanak sağlayabilir (Lenkowski ve Raymond 2014). İnsan hastalıkları üzerine yapılacak olan biyomedikal çalışmalarda benekli gar (*Lepisosteus oculatus*) balık türünün kemikli balıklar (Örneğin zebra balığı) ile insanlar arasında genetik bir köprü olma potansiyeline sahip olduğu Braasch vd. (2016) tarafından ileri sürülmüştür. Bu balık türü genomunun, teleost-spesifik dublikasyon eventini geçirmediği kanıtlanmıştır (Braasch vd. (2016). Bu tür, zebra balığına ve insanlara çok benzemektedir (Braasch vd. (2016). Yakın gelecekte, insan hastalıkları üzerine yapılacak olan kök hücre çalışmalarında model bir tür olarak kullanılma ihtimalinin oldukça yüksek olduğu söylenebilir.

Su ürünleri yetiştiricilik aktivitelerinde markete yeni balık türlerinin sunulması arzulanmaktadır. Bu türlerin geliştirilmesinde kök hücre teknolojilerinden yararlanılabileceği ve zebra balığının yeni akva kültür balık türlerini geliştirmek amacıyla model olarak kullanılabileceği önerilmektedir (Dahm ve Geisler 2006).

### Balık kök hücrelerinin özellikleri

Kök hücrelerin karakteristik özellikleri sınırlı sayıda balık türünde çalışılmıştır. Medaka balığında *in vitro* ve *in vivo* da farklı üç embriyonik kök hücre hattı araştırılmıştır. *In vitro* da bu hücre hatlarının farelerdeki kök hücrelerin bütün özelliklerini taşıdığı gösterilmiştir. Bu özellikler: kendi kendisini yenileyebilme, istikrarlı büyüme, başka hücrelere farklılaşma yeteneği, yüksek çekirdek-sitoplazma oranı, bir veya daha fazla sayıda belirgin çekirdekçik, yuvarlak veya çok şekilli olma, yüksek oranda alkalın fosfataz aktivitesi gösterme, normal diploid karyotip ve süspansiyon kültürlerde embrioid yapıya (embrioid cisimcik) benzer yapılar oluşturabilme yeteneği olarak sıralanmaktadır (MeiSheng vd. 2010). Zebra balıklarında Fan ve Collodi (2006), Hindistan sazanı (*Catla catla*)'nda Dash vd. (2010), Çipura (*Sparus aurata*) da ise Béjar vd. (1999) tarafından benzer hücresel özellikler bildirilmiştir. Hindistan sazanında hücrelerin yüksek

oranda kendi kendisini yenileyebilme ve başka hücrelere farklılaşabilme yetenekleri tespit edilmiştir.

### Balık kök hücrelerinin kullanım alanları

Balık kök hücrelerinin çeşitli biyoteknolojik alanlarda kullanılma potansiyelleri mevcuttur. Gen hedeflenmesi (Sosa vd. 2010; Nwokwa 2012; Guan vd. 2013; Nakajima vd. 2014; Ma ve Liu 2015), eşey hücre transplantasyonları (Lacerda vd. 2006; Yoshizaki vd. 2010a, 2010b, 2012; Shikina vd. 2013; Sato vd. 2014; Okutsu 2015) ve çekirdek transferi yolu ile yarı klonlama alanlarıdır (Yi vd. 2009; Hong vd. 2011).

### Gen hedeflemesi

Su ürünleri yetiştiricilik stoklarının genetik yapısını iyileştirmek amacıyla, gen hedeflenmesi, gen transferinde kullanılmaktadır. Ancak daha önceleri transgenik balıklar yabancı bir genin embriyoya veya yumurtaya direk verilmesi ile oluşturulmaktaydı (Tsai 2008; Sosa vd. 2010). Bu yöntemde, yabancı genlerin verildikleri canlının genetiği ile entegrasyonlarının rastgele olduğu ve trans genlerde istenilen özelliklerin kontrol edilemediği ve sonuçta arzu edilen entegrasyonun sağlanamadığı saptanmıştır (Chen vd. 2002; Yan vd. 2009; Yan vd. 2013). Gen hedeflenmesi tekniğinde embriyo ve yumurtalar yerine embriyonik kök hücreler kullanılarak ebeveyn genomlarında trans genlerin rastgele entegrasyonunun önlenildiği gösterilmiştir (Guan vd. 2013). Balıklarda embriyonik kök hücreler kullanılarak gen hedeflenmesi tekniği başlıca 4 aşamayı içerir. İlk aşamada pluripotent embriyonik kök hücre hatları geliştirilir, ikinci aşamada homolog rekombinasyon vektörler oluşturulur, üçüncü aşamada ise gen izolasyonu yapılarak embriyonik kök hücrelerin genomuna hedeflenmiş mutasyonlar yerleştirilir ve son aşamada ise germ (eşey) hattı kimerizmi oluşturmak amacıyla alıcı embriyolara, hedef embriyonik kök hücrelerin transplantasyonu yapılır. Günümüzde embriyonik kök hücrelere gen hedeflenmesi tekniği ile gen transferi omurgalılardan tam olarak sadece farelerde uygulanmaktadır (Tessarollo vd. 2009). Balıklarda embriyonik kök hücrelere gen transferi tekniği ile gen hedeflemesi çalışmaları Yi vd. (2010) ve Hong vd. (2011) tarafından gözden geçirilmiştir. Transfeksiyon (bir genin plazmid aracılığı ile başka bir hücrenin çekirdeğine taşınıp DNA'sına yerleştirilmesidir) ve ilaç seleksiyon çalışmaları sonucunda, farelerde kullanılan seçici marker genlerin medaka embriyonik kök hücre hattında iyi çalıştığı gösterilmiştir (Chen vd. 2002). Balıklarda gen hedeflenmesi araştırmalarına başlangıç olarak, medaka

balıklarında gen transferi ve ilaç seçimi için şartlar optimum hale getirilmiştir (Hong vd. 2004). Transgenik canlılar oluşturmak ve klonlanmış genlerin fonksiyonlarını analiz etmek için gen hedeflemesi tekniği güçlü bir araçtır. Bu tekniği geliştirmek amacıyla balıklarda pozitif-negatif seleksiyon (PNS) ve homolog rekombinant vektörler (HRV) oluşturulmuştur. Fare kök hücrelerinde homolog rekombinantların öne çıkmasını sağlayarak, ilaç seçimlerine dayanan pozitif-negatif seleksiyon (PNS) prosedürü, önemli ölçüde rastgele sonuçları elemine edebilmektedir. Pozitif seleksiyonda genlerin neomycin (neo), hygromycin (hyg) veya puromycin (pac) için ekspresyonları, G418, hygromycin veya puromycin'e karşı direnç göstermektedir. Negatif seleksiyonda ise herpes virüs thymidine kinase (tk) ekspresyonu gancyclovir'e karşı hassaslık göstermektedir. Bu nedenle fare kök hücrelerinde kullanılan pozitif-negatif seleksiyon prosedürünün medaka kök hücrelerinde kullanılabilirliği gösterilmiştir (Chen vd. 2002). Daha da önemlisi, medaka embriyonik kök hücreleri gen transferi ve uzun süreli ilaç seleksiyonlarından sonra gelişimsel pluripotent özelliklerini korudukları kaydedilmiştir. Balıklarda gen hedeflenmesinin başarılı olması için, hücre için homolog-rekombinasyon aktivitesinin balık kök hücrelerinde bulunması esastır. Medaka embriyonik kök hücrelerine baculo virüsü kullanılarak gen transferi yapılmıştır ve kök hücrelerin pluripotentlik özellikleri bundan etkilenmemiştir (Yan vd. 2009). Başarılı gen hedefleme çalışmaları zebra balıkları embriyonik kök hücrelerinde homolog rekombinantlar kullanılarak Fan vd. (2006) tarafından yapılmıştır. Gen hedefleme çalışmalarının geliştirilmesi için farklı balık türlerinde, embriyonik kök hücreler kullanılarak araştırmalar sürdürülmelidir.

### **Eşey hücre transplantasyonu**

Primordiyal germ hücreleri (PEH'leri) embriyogenez süresince, yalancı gonadlara gelmeden önce eşey hücreleri için kullanılan terimdir. Yalancı gonadlara ulaştıklarında, erkeklerde olgun sperm ve dişilerde ise olgun yumurtaya farklılaşırlar (Çek 2006; Lacerda vd. 2012). Primordiyal eşey hücreleri genetik materyali bir nesilden diğerine taşıyabilen tek embriyonik hücrelerdir. Bu nedenle gen bankaları oluşturmada, gametlerin saklanması ve korunmasında, özellikle de donör gametler aracılığı ile hücre hattı kimerizmini oluşturmada oldukça önemlidirler (Wong vd. 2011; Lacerda vd. 2012; Yoshizaki vd. 2012; Lee vd. 2015; Shang vd. 2015). Germ hücre transplantasyonu ilk kez Japon bilim insanları Yoshizaki vd. (2002) tarafından

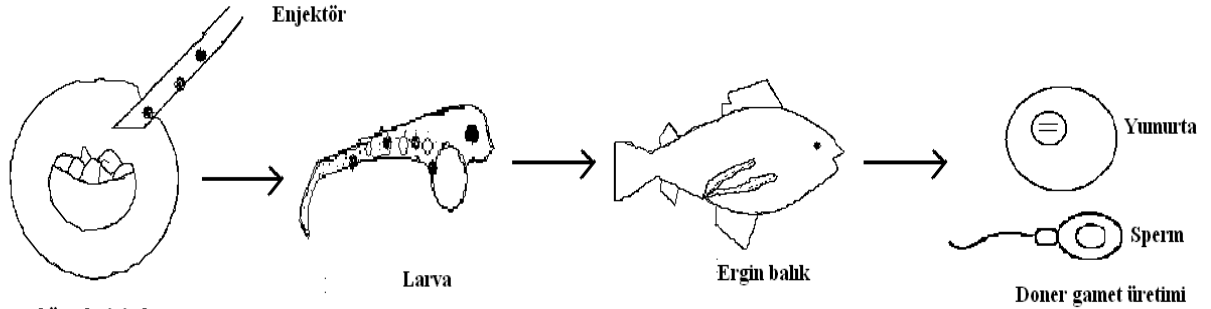
geliştirilmiştir. Germ hücreleri yumurta veya sperm üretimi için yalnızca gonadlarda kolonize olurlar. Bu hücreler pluripotent kök hücrelerine dönüşebilme yeteneğindedirler (Lacerda vd. 2008; Satio vd. 2008). Germ hücreleri morfolojik olarak embriyonik kök hücreleri ile benzerlik göstermektedir ve kültürlerinde embryoid yapılar oluşturabilmektedirler (Fan vd. 2008). Germ hücre transplantasyonları üç farklı şekilde yapılmaktadır (Şekil 1). Birincisinde donörden izole edilmiş olan primordiyal germ hücreleri döllenmiş ve blastula aşamasında olan embriyolara transplante edilmektedir (Saito vd. 2008). İkinci yöntemde henüz yumurtadan çıkmış yumurta keseli larvaların vücut boşluğuna, vericiden izole edilmiş olan primordiyal germ hücreleri Yoshizaki vd. (2010a, b; 2012) tarafından transplante edilmiştir. Üçüncü yöntemde ise germ hücrelerin transplantasyonları ergin olan balıklara yapılmıştır (Lacerda vd. 2006; 2008; 2010; 2012; Shang vd. 2015). Aynı şekilde juvenil balıklardan izole edilmiş olan spermatogoniyal veya oogoniyal kök hücrelerin de transplantasyonları yapılmaktadır. Psenicka vd. (2015) mersin balıklarında germ hücrelerin izolasyon ve transplantasyonları ile ilgili yapmış oldukları ayrıntılı çalışmalarında, transplantasyon etkinliğini %60 olarak kaydetmişlerdir. Germ hücrelerinin transplantasyon sistemi ticari olarak önem taşıyan balık türlerinden gamet elde etmede kullanılabilir. Örneğin uskumrugillerden olan mavi yüzgeç orkinos (*Thunnus thynnus*) beş yılda eşeyssel olgunluğa erişmektedir. Yetiştiricilik şartlarında bunu gerçekleştirmek ayrıca zordur. Bunun yanında eşeyssel olgunluğa gelmiş bir orkinosun vücut ağırlığı birkaç yüz kilogramdır. Bu türden gamet elde etmek pahalı, zaman alıcı, haçerilerde fazla alan kapladığı için ekonomik değildir. Ancak yine uskumrugillerden olan kolyoz (*Scomber japonicus*) sadece bir yılda eşeyssel olgunluğa erişmekte ve vücut ağırlığı 500g dır. Eğer mavi yüzgeç orkinosun germ hücreleri, kolyoza transplant edilirse daha kısa sürede küçük bir tankta orkinos gametlerini elde etmek mümkündür. Böylece orkinos gametlerinin daha kısa sürede, daha az masrafla, daha az işçi ve yer kullanarak üretilebileceği öngörülmektedir. Kolyoz burada bir bakıma kiralık (taşıyıcı) anaç olarak kullanılmış olur (Yoshizaki vd. 2012). Diğer bir uygulama alanı ise nesli tükenmekle karşı karşıya olan türlerin yumurta ve spermelerini üretmektir. Örneğin mersin balıkları 10 yılda eşeyssel olgunluğa gelmektedir. Akriba balık türlerinde daha kısa sürede eşeyssel olgunluk sağlanabilir. Primordiyal germ hücrelerinin uygulama alanları daha ayrıntılı olarak Okutsu vd. (2006) ve Yoshizaki vd. (2012) tarafından ele alınmıştır.

### Yarı klonlama

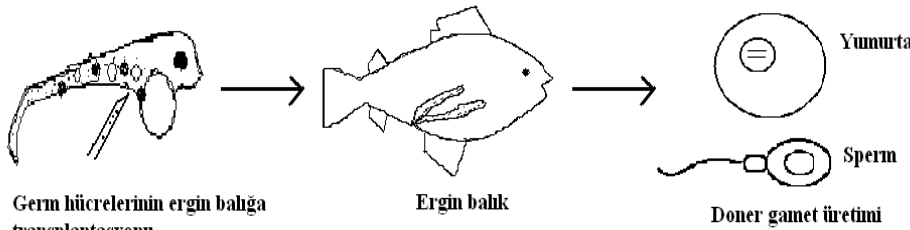
Normal klonlamada yumurtanın çekirdeğindeki bütün genetik materyal uzaklaştırılır ve yerine verici somatik hücrenin (örneğin bir meme hücresinin) genetik materyali yerleştirilir. Böylece verici klonlanır (Şekil 2). Dolly adı verilen bir koyun Campbell vd. (1996) tarafından klonlanmıştır. Böylece dünyada ilk kez normal klonlama başarılmıştır (Campbell vd. 1996). Yarı-klonlamada ise yumurtanın genetik içeriği sağlam bırakılır, ihtiyaç duyulan diğer genetik içerik özel olarak oluşturulmuş ve genetik materyalin sadece yarısına sahip olan kök hücreden temin edilir (Şekil 2). Yarı-klonlama ilk kez Singapurlu bilim insanları tarafından Holly adı verilen medaka balığında başarılmıştır (MeiSheng vd. 2009). Yarı-klonlamada genetik materyaller iki kaynaktan elde edilmiştir. Diğer bir ifade ile DNA'nın yarısı anneden (yumurtadan), diğer yarısı ise medaka balığı

embriyonik kök hücrelerden elde edilmiştir (MeiSheng vd. 2009). Holly'nin elde edilmesinde sperm yerine genetik olarak modifiye edilmiş kök hücre kullanılmıştır. Yarı klonlama ile dünyada ilk kez bir canlıyı üreten MeiSheng vd. (2009), aynı yöntem insanlara uyarlanabilirse, kısır erkeklerin ve aynı zamanda kadınların kendi genlerini taşıyan çocuklara sahip olmasına imkân tanıyacağını öne sürmüşlerdir. Yöntemin etikliğini tartışan fazla sayıda araştırma ve görüş mevcuttur (Tesarik 2002; Tesarik ve Mendoza 2003). Petri kabında bir canlıyı yaratırken, somatik çekirdek haplodizasyonu sırasında kromozom segregasyonlarında eksiklikler oluşabilir, bunun sonucunda kromozomlarda anormallikler olabilir, nükleusun yeniden programlanması yeterli olmayabilir, kısa telomerazlar oluşabilir (Tesarik 2002; Tesarik ve Mendoza 2003).

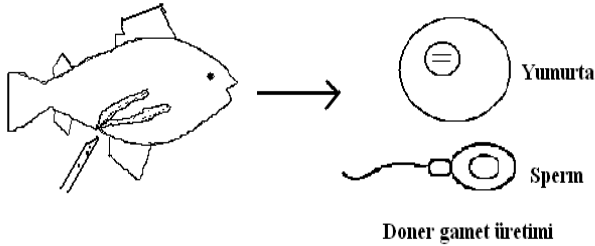
#### A) Germ hücrelerinin orta-blastula aşamasında olan embriyo ya transplantasyonu



#### B) Germ hücrelerinin larvaya transplantasyonu

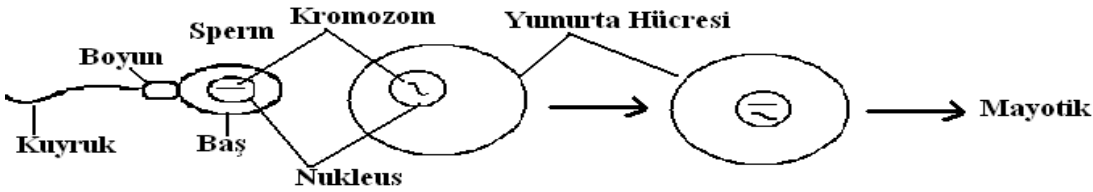


#### C) Germ hücrelerinin ergin balığa transplantasyonu

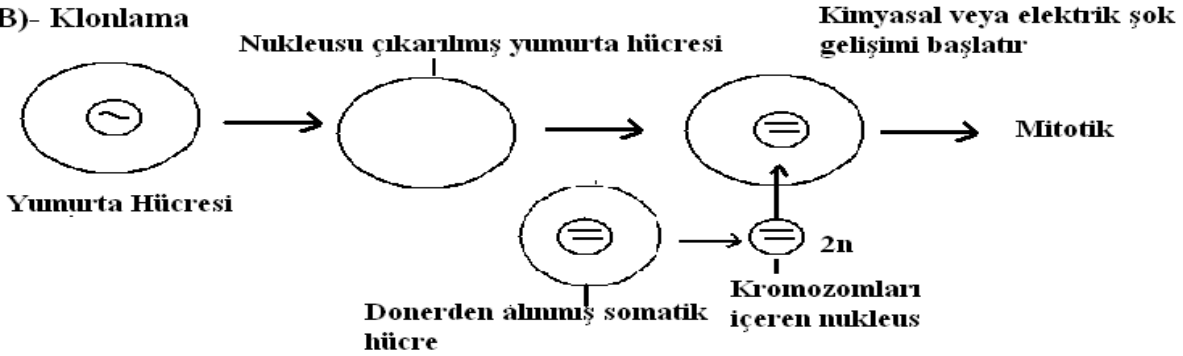


**Şekil 1.** Balıklarda kullanılan germ hücre (PEH'leri, spermatogonyal ve oogonyal kök hücreler) transplantasyon tekniklerinin şematik gösterimi, Lacerda vd. (2012) den modifiye edilmiştir. A)- Germ hücrelerin orta-blastula aşamasında olan balık embriyosuna mikroenjeksiyon ile transplantasyonu, B)- Donör germ hücrelerin yumurtadan henüz yeni çıkmış olan larvanın vücut boşluğuna mikroenjeksiyon ile transplantasyon, C)- Spermatogonyal veya oogonyal kök hücreleri direk ergin balığın ovaryum veya testislerine transplante edilir

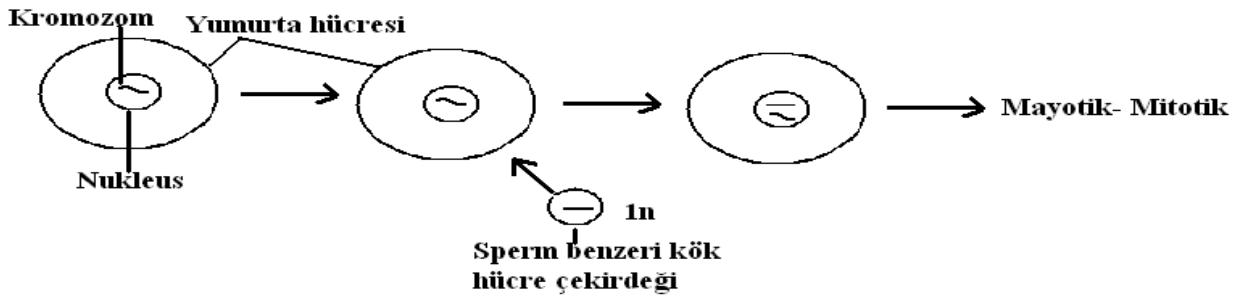
## A)- Normal Fertilizasyon



## B)- Klonlama



## C)- Yarı- Klonlama



Şekil 2. Balık üreme biyoteknolojisinin şematik olarak gösterimi Hong vd. (2011) den modifiye edilmiştir. A)- Normal fertilizasyon, B)- Klasik klonlama, C)- Yarı-klonlama (kök hücrelerin üreme biyoteknolojisinde kullanımı)

## Tartışma ve Sonuç

Balıklar üzerine yapılmış olan kök hücre çalışmaları incelendiğinde birçok yazarın totipotent ve pluripotent terimlerini aynı anda ve birbirleri yerine kullandıkları, terminolojinin henüz yerleşmediği görülmüştür (Hong vd. 1996; Béjar vd. 1999; Hong vd. 2004). Aynı yazarlar (Hong vd. 1996; Béjar vd. 1999; Hong vd. 2004) orta-blastula aşamasında olan embriyolardan izole ettikleri kök hücrelere, aynı makalelerin bazı bölümlerinde totipotent kök hücreler bazı bölümlerinde ise pluripotent kök hücre tanımlarını kullanmışlardır. Condic (2014) tarafından önerilen plenipotent kök hücre tanımı ise hiçbir balık türü için henüz kullanılmamış ve araştırılmamış bir tanımdır. Denker (2014) pluripotent kök hücre terimi yerine omnipotent veya plenipotent terimlerinden omnipotent teriminin kullanılmasını önermiştir. Balıklarda kök hücrelerin multipotent, totipotent ve pluripotent özellikleri sadece medaka ve zebra balık

türlerinde çalışılmış ancak unipotent kök hücrelere dair herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. Unipotent kök hücrelerin diğer hücrelerden nasıl ayırt edildikleri, nasıl farklılaştıkları, nasıl geliştikleri ve önemleri, gelecekte araştırılması gereken oldukça önemli alanlardır. Sadece balıklarda değil diğer omurgalılarda, memelilerde ve insanlarda kök hücre terminolojisinin yerleşmesi için daha fazla bilimsel araştırma yapılmasını derlemenin yazarları olarak önermekteyiz.

Başlıca üç farklı kaynaktan elde edilen balık kök hücreleri üzerine yapılan çalışmalar son on yılda ivme kazanmıştır. Literatür incelendiği zaman yoğunluğun ergin balık kök hücreleri üzerine olduğu saptanmıştır (Jopling vd. 2010; Diep vd. 2011; Catton 2012; Ma vd. 2012; Galindo-Villegas 2016; Hall vd. 2016; Kobayashi vd. 2016; Wan vd. 2016). Embriyonik kök hücreler ve primordial kök hücreler üzerine daha az sayıda çalışmaya rastlanmıştır. Çalışmalarda karşılaşılan en önemli zorluklar,

embriyonik ve primordial germ hücrelerinin belirteçlerinin tam olarak bilinmemesidir. Ayrıca gen hedeflenmesi çalışmalarının uygun embriyonik kök hücre hattı olmadığından dolayı birçok balık türünde sınırlı olduğu görülmüştür.

Günümüzde balık kök hücrelerinin önemi artık her alanda çalışan birçok bilim insanı tarafından kabul edilmiştir. İnsan hastalıkları üzerine yapılan araştırmalarda dünyada en fazla zebra balığının kullanıldığı ve kök hücreleri üzerine yapılan araştırmalarda model balık olarak kullanılması önerilmiştir (MeiSheng vd. 2010; Ho vd. 2014; Lin vd. 2016; Okuda vd. 2016). Kemikli balıkların büyük çoğunluğunda döllenmenin dış kaynaklı ve embriyo gelişiminin anne dışında gerçekleşmesi, embriyolardan kök hücre kültürü çalışmalarında farelere göre üstün bir avantaj sağlamaktadır. Embriyoların transparan olması zebra, medaka, konkinus ve diğer birçok balık türünü yine farelerden üstün kılmaktadır. Howe vd. (2013) insanlarda bulunan proteinlerin %70 oranında zebra balığında bulunduğunu kaydetmişlerdir. Bu proteinlerin kök hücrelerin bölünmelerinde, çoğalmalarında, farklılaşmalarında ve göçlerinde etkili olduklarını ileri sürmüşlerdir. İnsanlarda bulunan genlerin fonksiyonlarını araştırmada zebra balığının denek olarak kullanılmasını önermişlerdir (Taylor vd. 2010; Howe vd. 2013; Prykhozhiy vd. 2016). Zebra ve medaka balıklarının beyin, yüzgeç, omurilik, böbrek, karaciğer ve kalp dokularını yenileyebildikleri kanıtlanmıştır. Örneğin zarar görmüş olan beyin hücrelerini nasıl yenileyebildikleri tam olarak anlaşılabilirse, insanlarda görülen alzheimer ve bunama hastalıklarının tedavi edilebileceği öngörülmektedir.

Benekli gar genomu, insan hastalıkları üzerine yapılan araştırmalarda zebra balık türünden daha uygun bir modeldir (Braasch vd. 2016). Kuşkusuz zebra balığı işlevsel genomik açıdan en çok çalışılan, hakkında en fazla bilgi sahibi olunan ve en fazla denek olarak kullanılan türdür. Ancak zebra balığı genomu teleost-spesifik dublikasyon eventi geçirmiştir (Braasch vd. 2016). Bu nedenle zebra balığı ile insan genomu arasında karşılaştırma yapmak güç olabilmektedir (Braasch vd. 2016). Yakın gelecekte insan hastalıkları üzerine yapılacak olan kök hücre çalışmalarında, zebra, medaka balıkları'na benekli gar balık türünün model balık türü olarak rakip olacağı aşikar görülmektedir.

Balık kök hücrelerinin kullanım alanları olan gen hedeflenmesi, PEH'leri transplantasyonları ve klonlama farklı alanlarda kullanılma potansiyellerinden dolayı önemlidirler. Gen hedeflenmesi embriyonik kök hücrelerde doğru genetik alterasyonlar oluşturarak gen fonksiyonlarını aydınlatmak ve insan hastalıkları için hayvan

modelleri oluşturmak için oldukça önemli bir araçtır. Yan vd. (2013) ile Guan vd. (2013) medaka balıklarında embriyonik kök hücre hattını oluşturmuşlardır. Aynı yazarlar gen transferi ve homolog rekombinasyonların seleksiyonu için prosedür geliştirmişlerdir. Embriyonik kök hücre bazlı gen hedeflenmesi teknolojisinin geliştirilmesinde medaka balığının kullanılmasını önermişlerdir (Guan vd. 2013; Yan vd. 2013). Howe vd. (2013) ile Ma ve Liu (2015) genetik kaynaklı insan hastalıklarının tedavilerinde model omurgalı olarak zebra balığını önermişlerdir. Maeder ve Gensbache (2016) yapmış oldukları derlemelerinde gen hedeflenmesinde en fazla farelerin kullanıldığı çalışmalara yer vermişlerdir. Nature dergisinde basılan ve 225 adet bilim insanının yazarlığını yaptığı araştırmada (Howe vd. 2013) neden zebra balığının genetik kaynaklı insan hastalıklarının aydınlatılmasında model olarak kullanılması gerektiği ayrıntılı açıklanmıştır (Howe vd. 2013). Zebra veya medaka her iki balık türleri de daha önce belirtilen nedenlerden dolayı, genetik kaynaklı insan hastalıklarının araştırılmasında farelerden çok daha üstün birer model teşkil etmektedirler.

PEH'leri transplantasyonlarında, donörlerden izole edilmiş olan spermatogoniyal ve oogoniyal kök hücreler alıcı balığa transfer edilerek balık üretimi arttırılabilir. Örneğin aslan salmon (*O. tshawytscha*) türünde gamet elde edilmesinde karşılaşılan zaman kaybının önlenmesinde kullanılabilir. Aslan salmon'dan izole edilecek olan eşey kök hücreleri, alıcı balığa (gökkuşuğu alabalığı) transfer edilerek ortalama 4-5 yılda eşeyssel olgunluğa gelen aslan salmon gametleri sadece bir yılda eşeyssel olgunluğa gelen gökkuşuğu alabalığı taşıyıcı anaç olarak kullanılıp zaman kaybı önlenir ve aynı zamanda mevsim dışı gamet elde edilebilir. PEH'leri transplantasyon sistemi iki cinsiyet arasında büyüme farklılığının olduğu türlerde monosex populasyonlar üretmek üzere de kullanılabilir. Yöntemde hücre çekirdeğine herhangi bir müdahalede bulunulmadığından dolayı bu yöntem ile üretilen balıkların tüketilmesinde etik sorunlar olmayacağını, bu derlemenin yazarları olarak öngörmekteyiz. Yöntem çok yakın bir gelecekte ticari anlamda birçok ülke tarafından kullanılabilir. Germ hücre transplantasyonları ile monosex populasyonların da üretilebileceği Yoshizaki vd. (2010b) tarafından ileri sürülmüştür. Örneğin salmonlarda dişiler erkek balıklardan daha iyi büyüme performansı gösterdiklerinden dolayı bütünüyle dişi populasyonlar elde edilebilir.

XX kromozomu taşıyan oogoniyal kök hücreler dağ alabalığı (*Salmo trutta macrostigma*)'ndan izole



edilerek alıcı erkeğin gonatlarına tranplante edilebilir. Eğer XX kromozomu taşıyan oogonia alıcı erkeğin gonatlarında sperm üretebilirse, alıcı erkeğin sütü ile üretilen F1 nesli ve dağ alabalığından (XX) elde edilen XX kromozomu taşıyan yumurtaların tamamının dişi (XX) olması beklenir

Kök hücre tranplantasyonlarının nesli tükenmekte olan çiklit türlerinin korunmasında da kullanılabileceği Farlora vd. (2013) tarafından ileri sürülmüştür. Spermatogonial kök hücre tranplantasyonları birçok yazar tarafından çalışılmıştır (Shikina vd. 2013; Sato vd. 2014; Shang vd. 2015). Oogonial kök hücre tranplantasyonları ise Yoshizaki. (2010a) ve Okutsu vd. (2015) tarafından araştırılmıştır. Balıklarda gelecekte yapılacak olan çalışmaların hücre tranplantasyonlarının etkinliği üzerine odaklanması gerektiği ileri sürülmüştür. Derlemede görüldüğü üzere yumurta hücrelerinin tranplantasyonları üzerine çok az sayıda çalışma mevcuttur. Bu nedenle gelecekte yapılacak olan çalışmaların vericiden alınan yumurta hücreleri kullanılarak balık larvaları elde etme üzerine olması bu derlemenin önerilerinden biridir. Pan vd. (2016) memelilerde yapmış oldukları derlemelerinde, dişi memelilerin sınırlı sayıda oogonial kök hücresi ile doğdukları ve yaşlanma ile birlikte bu sayının azaldığı ve en nihayetinde bittiği inancının artık doğru olmadığını ileri sürmüşlerdir. Araştırmalarında, birçok dişi memelinin doğduktan sonra da oogonial kök hücrelerini üretebildiklerine değinmişlerdir. Oogonial kök hücre hattının sürekliliği medaka (Nakamura vd. 2011) ve zebra (Wong vd. 2011) balıklarında araştırılmış ancak diğer birçok balık türünde henüz çalışılmamış ve mekanizmanın tam olarak nasıl işlediği belirlenememiştir. Mekanizma tam olarak anlaşıldığı zaman belki de kadınlarda menapoza girme yaşları geciktirilebilir.

Kök hücre uygulama alanlarından birisi olan klonlama ise ticari anlamda kullanılmaya başlandı. Holly'nin MeiSheng ve ekibi tarafından 2009'da elde edilmesinin üzerinden henüz sadece 7 yıl geçmesine rağmen ticari anlamda ilk kez 2016 yılında Çin ile Güney Kore firmalarının birlikte kurdukları biyoteknoloji fabrikasında, ilk olarak bomba kokusu alan köpekler ve et kalitesi yüksek olan ineklerin üretileceği belirtildi. Önce Dolly adı verilen bir koyun Campbell ve diğerleri tarafından 1996 yılında klonlanmıştır (Campbell vd. 1996). Ardından Holly adı verilen medaka balıkları klonlanmıştır (MeiSheng vd. 2009). Bomba kokusu alan köpekler, yüksek kalitede et üreten inekler derken sıra insanlara mı geliyor sorusu akla gelebilir. Bu derlemenin yazarları olarak her teknolojinin

mutlaka sınırlarının olması gerektiği düşüncesindeyiz.

## Teşekkür

YÖK (Yükseköğretim Kurulu), 2547 sayılı kanunun 39. maddesi uyarınca, balık kök hücreleri üzerine Amerika Birleşik Devletleri'nde yapılan çalışmayı desteklemiştir (Bu derleme söz konusu çalışmadan elde edilen birikimle hazırlanmıştır).

## Kaynaklar

- Alvarez MC, Bejar J, Chen S, Hong Y. 2007. Fish ES cells and applications to biotechnology. *Mar Biotechnol.* 9(2):117-127.  
doi: 10.1007/s10126-006-6034-4
- Ausoni S, Sartore S. 2009. From fish to amphibians to mammals: in search of novel strategies to optimize cardiac regeneration. *J Cell Biol.* 184(3):357-367.  
doi: 10.1083/jcb. 200810094
- Béjar J, Hong Y, Alvarez MC. 1999. Towards obtaining es cells in the marine fish species *Sparus aurata*; multipassage maintenance, characterization and transfection. *Genet Anal- Biomol E.* 15(3-5):125-129.  
doi: 10.1016/S1050-3862(99)00015-7
- Braasch I, Gehrke AR, Smith JJ, Kawasaki T, Manousaki T, Pasquier J, Amores A, Desvignes T, Batzel P, Catchen J, Berlin AM, Campbell MS, Barrell D, Martin KJ, Mulley JF, Ravi V, Lee AP, Nakamura T, Chalopin D, Fan S, Weisel D, Canestro C, Sydes J, Beaudry FEG, Sun Y, Hertel J, Beam MJ, Fasold M, Ishiyama M, Johnson J, Kehr S, Lara M, Letaw JH, Litman GW, Litman RT, Mikami M, Ota T, Saha NT, Williams L, Stadler PF, Wang H, Taylor JS, Fontenot Q, Ferrara A, Searle SMJ, Aken B, Yandell M, Schneider I, Yoder JA, Volf JN, Meyer A, Amemiya CT, Venkatesh B, Holland PWH, Guiguen Y, Bobe J, Shubin NH, Palma FD, Alfoldi J, Toh KL, Postlethwait JH. 2016. The spotted gar genome illuminates vertebrate evolution and facilitates human-teleost comparisons. *Nat Genet.* 48(4):427-437.  
doi: 10.1038/ng.3526
- Brian B. 2014. Distinct mechanisms underlie oral versus aboral regeneration in the hydractinia *echinata*. PhD. Thesis, National University of Ireland Galway, Pp.165.
- Campbell KH, McWhir J, Ritchie WA, Wilmut I. 1996. Sheep cloned by nuclear transfer from a cultured cell line. *Nature.* 380(6569):64-66.  
doi: 10.1038/380064a0
- Catton WT. 2012. Blood cell formation in certain teleost fishes. *Blood.* 6(1):39-60.
- Chen S, Hong Y, Schartl M. 2002. Development of a positive-negative selection procedure for gene targeting in fish cells. *Aquaculture.* 214(1-4):67-79.  
doi: 10.1016/S0044-8486(01) 00811-0
- Choi TY, Khalig M, Ko S, So J, Shin D. 2015. Hepatocyte-specific ablation in zebrafish to study biliary-driven regeneration. *JVis Exp.* 20(99):e52785.  
doi: 10.3791/52785

- Collodi Y, Kamei A, Sharps D, Weber DB. 1992. Fish embryo cell cultures for derivation of stem cells and transgenic chimeras. *Mol Mar Biol Biotechnol.* 1(4-5):257-265.
- Condic MI. 2014. Totipotency: What it is, and what it is not. *Stem cells Dev.* 23(8):796-812. doi: 10.1089/scd.2013.0364
- Çek Ş. 2006. Early gonadal development and sex differentiation in rosy barb (*puntius conchonius*). *Anim Biol.* 56(3):335-350. doi: 10.1163/157075606778441895
- Dash C, Routray P, Tripathy S, Verma DK, Guru BC, Meher PK, Nandi S, Eknath AE. 2010. Derivation and characterization of embryonic stem-like cells of Indian major carp *Catla catla*. *J Fish Biol.* 77(5):1096-1113. doi: 10.1111/j.1095-8649.2010.02755.x
- Dahm R, Geisler R. 2006. Learning from Small Fry: The Zebra fish as a Genetic Model Organism for Aquaculture Fish Species. *Mar Biotechnol.* 8(4):329-345. doi: 10.1007/s10126-006-5139-0
- De Jong JJ, Burns CE, Chen AT, Pugach E, Mayhall EA, Smith ACH, Feldman HA, Zhou Y, Zon LI. 2011. Characterization of immune-matched hematopoietic transplantation in zebra fish. *Blood.* 117(16):4234-4242. doi: 10.1182/blood-2010-09-307488
- Denker HW. 2014. Stem cell terminology ‘Synthetic embryos’: A new debate on totipotency omnipotency and pluripotency and how it relates to recent experimental data. *Cell Tissues Organs.* 199(4):221-227. doi: 10.1159/000370063
- Diep CQ, Ma D, Deo RC, Holm TM, Naylor RW, Aroral N, Wingert RA, Bollig F, Djordjevic G, Lichman B, Zhu H, Ikenaga T, Ono F, Englert C, Cowan CA, Hukriede NA, Handin RI, Davidson AJ. 2011. Identification of adult nephron progenitors capable of kidney regeneration in zebra fish. *Nature.* 470(7332):95-100. doi: 10.1038/nature09669
- Evans MJ, Kaufman MH. 1981. Establishment in culture of pluripotential cells from Mouse embryos. *Nature.* 292(5819):154-156. doi:10.1038/292154a0
- Fan L, Collodi P. 2006. Zebra fish embryonic stem cells. *Methods in Enzymol.* 418:64-77. doi:10.1016/S0076-6879(06)18004-0
- Fan L, Moon J, Crodian J, Collodi P. 2006. Homologous recombination in zebra fish embryonic stem cells. *Transgenic Res.* 15(1):21-30. doi: 10.1007/s11248-005-3225-0
- Fan L, Moon J, Wong TT, Crodian J, Collodi P. 2008. Zebra fish primordial germ cell cultures derived from vasa: RFP Transgenic Embryos. *Stem Cells Dev.* 17(3):585-597. doi: 10.1089/scd.2007.0178
- Farlora R, Hattori-Ihara S, Takeuchi Y, Hayashi M, Octavera A, Yoshizaki G. 2013. Intraperitoneal germ cell transplantation in the Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Mar Biotechnol.* 16(3):309-320. doi: 10.1007/s10126-013-9551-y
- Fernández JA, Bubner EJ, Takeuchi Y, Yoshizaki G, Wang T, Cummins SF, Elizur A. 2015. Primordial germ cell migration in the yellowtail kingfish (*Seriola lalandi*) and identification of stromal cell-derived factor 1. *Gen Comp Endocrinol.* 213:16-23. doi: 10.1016/j.ygcen.2015.02.007
- Galindo-Villegas J. 2016. Recent findings on vertebrate developmental immunity using the zebrafish model. *Mol Immunol.* 69:106-112. doi: 10.1016/j.molimm.2015.10.011
- Grandel H, Kaslin J, Ganz J, Brand M. 2006. Neural stem cells and neurogenesis in the adult zebra fish brain: Origin, proliferation dynamics, migration and cell fate. *Dev Biol.* 295(1):263-277. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.03.040
- Guan G, Yan Y, Chen T, Yi M, Ni H, Naruse K, Nagahama Y, Hong Y. 2013. Nanos3 gene targeting in Medaka ES cells. *Int J Biol Sci.* 9(5):444-454. doi: 10.7150/ijbs.6507
- Hall C, Crosier H, Crosier K. 2016. Inflammatory cytokines provide both infection-responsive and developmental signals for blood development: lessons from the zebrafish. *Mol Immunol.* 69:113-122. doi: 10.1016/j.molimm.2015.10.020
- Hayashi M, Sato M, Nagasaka Y, Sadaie S, Kobayashi S, Yoshizaki G. 2014. Enrichment of spermatogonial stem cells using side population in teleost. *Biol Reprod.* 91(1):23,1-8. doi: 10.1095/biolreprod.113.114140
- He J, Lu H, Zou Q, Luo L. 2014. Regeneration of liver after extreme hepatocyte loss occurs mainly via biliary trans differentiation in zebrafish. *Gastroenterology.* 146(3):789-800. doi: 10.1053/j.gastro.2013.11.045
- Hong N, Zhendong L, Hong Y. 2011. Fish Stem Cell Cultures. *Int J Biol Sci.* 7(4):392-402. doi: 10.7150/ijbs.7.392
- Hong Y, Winkler C, Schartl M. 1996. Pluripotency and differentiation of Embryonic stem cell lines from the medakafish (*Oryzias latipes*). *Mech Dev.* 60(1):33-44. doi: 10.1016/S0925-4773(96)00596-5
- Hong Y, Chen S, Gui J, Schartl M. 2004. Retention of the developmental pluripotency in medaka embryonic stem cells after gene transfer and long term drug selection for gene targeting in fish. *Transgenic Res.* 13(1):41-50. doi: 10.1023/B:TRAG.0000017172.71391.fa
- Hong Y, MingYou XL, JianFang G, YunHan H. 2010. Fish germ cells. *Sci China Life Sci.* 53(4):435-446. doi: 10.1007/s11427-010-0058-8
- Hong N, Yuan Y, Wang T, Yi W, Xu H, Zeng H, Song J, Hong Y. 2016. Dnd is a critical specifier of primordial germ cells in the Medaka fish. *Stem Cell Reports.* 6(3):411-421. doi: 10.1016/j.stemcr.2016.01.002
- Ho SY, Pin GCW, Yang GJ, Sing LY, Kuen LMK, Ni H, Yunhan H, Khiong CW, Chong SCA. 2014. Derivation and long term culture of an embryonic stem cell-like line from zebrafish blastomeres under

- feeder free condition. *Zebrafish*. 11(5):407-420. doi: 10.1089/zeb.2013.0879
- Howe K, Clark MD, Torroja CF, Torrance J, Berthelot C, Muffato M, Collins JE, Humphray S, McLaren K, Matthews L, McLaren S, Sealy I, Caccamo M, Churcher C, Scott C, Barrett JC, Koch R, Rauch GJ, White S, Chow W, Kilian B, Quintais LT, Guerra-Assunção JA, Zhou Y, Gu Y, Yen J, Vogel JH, Eyre T, Redmond S, Banerjee R, Chi J, Fu B, Langley E, Maguire SF, Laird GK, Lloyd D, Kenyon E, Donaldson S, Sehra H, Almeida-King J, Loveland J, Trevanion S, Jones M, Quail M, Willey D, Hunt A, Burton J, Sims S, McLay K, Plumb B, Davis J, Clee C, Oliver K, Clark R, Riddle C, Elliot D, Threadgold G, Harden G, Ware D, Begum S, Mortimore B, Kerry G, Heath P, Phillimore B, Tracey A, Corby N, Dunn M, Johnson C, Wood J, Clark S, Pelan S, Griffiths G, Smith M, Glithero R, Howden P, Barker N, Lloyd C, Stevens C, Harley J, Holt K, Panagiotidis G, Lovell J, Beasley H, Henderson C, Gordon D, Auger K, Wright D, Collins J, Raisen C, Dyer L, Leung K, Robertson L, Ambridge K, Leongamornlert D, McGuire S, Gilderthorp R, Griffiths C, Manthavadi D, Nichol S, Barker G, Whitehead S, Kay M, Brown J, Murnane C, Gray E, Humphries M, Sycamore N, Barker D, Saunders D, Wallis J, Babbage A, Hammond S, Mashreghi-Mohammadi M, Barr L, Martin S, Wray P, Ellington A, Matthews N, Ellwood M, Woodmansey R, Clark G, Cooper J, Tromans A, Grafham D, Skuce C, Pandian R, Andrews R, Harrison E, Kimberley A, Garnett J, Fosker N, Hall R, Garner P, Kelly D, Bird C, Palmer S, Gehring I, Berger A, Dooley CM, Ersan-Ürün Z, Eser C, Geiger H, Geisler M, Karotki L, Kirn A, Konantz J, Konantz M, Oberländer M, Rudolph-Geiger S, Teucke M, Lanz C, Raddatz G, Osoegawa K, Zhu B, Rapp A, Widaa S, Langford C, Yang F, Schuster SC, Carter NP, Harrow J, Ning Z, Herrero J, Searle SM, Enright A, Geisler R, Plasterk RH, Lee C, Westerfield M, de Jong PJ, Zon LI, Postlethwait JH, Nüsslein-Volhard C, Hubbard TJ, Roest Crolius H, Rogers J, Stemple DL. 2013. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome. *Nature*. 496(7446):498-503. doi: 10.1038/nature12111
- Jopling CE, Sleep M, Raya M, Martí AR, Belmonte JCI. 2010. Zebra fish heart regeneration occurs by cardiomyocyte dedifferentiation and proliferation. *Nature*. 464(7288):606-609. doi: 10.1038/nature08899
- Kobayashi I, Katakura F, Moritomo T. 2016. Isolation and characterization of hematopoietic stem cells in teleost fish. *Dev Comp Immunol*. 58:86-94. doi: 10.1016/j.dci.2016.01.003
- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Silva SBG, Homem CSP, França LR. 2006. Germ cells transplantation in fish: the Nile-tilapia model. *Anim Reprod*. 3(2):146-159.
- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Assis LH, Resende FM, Silva SMC, Silva RC, Segatelli TM, França LR. 2008. Germ cell transplantation in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Cybium*, 32(2):115-118
- Lacerda SMSN, Batlouni SR, Costa GMJ, Segatelli TM, Quirino BR, Queiroz BM, Kalapothakis E, França LR. 2010. A New and Fast Technique to Generate Offspring after Germ Cells Transplantation in Adult Fish: The Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*) Model. *Plos One*, 5(5):e10740. doi: 10.1371/journal.pone.0010740
- Lacerda SMSN, Costa GMJ, Campos-Junior PHA, Segatelli TM, Yazawa R, Takeuchi Y, Morita T, Yoshizaki G, França LR. 2012. Germ cell transplantation as a potential biotechnological approach to fish reproduction. *Fish Physiol Biochem*. 39(1):3-11. doi: 10.1007/s10695-012-9606-4
- Lee S, Seki S, Katayama N, Yoshizaki G. 2015. Production of viable trout offspring derived from frozen whole fish. *Scientific Reports*. 5:1-12. doi: 10.1038/srep16045
- Lenkowski JR, Raymond PA. 2014. Müller glia: stem cells for generation and regeneration of retinal neurons in teleost fish. *Prog Retin Eye Res*. 40:94-123. doi: 10.1016/j.preteyeres.2013.12.007
- Lin CY, Chiang CY, Tsai HJ. 2016. Zebrafish and Medaka: new model organisms for modern biomedical research. *J Biomed Sci*. 23(1):19. doi: 10.1186/s12929-016-0236-5
- Ma D, Zhang J, Lin H, Italiano J, Handin RI. 2012. The identification and characterization of zebra fish hematopoietic stem cells. *Blood*. 118(2):289-297. doi: 10.1182/blood-2010-12-327403
- Ma D, Liu F. 2015. Genome editing and its application in model organisms. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*. 13(6):336-344. doi: 10.1016/j.gpb.2015.12.001.
- Maeder ML, Gersbach, CA. 2016. Genome-editing technologies for gene and cell therapy. *Mol Ther*. 24(3):430-446. doi: 10.1038/mt.2016.10
- MeiSheng Y, Ni H, YunHan H. 2009. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*. 326(5951):430-433. doi: 10.1126/science.1175151
- MeiSheng Y, Ni H, ZhenDong L, Yan Y, DanKe W, HaoBin Z, YunHan H. 2010. Medaka fish stem cells and their applications. *Sci China Life Sci*. 53(4):426-434. doi: 10.1007/s11427-010-0079-3.
- Nagasawa K, Fernandes JMO, Yoshizaki G, Miwa M, Babiak I. 2013. Identification and migration of primordial germ cells in Atlantic salmon, *salmo salar*. Characterization of vasa dead end and lymphocyte antigen 75 genes. *Mol Reprod Dev*. 80(2):118-131. doi: 10.1002/mrd.22142.
- Nagasawa S, Hayashi KM, Furuya M, Iwasaki Y, Yoshizaki G. 2013. Short-term *in vitro* culturing improves transplant ability of type a spermatogonia in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev*. 80(9):763-773. doi: 10.1002/mrd.22208.
- Nakajima S, Hayashi M, Kouguchi T, Yamaguchi K, Miwa M, Yoshizaki G. 2014. Expression patterns of *gdnf* and *gfal1* in rainbow trout



- testis. *Gene Expr Patterns*. 14(2):111-120. doi: 10.1016/j.gexp.2014.01.006.
- Nakamura S, Kobayashi K, Nishimura T, Tanaka M. 2011. Ovarian germ line stem cells in the teleost fish medaka (*Oryzias latipes*). *Int J Biol Sci*. 7(4): 403-409.
- Nwokwa MC. 2012. The review of recent advances in fish genetics and biotechnology. *Cont J Fisheries Aquatic Sci*. 6(1):9-18 doi: 10.5707/cjfas.2012.6.1.9.18.
- Okuda KS, Tan PJ, Patel V. 2016. Sprouting buds of zebrafish research in Malaysia: First Malaysia zebrafish disease model workshop. *Zebrafish*. 13(2):138-141. doi: 10.1089/zeb.2015.1203.
- Okutsu T, Suzuki K, Takeuchi Y, Yoshizaki G. 2006. Testicular germ cells can colonize sexually undifferentiated embryonic gonad and produce functional eggs in fish. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103(8):2725-2729. doi: 10.1073/pnas.0509218103.
- Okutsu T, Shikina S, Kano M, Takeuchi Y, Yoshizaki G. 2007. Production of trout offspring from triploid salmon parents. *Science*, 317(5844):1517. doi: 10.1126/science.1145626.
- Okutsu T, Shikina S, Sakamoto T, Mochizuki M, Yoshizaki G. 2015. Successful production of functional Y eggs derived from spermatogonia transplanted into female and subsequent production of YY super males in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*. 446:298-302. doi: 10.1016/j.aquaculture.2015.05.020.
- Otteson DC, Hitchcock PF, 2003. Stem cells in the teleost retina: persistent neurogenesis and injury-induced regeneration. *Vision Res*. 43(8):927-936. doi: 10.1016/S0042-6989(02)00400-5.
- Pan Z, Sun M, Liang X, Li J, Zhou F, Zhong Z, Zheng Y. 2016. The controversy challenges and potential benefits of putative female germ line stem cells research in mammals. *Stem Cells Int*. 1-9. doi: 10.1155/2016/1728278.
- Prykhodzij SV, Vinothkumar R, Berman JN. 2016. A guide to computational tools and design strategies for genome editing experiments in zebrafish using CRISPR/Cas9. *Zebrafish*. 13(1):70-73. doi: 10.1089/zeb.2015.1158.
- Psenicka M, Saito T, Linhartova Z, Gazo I. 2015. Isolation and transplantation of sturgeon early stage germ cells. *Theriogenology*. 83(6):1085-1092. doi:10.1016/j.theriogenology.2014.12.010.
- Saito T, Kazeto RG, Arai K, Yamaha E. 2008. Xenogenesis in teleost fish through generation of germ-line chimeras by single primordial germ cell transplantation. *Biol Reprod* 78(1):159-166. doi: 10.1095/biolreprod.107.060038.
- Sato M, Morita T, Katayama N, Yoshizaki G. 2014. Production of genetically diversified fish seeds using spermatogonial transplantation. *Aquaculture*. 422-423:218-224. doi: 10.1016/j.aquaculture.2013.12.016.
- Shang M, Su B, Lipke E, Perera DA, Li C, Qin Z, Li Y, Dunn DA, Cek S, Peatman E, Dunham RA. 2015. Spermatogonial stem cells specific marker identification in channel catfish *Ictalurus punctatus* and Blue Catfish *I. furcatus*. *Fish Physiol Biochem*. 41(6):1545-1556. doi: 10.1007/s10695-015-0106-1.
- Shikina S, Nagasawa K, Hayashi M, Furuya M, Iwasaki Y, Yoshizaki G. 2013. Short-term *in vitro* culturing improves transplant ability of type a spermatogonia in Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Mol Reprod Dev*. 80(9):763-773. doi: 10.1002/mrd.22208.
- Sosa MAG, De Gasperi R, Elder GA. 2010. Animal transgenesis: an overview. *Brain Struct Funct*. 214(2-3):91-109. doi: 10.1007/s00429-009-0230-8.
- Staal FJT, Spaik HP, Fibbe WE. 2016. Visualizing human hematopoietic stem cell trafficking *in vivo* using zebrafish xenograft model. *Stem Cells Dev*. 25(4):360-365. doi: 10.1089/scd.2015.0195.
- Tanaka M, Nakamura S, Saito D, Kobayashi K, Nishimura T. 2011. Ovarian structures that support reproductive cycle germ line stem cells and their niche structure in ovary. *Indian J Sci Technol*. 4(8): 93-94.
- Taylor KL, Grant NJ, Temperley ND, Patton EE. 2010. Small molecule screening in zebra fish: an *in vivo* approach to identifying new chemical tools and drug leads. *Cell Commun Signaling*, 8(11):1-14. doi: 10.1186/1478-811X-8-11.
- Tesarik J. 2002. Reproductive semi-cloning respecting biparental embryo origin embryos from syngamy between a gamete and a haploidized somatic cell. *Hum Reprod*. 17(8):1933-1937. doi: 10.1093/humrep/17.8.1933.
- Tesarik J, Mendoza C. 2003. Somatic cell haploidization: an update. *Reprod Biomed Online*, 6(1):60-65. doi: 10.1016/S1472-6483(10)62056-1.
- Tessarollo L, Palko ME, Akagi K, Coppola V. 2009. Gen targeting in Mouse embryonic stem cells. *Methods Mol Biol*. 530:141-164. doi: 10.1007/978-1-59745-471-1\_8.
- Thomson JA, Itskovits-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. 1998. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282(5391):1145-1147. doi: 10.1126/science.282.5391.1145.
- Tsai HJ. 2008. Use of transgenic fish possessing special genes as model organisms and potential applications. *J Genet Mol Biol*. 19(1):22-38.
- Wakamatsu Y, Ozato K, Hashimoto H, Kinoshita M, Sakaguchi M, Iwamatsu T, Hyodo-Taguchi Y, Tomita H. 1993. Generation of germ-line chimeras in medaka (*Oryzias latipes*). *Mol Mar Biol Biotechnol*. 2:325-332.
- Wakamatsu Y, Ozato K, Sasado T. 1994. Establishment of a pluripotent cell line derived from a medaka (*Oryzias latipes*) blastula embryo. *Mol Mar Biol Biotechnol*, 3(4):185-191. doi:10.1016/S0925-4773(96)00596-5.
- Wan Y, Almeida AD, Rulands S, Chalour N Muresan L, Wu Y, Simons BD, He J, Harris W. 2016. The ciliary marginal zone of the zebrafish retina:

- clonal and time-lapse analysis of a continuously growing tissue. *Development*. 143(7):1099-1107. doi: [10.1242/dev.133314](https://doi.org/10.1242/dev.133314).
- Wong TT, Crodian J, Collodi P. 2011. Zebra fish Germ line Chimeras Produced by Transplantation of Ovarian Germ Cells into Sterile Host Larvae. *Biol Reprod*. 84(6):1190-1197. doi: [10.1095/biolreprod.110.088427](https://doi.org/10.1095/biolreprod.110.088427).
- Wong TT, Collodi P. 2012. Application of fish stem cell technology to aquaculture and marine biotechnology. In: Fletcher GL, Rise M L. eds. *Aquaculture Biotechnology*. Wiley. p.193-206. doi: [10.1002/9780470963159.ch12](https://doi.org/10.1002/9780470963159.ch12).
- Yan Y, Du J, Chen T, Yi M, Li M, Wang S, Li CM, Hong Y. 2009. Establishment of medakafish as a model for stem cell-based gene therapy: Efficient gene delivery and potential chromosomal integration by baculoviral vectors. *Exp Cell Res*. 315(13):2322-2331. doi: [10.1016/j.yexcr.2009.04.015](https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2009.04.015).
- Yan Y, Hong N, Chen T, Li M, Wang T, Guan G, Qiao Y, Chen S, Schartl M, Li CM, Hong Y. 2013. P53 Gene targeting by homologous recombination in fish ES cells. *PLoSone*. 8(3):1-9. doi: [10.1371/journal.pone.0059400](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059400).
- Yazawa R, Takeuchi Y, Morita T, Ishida M, Yoshizaki G. 2013. The Pacific Bluefin tuna (*Thunnus orientalis*) dead end gene is suitable as a specific molecular marker of type a spermatogonia. *Mol Reprod Dev*. 80(10):871-880. doi: [10.1002/mrd.22224](https://doi.org/10.1002/mrd.22224).
- Yi M, Hong N, Hong Y. 2009. Generation of medaka fish haploid embryonic stem cells. *Science*, 326(5951): 430-433. doi: [10.1126/science.1175151](https://doi.org/10.1126/science.1175151).
- Yi, M, Hong N, Hong Y. 2010. Derivation and characterization of haploid embryonic stem cell cultures in medaka fish. *Nat Protoc*. 5(8): 1418-1430. doi: [10.1038/nprot.2010.104](https://doi.org/10.1038/nprot.2010.104).
- Yoshizaki G, Takeuchi Y, Kobayashi T, Ihara S, Takeuchi T. 2002. Primordial germ cells: the blueprint for a piscine life. *Fish Physiol Biochem*. 26(1); 3-12. doi: [10.1023/A:1023388317621](https://doi.org/10.1023/A:1023388317621).
- Yoshizaki G, Ichikawa M, Hayashi M, Iwasaki Y, Miwa M, Shikina S, Okutsu T. 2010a. Sexual plasticity of ovarian germ cells in rainbow trout. *Development*. 137(8):1227-1230. doi: [10.1242/dev.044982](https://doi.org/10.1242/dev.044982).
- Yoshizaki G, Okutsu T, Ichikawa M, Hayashi M, Takeuchi Y. 2010b. Sexual plasticity of rainbow trout germ cells. *Anim Reprod*. 3(7): 187-196.
- Yoshizaki G, Okutsu T, Morita T, Terasawa M, Yazawa R, Takeuchi Y. 2012. Biological characteristics of fish germ cells and their applications to developmental biotechnology. *Reprod Domest Anim*. 47(4):187-92. doi: [10.1111/j.1439-0531.2012.02074](https://doi.org/10.1111/j.1439-0531.2012.02074).