



## 1001 – BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA PROJELERİNİ DESTEKLEME PROGRAMI

**Başvurunun bilimsel değerlendirmeye alınabilmesi için, Arial 9 yazı tipinde hazırlanması ve toplamda 20 sayfa geçmemesi gerekmektedir. (EK-1 ve EK-2 hariç) (\*)**

Araştırma proje önerisi değerlendirme formuna

[http://www.tubitak.gov.tr/tubitak\\_content\\_files/ARDEB/destek\\_prog/danisman\\_panelist/DA\\_Panelist\\_Proje\\_Onerisi\\_Degerlendirme\\_Formu.doc](http://www.tubitak.gov.tr/tubitak_content_files/ARDEB/destek_prog/danisman_panelist/DA_Panelist_Proje_Onerisi_Degerlendirme_Formu.doc)  
adresinden ulaşabilirsiniz.

### 1. PROJE ÖZETİ

Proje başlığı, özeti ve anahtar kelimeler Türkçe ve İngilizce yazılmalıdır. **Proje özetleri birer sayfayı geçmemelidir.** Özet (summary) projenin soyut bir tanıtımı değil, ana hatları ile önerilen projenin:

- Amacı,
- Konunun kısa bir tanıtımı, neden bu konunun seçildiği ve özgün değeri,
- Kuramsal yaklaşım ve kullanılacak yöntemin ana hatları,
- Ulaşılmak istenen hedefler ve beklenen çıktılarının bilimsel, teknolojik ve sosyo-ekonomik ne tür katkılarda bulunabileceği

hususlarında ayrı paragraflar halinde kısa ve net cümlelerle bilgi verici nitelikte olmalıdır.

Anahtar Kelimeler ve İngilizce karşılıkları (keywords) uluslararası literatüre uygun bir şekilde seçilerek özet sayfasının sonundaki ilgili bölümde ayrıca belirtilmelidir.

#### Proje Başlığı : Erişkin Olfaktör Nörogenezi'nde DNA Metilasyon ve Demetilasyon Dinamiklerinin Olası Rolü

##### Proje Özeti

Doğadaki en az bilinen biyolojik yapılardan biri olan memeli beyninin fonksiyonları, fetal dönemden başlayarak yaşamın tüm evrelerinde dinamik şekilde değişen ve nörogenez olarak adlandırılan karmaşık nörobiyolojik olaylar sonucunda ortaya çıkmaktadır. Erişkin yaşamda hayat boyu normal işleyişini kazanabilmek için, gelişim sırasında oldukça dinamik olduğu bilinen nörogenez olayları erişkin beyninde gerçekleşen fizyolojik işleyişin alt yapısını adeta anatomik bir tesis kurarak gerçekleştirir. Fakat oluşan bu sistemin hayat boyu devamlı çalışabilmesi için erişkin yaşamda da nörogenez olaylarının sınırlı anatomik bölgelerde de olsa sürekli olarak devam ettiği bilinmektedir. Erişkin yaşamda nörogenezin devam ettiği sistemlerden birisi lateral ventrikülleri çevreleyen subventriküler tabaka (SVT) ve bulbus olfaktorius (BO) arasındaki sinirsel hatır. Bu anatomik hatta kısa döngüler halinde fakat tüm yaşam boyu devam eden Erişkin Olfaktör Nörogenezi (EON) olarak adlandırılan bu nörobiyolojik olayların olfaktör hafızanın oluşması, koku ayırımı ve çevreden gelen uyarılara bağlı oluşturulan emosyonel davranışların düzenlenmesi gibi önemli biyolojik olayların kontrolünde kilit rol oynadığı bilinmektedir. Erişkin olfaktör nörogenezinin hayat boyu sabit olmadığı bilinmekle birlikte annelerde hormonal değişimlerin etkisiyle gebelik ve laktasyon sırasında dinamik şekilde arttığı gözlenmiştir. Gebelikte ortaya çıkan koku alma değişiklikleri de bu durumun bir kanıtı olarak düşünülebilir. Normal EON basamaklarında hücresele farklılaşmanın altında yatan moleküler programlanmaya cevap arayacağımız bu çalışmada EON'nin endojen faktöre bağlı değişimine eşsiz bir örnek olan gebelik ve laktasyon etkisinin model olarak kullanılması planlanmıştır.

Kromatin materyalinin DNA metilasyon ve demetilasyon yoluyla epigenetik modifikasyonunun, normal beyin gelişimi için gerekli temel bir kimyasal işlem olduğu bilinmektedir. Bu döngünün DNA'nın üç boyutlu yapısını devamlı olarak değiştirerek gen ekspresyonunu düzenlediği ve postmitotik yolla bir sonraki hücreye aktararak (DNA diziliminde bir değişikliğe neden olmadan) hücrelerin yeni kimlikler kazanmasını yani farklılaşmasını kontrol ettiği anlaşılmıştır. Bu epigenetik modifikasyonların hücresele transkripsiyonu kontrol ederek öğrenme ve hafıza gibi temel memeli fonksiyonlarının altında yatan beyin gelişimi ve plastisitesinde büyük öneme sahip olduğu anlaşılmıştır. DNA metilasyon ve demetilasyon dinamiklerinin beyin gelişimi sırasında nöral farklılaşma ve olgunlaşma gibi kritik nörobiyolojik olaylara paralel olarak değişen, rastgele olmayan aksine zamansal ve uzaysal (Spatio-Temporal) olarak dinamik şekilde değişen düzenli bir program olduğu gösterilmiştir. Fakat Erişkin Olfaktör Nörogenez basamaklarına eşlik eden karakteristik bir DNA metilasyon programı olup olmadığı bilinmemektedir.

Çalışmamızda DNA metilasyon ve demetilasyon dinamiklerinin erişkin olfaktör nörogenezindeki rolü gebelik ve laktasyon etkisi modeli kullanılarak C57 BL6 soy fareler üzerinde araştırılacaktır. Öncelikle erişkin nullipar (daha önce gebe kalmamış) farelerdeki olfaktör nörogenez basamaklarıyla karakterize hücre fenotiplerinin DNA metilasyon ve demetilasyon karakterlerinin histolojik (ışık ve konfokal mikroskopi ile immunohistokimyasal ve elektron mikroskopik olarak morfolojik ve üç boyutlu sinaptik plastisite analizi) ve moleküler düzeyde (flow sitomerik yöntemle ayrılan hedef hücrelerde; kantitatif RT-PCR ile gen analizi ve kolorimetrik yöntemle global DNA metilasyon ve demetilasyon ölçümleri) tarif edilmesi amaçlanmaktadır. Nullipar hayvanlarda belirlenecek bu pattern *normal* ya da *kontrol* olarak kabul edilip yüksek olfaktör nörogenez değişimlerin öngörüldüğü gebelik ve laktasyon hayvanlarının metilasyon ve demetilasyon dinamikleriyle karşılaştırılacaktır. Bu deney tasarısı ile gebelik öncesi, sırası ve sonrasında olfaktör nörogenez basamaklarının DNA metilasyon ve demetilasyon dinamiklerinin belirlenebileceği öngörülmektedir.

Çalışmamızdan elde edilecek bilgilerin söz konusu epigenetik mekanizmaların gebelik öncesi, sırası ve sonrasındaki erişkin nörogenez olaylarının üzerindeki rolü hakkında temel bazı soru işaretlerini yanıtlayabileceği düşünmekteyiz. Ayrıca bu bilgilerin normal dışı nörogenez değişimlerinin gözlendiği birçok nörodejeneratif bozukluğun anlaşılması için yapılacak diğer çalışmalara da önemli ölçüde ışık tutacağı öngörülmektedir.



TÜBİTAK

**Anahtar Kelimeler:** Erişkin Olfaktör Nörogenezi, DNA Metilasyonu ve Demetilasyonu, Epigenetik, Gebelik, Laktasyon

**Project Title :**The Possible Role of DNA Methylation and Demethylation Dynamics on Adult Olfactory Neurogenesis

### Project Summary

Mammalian brain which is the most mysterious biological structure in nature changes dynamically during whole the lifespan starting from the fetal period and occur due to very complex neurobiological events which is called as neurogenesis. In order to gain its proper functions during adulthood, neurogenesis achieve a highly dynamic physiological functioning in the adult brain by building almost an anatomical machinery during development. But for processing continuously lifelong, it is very well known that neurogenesis still continues at least in some limited anatomic regions. The zone between the subventricular zone around the lateral ventricles and the olfactory bulb is known to be one of the regions where neurogenesis persists during the adulthood lifespan. Neurobiological events in this zone continuing by short cycles but last lifelong are called as "Adult Olfactory Neurogenesis" (AON) and known to play a key role in the control of highly significant biological events such as olfactory memory and distinction, and regulating emotional behaviours due to environmental stimuli. Although known to be not stable during whole the lifespan, adult neurogenesis is shown to be increased dynamically during pregnancy and lactation due to hormonal alterations. Effect of pregnancy and lactation which is a unique example of transition in AON by endogeneous factors was aimed to be used as a model in order to answer some key questions in molecular programming of normal AON which is under cellular differentiation.

Epigenetic modification of chromatin by DNA methylation and demethylation mechanisms has a profound effect on gene expression and required for proper brain development. By modifying 3D conformation of the chromatin, DNA methylation cycle regulates the gene expression and persists in postmitotic cells (without changing the DNA sequence) throughout their lifetime, defining their cellular identity. These epigenetic modifications are highly implicated in mammalian brain development and plasticity underlying learning and memory by controlling the cellular transcription. DNA methylation and demethylation dynamics during neural differentiation and maturation are found to be an orderly program (not random but tightly regulated in a highly dynamic spatiotemporal manner) accompanying the critical stages of neurodevelopment. However, whether there is a characteristic DNA Methylation Program, accompanying the stages of adult olfactory neurogenesis is still unknown.

In the present study, we propose to investigate the role of DNA methylation and demethylation dynamics by using the effect of pregnancy and lactation as a model on C57 BL6 strain mice. As the primary objective of the study, we plan to determine the pattern of the DNA methylation and demethylation dynamics of adult olfactory neurogenesis in nulliparous mice via histological (immunohistochemical analyses by light and confocal microscopy and morphometric and 3D synaptic density analyses by electron microscopy) and molecular levels (gene expression analysis by quantitative RT-PCR and global DNA methylation and demethylation measurements by colorimetric method of the target cell population dissociated by flow cytometry). Later on, this identified pattern will be adopted as *normal* or *control* and compared with patterns of the pregnant and lactation period group mice which are predicted to have highly dynamic olfactory neurogenesis alternations. By this experimental design, we propose to determine the before, during and after pattern of DNA methylation and demethylation dynamics of adult olfactory neurogenesis.

We postulate that the possible findings of this proposed study will not only identify the role of DNA methylation on the Adult Olfactory Neurogenesis, but also shed light on the future studies conducted on understanding the neurodegenerative diseases which exhibit abnormal neurogenesis alternations.

**Keywords:** Adult Olfactory Neurogenesis, DNA Methylation and Demethylation, Epigenetics, Pregnancy, Lactation

## 2. AMAÇ VE HEDEFLER

Projenin amacı ve hedefleri ayrı bölümler halinde kısa ve net cümlelerle ortaya konulmalıdır. Amaç ve hedeflerin belirgin, ölçülebilir, gerçekçi ve proje süresinde ulaşılabilir nitelikte olmasına dikkat edilmelidir.

Çalışmamızın ilk amacı, nullipar farelerdeki olfaktör nörogenezinin farklılaşma basamaklarında dönüşüm halindeki hücrelerin DNA metilasyon ve demetilasyon karakterlerinin histolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak belirlenmesidir. Nullipar farelerde belirlenecek bu patern veya karakter normal ya da kontrol olarak kabul edilerek gebe ve laktasyon dönemi farelerin DNA metilasyon ve demetilasyon dinamikleriyle karşılaştırılacaktır. Özetle bu tasarıda, gebelik öncesi, sırası ve sonrasında olfaktör nörogenezinin farklılaşma basamaklarına paralel bir DNA metilasyon programının olup olmadığını anlaşılmaya çalışılmaktadır.

### 3. KONU, KAPSAM ve LİTERATÜR ÖZETİ

Proje önerisinde ele alınan konunun kapsamı ve sınırları, projenin araştırma sorusu veya problemi açık bir şekilde ortaya konulmalı ve ilgili bilim/teknoloji alan(lar)ındaki literatür taraması ve değerlendirilmesi yapılarak proje konusunun literatürdeki önemi, arka planı, bugün gelinen durum, yaşanan sorunlar, eksiklikler, doldurulması gereken boşluklar vb. hususlar açık ve net bir şekilde ortaya konulmalıdır.

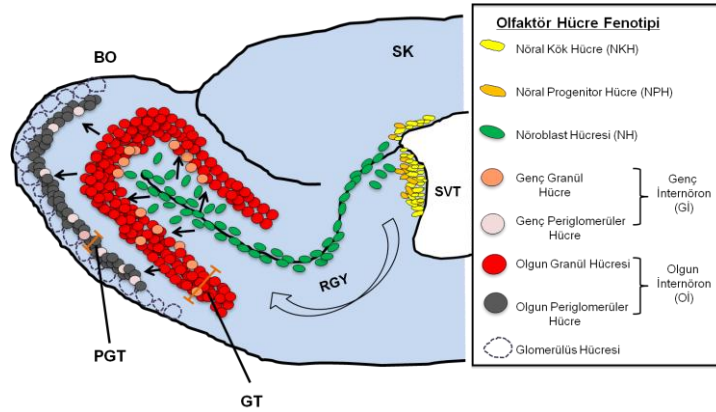
Literatür değerlendirmesi yapılırken ham bir literatür listesi değil, ilgili literatürün özet halinde bir analizi sunulmalıdır. Referanslar <http://www.tubitak.gov.tr/ardeb-kaynakca> sayfasındaki açıklamalara uygun olarak EK-1'de verilmelidir.

Memeli beyin gelişimi ya da nörogenez, embriyonik ve erken postnatal yaşam sırasında genlerin iç ve dış hücrel faktörler ile etkileşimiyle, temel anatomik yapının şekillenmesi ve oluşmakta olan bu anatomik yapının fizyolojik olarak aktif bir sisteme dönüşmesi periyodunu içermektedir (Rakic, 1971). Memeli beyninin geçirdiği bu sürecin oldukça karmaşık nörobiyolojik olaylar dizisinden oluştuğu bilinmektedir. Nörogenezin erken postnatal yaşamın sonuna kadar birçok beyin bölgesinde aktif olarak gerçekleştiği bilinmekle birlikte erişkin yaşamda sadece beyin lateral ventriküllerini çevreleyen subventriküler tabaka (SVT), koku alma işlevini düzenleyen bulbus olfaktorius (BO) ile öğrenme ve hafızayı yöneten hipokampus'un dentat girusu'nun subgranüler tabakasında devam ettiği gözlenmiştir (Altman, 1969; Lois ve Alvarez, 1994; Altman ve Das, 1965; Eriksson vd., 1998). Böylece nörogenezin sadece gelişim sırasında değil sonrasında da yaşam boyu devam ettiği anlaşılmıştır. Erişkin nörogenezinin endojen faktörlerin etkisiyle nasıl değiştiği ve yönlendirildiği memeli beyninin karmaşık işleyişi hakkındaki sayısız soru işaretlerinden biridir. Bu endojen faktörlerden birisi de dramatik hormonal değişimlerin gözlemlendiği, annelerde gebelik ve gebelik sonrasında laktasyon etkisi olarak bilinmektedir (Feierstein, 2012; Shingo vd., 2003). Gebelik sırasındaki hormonal değişimlerin maternal nörogenezi üzerinde büyük dinamikler oluşturduğu bilinmekle birlikte nasıl gerçekleştiği pek çok soru işareti içermektedir (Shingo vd., 2003). Gebeliğin koku alma değişikliklerine yol açtığı bilinen bir gerçektir (Broman A, Olofsson J, Nordin S. (2003) Odor sensitivity and perception in pregnant women. *Chem Senses*;28:E7). Bu durum, gebeliğin bulbus olfaktorius'ta nörogenezi dramatik bir biçimde etkilediğine kanıt olarak değerlendirilebilir. Çalışmamızın konusu olan DNA metilasyon ve demetilasyon dinamiklerinin erişkin olfaktorius nörogenezi üzerindeki etkileri, endojen faktörlerin erişkin beyninin işleyişini değiştirmesine eşsiz bir örnek olan gebelik ve laktasyon etkisi modeli kullanılarak araştırılacaktır.

Erişkin nörogenezinin gerçekleştiği bu bölgelerden SVT'nın yaşam boyu süren bir nöral kök hücre (NKH) üreticisi gibi görev yaptığı bilinmektedir (Alvarez ve Garcia, 2002). Subventriküler tabakada çoğalan NKH'lerin ilk olarak ara geçiş formu olarak bilinen nöral progenitör hücrelere (NPH) farklılaştığı, NPH'lerinin ise nöroblast hücrelerine dönüştüğü gösterilmiştir (Alvarez ve Garcia, 2002). Bu çoğalma ve farklılaşma işlemlerinin SVT'da gerçekleştiği bilinmekle birlikte, immatür nöron özelliğindeki nöroblastların, gelişim sırasında şekillenmiş olan Rostral Göç Yolu (RGY) (Rostral Migratory Stream) boyunca BO'ya doğru göç ettikleri gösterilmiştir (Lois ve Alvarez-Buylla; Pencea, 2001). Bulbus olfaktorius'a giriş yapan nöroblastların daha sonra BO'da hedef bölgeleri olan granüler (GT) ve periglomerüler tabakalara (PGT) yerleştikleri anlaşılmıştır (Lois ve Alvarez-Buylla, 1994; Lois vd., 1996; Luskin, 1993). Bu tabakalara yerleşen nöroblastların belirli bir olgunlaşma sürecinden sonra immatür nöron özelliklerini kaybederek genç internöronlara farklılaştıkları gösterilmiştir. Şekil 1'de yukarıda bahsedilen nöronal olayları özetlemek için oluşturduğumuz şematik çizim görülmektedir (Şekil 1). Temel olarak gabaerjik (GAer) ve dopaminerjik (DOer) özellikte olan bu internöronların kısa süre içerisinde olgunlaşarak, BO'un temel hücreleri sayılan mitral ve tufted hücreleriyle (MTH-olfaktör epitelinden gelen duyuşal uyarıları direkt olarak kortikal merkezlere ileten projeksiyon nöronları) dendro-dendritik özellikte bağlantılar kurdukları anlaşılmıştır (Rall ve Shepherd, 1968; Shepherd, 2007). İlgili BO tabakalarındaki GAer ve DOer internöronlar Glutamik Asit Dekarboksilaz (Gad 65/67) ve Tirozin Hidroksilaz (TH) gibi kendileriyle karakterize enzim proteinlerin işaretlenmesiyle kolaylıkla izlenebilmektedir (Ninkovic vd., 2010; Parrish vd., 2011). Bu internöronlar MTH'leri ile yapacakları sinirsel iletişim için gerekli olan sinaptik ağı oluşturduktan sonra elektrofizyolojik olarak aktif duruma geçerek MTH'lerin olfaktorius epitel'den aldığı koku stimuluslarını üst merkezlere iletimini düzenlemektedirler. Sinaptik düzeydeki bu düzenlenmenin olfaktorius hafızanın oluşması, koku ayırımı ve çevreden gelen uyarılara bağlı oluşturulan emosyonel davranışların düzenlenmesi gibi önemli biyolojik olayların kontrolünde kilit rol oynadığı bilinmektedir (Lazarini ve Lledo, 2011). Bu nedenle SVT'da başlayan ve hedef olarak BO'da görev alan internöron fenotipinin oluşumuyla sonuçlanan ve hayat boyu döngüsel olarak devam eden; çoğalma, farklılaşma, göç ve olgunlaşma gibi bir dizi nöronal olaylar zincirinden oluşan Erişkin Olfaktör Nörogenezi (EON) koku duyusunun düzenlenmesinde de büyük önem teşkil etmektedir.

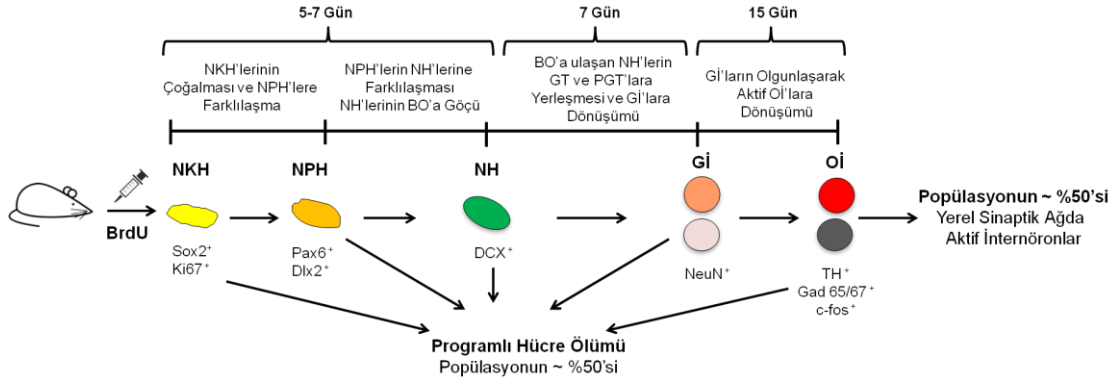
Bu konu üzerine yapılan ilk çalışmalarda, EON döngüsüne giren hücrelerin yer ve zamansal olarak tarifi amacıyla SVT'da doğan NKH soyları Bromodeoksiüridin (5-bromo-2'-deoxyuridine, BrdU) işaretleme yöntemi kullanılarak takip edilmiştir. Bu işaretleme yöntemiyle SVT'da hergün onbinlerce yeni nöral kök hücrenin doğarak EON sürecine girdiği anlaşılmıştır (Alvarez ve Garcia, 2002). Yeni doğan NKH'ler ve onların çoğalmaları SRY (sex determining region Y)-box 2 (SOX2) gibi NKH ve Antigen KI-67 (Ki67) gibi bilindik proliferasyon işaretleyicileri ile gösterilmiştir. Göç eden postmitotik nöroblastların ayırt edilmesinde yaygın olarak kullanılan double-cortin (DCX) işaretlemesi ise SVT'dan köken alan nöroblastların doğumlarını takriben 5-7 gün içerisinde BO'ya ulaştıkları tespit edilmiştir (Gleason, 1999; Alvarez ve Garcia, 2002). Bu nöroblastların BO'ya ulaştıktan sonra bir süre halen DCX ekspresyone ederek immatür nöron özelliklerini korudukları anlaşılmıştır. Doğumlarından sonraki 10-14 günlük süreçte ise azalmaya başlayan DCX ekspresyonlarının 15. günde tamamen kaybolduğu ve hemen ardından olgun nöronlarla karakterize neuronal nuclei (NeuN) proteinini ekspresyone etmeye başladıkları gösterilmiştir (Brown, 2003; Alvarez ve Garcia, 2002). NeuN ekspresyone etmeye başlayan nöronların SVT'da doğumlarından sonraki 15-30 günlük zaman diliminde olgunlaşmaya devam ettikleri gözlenmiştir (Petreanu ve Alvarez, 2002). Doğumlarından 45 gün sonra ise ancak yarısının olgun internöronlar olarak hayatta kaldığı gösterilmiştir (Petreanu ve Alvarez, 2002). Geriye kalan yarısının ise SVT, RGY veya BO'ta nöral kök/progenitör, nöroblast veya olgun nöron formundayken programlı hücre ölüm sürecine girerek yok oldukları gösterilmiştir (Brown, 2003; Alvarez ve Garcia, 2002; Petreanu ve Alvarez, 2002; Kim, 2007). Bu paragraf içerisinde bahsedilen EON'ne giren hücrelerin

moleküler karakterleri ve dönüşümlerinin zamansal özeti Şekil 2'de hazırladığımız şematik çizimde özetlenmektedir (Şekil 2).



**Şekil 1:** BO (bulbus olfaktorius); GT (Granüler Tabaka); PGT (Periglomerüler Tabaka), RMS (Rostral Göç Yolu); SK (Serebral Korteks); SVT (Subventriküler Tabaka)

Yukarıda özetlenen literatür bilgisi EON dinamiklerini oluşturan hücrelerin genel fenotiplerini ve birbirlerine dönüşümlerinin zamanlaması hakkında önemli bilgiler sunmaktadır. Bu birikimin ışığında daha yeni çalışmalar, SVT-OB hattında gerçekleşen bu hüresel dönüşümünün ne gibi faktörlere bağlı olarak gerçekleştiğini aydınlatmaya çalışmıştır. Örneğin nöroblastların OB'a doğru göçlerinin; kılavuz ve itici/çekici moleküller ya da büyüme faktörleri gibi birçok hücre dışı etkene bağlı gerçekleştiği anlaşılmıştır (Ghashghaei vd., 2007; Khodosevich vd., 2009). Benzer şekilde RGY boyunca OB'a kadar ulaşan nöroblastların OB içerisine girişini kontrol eden bazı faktörler de olduğu gösterilmiştir (Yoshihara vd., 2005). Öte yandan SVT'da doğan hücrelerin farklılaşıp OB'a doğru hareket kazanabilmesinin kontrolünde çeşitli transkripsiyon faktörlerinin görev yaptığı anlaşılmıştır. Bu çalışmalarda bir dizi TF'nün test edildiği görülmekle birlikte distal-less homeobox (Dlx) ailesi ve Pax-6 gibi bazı TF'lerin SVT'da başlayan olfaktör internöron oluşumu basamaklarında belirleyici faktörler oldukları göze çarpmaktadır (Long vd., 2007; Brill vd., 2008; Chevigny vd., 2012; Kohwi vd., 2007).



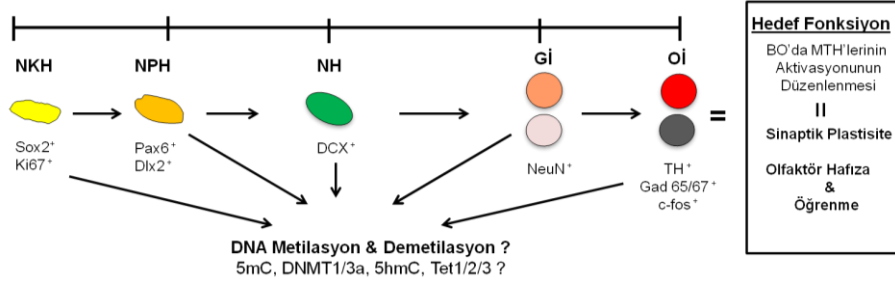
**Şekil 2:** BrdU (Bromodeoksiüridin); Gİ (Genç İnternöron); NH (Nöroblast Hücre); NKH (Nöral Kök Hücre); NPH (Nöral Progenitor Hücre); Oİ (Olgun İnternöron)

Tüm bu bilgi birikimi EON işleyişi hakkında yapılacak diğer çalışmalara yön göstermekle birlikte bu nörobiyolojik olayların rastgele gerçekleşmediğini işaret etmektedir. Aksine yaşam boyu döngüsel olarak tekrarlanan bu işlemler sırasında hücrelerin farklı kimlik kazanarak bir başka nöronal fenotipe dönüşümünün hücre içinde transkripsiyonel olarak çok sıkı bir şekilde kontrol edilmesi gerektiği sorusunu akla getirmektedir. Mevcut literatür farklılaşma basamaklarında çeşitli hücre içi ve dışı belirleyici faktörlerin varlığını sunmakta fakat bu faktörlerin aktifleşmesinden sorumlu genlerin ekspresyonlarının hücre içinde nasıl programlandığının yanıtını vermekte yetersiz kalmaktadır. Önerisini yaptığımız çalışmada, DNA'nın üç boyutlu yapısını devamlı olarak değiştirerek hüresel düzeyde transkripsiyonu kontrol ettiği bilinen DNA metilasyon ve demetilasyon dinamiklerinin EON sırasında gerçekleşen hüresel dönüşüm basamaklarının programlanmasından sorumlu olup olmadığı araştırılacaktır.

DNA metilasyonu, DNA metil transferaz enzimlerinin (DNMT) DNA'nın 5 ucundaki karbon grubuna bir metil grubu eklenmesi (5 metilsitozin-5mC) işlemi katalizlediği basit bir kovalent modifikasyon olarak bilinmektedir. DNA metilasyonu'nun varlığı kromatinin kondensasyonu (heterokromatin) ve ilgili kromatin bölgesindeki transkripsiyonel aktivitenin baskılanması (Transcriptional Repression) ile karakterize olduğu gösterilmiştir (Busslinger vd., 1983; Yisraeli vd., 1988; Jones ve Takai, 2001). Yakın geçmişe kadar 5mC'nin stabil bir modifikasyon olduğu ve metile olmuş DNA'nın zamanla seri hüresel bölünmeler yoluyla pasif şekilde seyrelerek demetile olduğu düşünülmekteydi. Yakın zaman önce keşfedilen Ten Eleven Translocation (Tet1/2/3) ailesi enzimlerinin 5mC'ni oksidatif yolla 5 hidroksimetilsitozine (5hmC) çevirdiğinin gösterilmesiyle metile olmuş DNA'nın aktif bir şekilde demetile olabildiği anlaşılmıştır (Tahiliani vd., 2009).

Bu yakın keşiften çıkan bilgi, yani metile olmuş DNA'nın aktif şekilde demetile olabilmemesinin gen ekspresyonu kontrolünde ne gibi bir önemi vardır sorusunu akla getirmektedir. Buna göre aktif demetilasyon işlemi, kısalımsı ve kondense (heterokromatik) halde bulunan kromatin bölgesinin tekrar açılarak ökromatik yapıya dönüşmesi ve heterokromatik bölgelerdeki

baskılanmış durumdaki gen ekspresyonlarının tekrar aktifleşmesi anlamına gelmektedir. Özetlemek gerekirse, DNA metillendiği zaman (5mC) metile bölgedeki gen ekspresyonları global olarak baskılanmakta, demetile olduğunda ise (5hmC) tekrar aktif duruma geçmektedir. DNA'nın üç boyutlu yapısını büyük dinamiklerle değiştirerek DNA'da global düzeyde gen ekspresyonunu kontrol eden bu epigenetik modifikasyonların hücresel farklılaşma sürecinde postmitotik yolla bir sonraki hücreye aktarıldığı (DNA diziliminde bir değişikliğe neden olmadan) ve hücrelerin yeni kimlikler kazanmasını yani farklılaşmasını kontrol ettiği anlaşılmıştır (Lister vd., 2013). Araştırma grubu üyelerimizden birinin de katıldığı bazı çalışmalarda hücresel DNA metilasyonunun beyin gelişimi sırasında nöral farklılaşma ve olgunlaşma gibi kritik nörobiyolojik olaylara paralel olarak değişen, rastgele olmayan aksine zamansal ve uzaysal (Spatio-Temporal) olarak dinamik şekilde değişen bir program olduğu gösterilmiştir (Chen ve ark., 2013; Resendiz vd., 2013; Zhou vd., 2011; Zhou, 2012;). Ayrıca, DNA metilasyon mekanizmalarının sinaptik plastisite, öğrenme, hafıza ve yaşlanmaya paralel beyindeki kognitif değişikliklerin yönlendirilmesi gibi birçok sinirsel olayın altında yatan nörobiyolojik işlemlerde önemli rol oynadığı gösterilmiştir (Zovkic vd, 2013; Levenson, 2013)).



**Şekil 3:** Erişkin Olfaktör Nörogenez Dönüşüm Basamaklarında DNA Metilasyon ve Demetilasyon Dinamiklerinin Rolü?

Tüm bu bilgiler ışığında, DNA metilasyon ve demetilasyon döngülerinin izlenmesinin, önemli beyin fonksiyonlarının ve bu fonksiyonların çevresel veya endojen faktörlerle değişiminin altında yatan karmaşık nörobiyolojik olayların aydınlatılabilmesi için oldukça etkin bir biyolojik araç olduğunu düşünmekteyiz. Koku alma fonksiyonunun ve kokuya bağlı öğrenmenin biyolojik temelini oluşturan, hayat boyu durmadan tekrarlanan ve sinaptik plastisite yoluyla yaşamın farklı döngülerinde değişime uğrayan olfaktör nörogenez, memeli beyninin sürekli olarak kendini yenilemesine ve çevreye adaptasyonuna mükemmel bir model oluşturmakta ve birçok bilinmeyeni içermektedir. Bu karmaşık sistemin işlemini sağlayan nöral olaylar dizisi olarak bilinen EON hakkında sahip olduğumuz mevcut bilginin halen yeterli düzeyde olmadığı görülmektedir. Bu sebeple çalışmamızda, erişkin olfaktör nörogenez basamakları sırasında farklılaşarak yeni kimlik kazanan hücrelerin DNA metilasyon ve demetilasyon karakterleri incelenecek ve bu nörobiyolojik olayın işleyişine paralel bir DNA metilasyon programı olup olmadığı araştırılacaktır.

Literatür özetinden anlaşıldığı üzere, EON dönüşüm basamaklarının anlaşılabilmesi için hücre soyu takibi (Cell Lineage Tracking), nöral kader belirlenmesi (Neural Fate Determination) ve transgenik hayvan modellerini de içeren çeşitli genetik manipülasyon yöntemleri kullanılmıştır (Gleeson, 1999; Alvarez ve Garcia, 2002; Long vd., 2007). Söz konusu modeller EON'nin anlaşılabilmesi için çeşitli düzeyde önemli soruları cevaplama potansiyeline sahip olmakla birlikte yapılması çok tecrübe gerektiren ve pahalı yöntemler olduğu aşikârdır. Elde ettiğimiz teorik ve pratik bilgiler, bu sistemin işleyişi hakkında önemli sorulara cevap verebilecek etkin bir başka yolun, genetik veya çevresel bir manipülasyon içermeyen normal endojenik faktörlerle oluşan ve olfaktör nörogenez üzerinde annelerde dramatik dinamikler oluşturduğu bilinen *gebelik ve gebelik sonrasında laktasyon etkisinin* deneysel olarak kullanılmasıdır (Feierstein, 2012). Toplumda, gebelik sırasında dramatik koku algısı değişimlerinin olduğu yaygın olarak bilinmektedir ve bu fenomen insan çalışmalarından elde edilen raporlar ışığında ve gebelik hayvan modelleriyle test edilerek doğrulanmıştır (Broman vd., 2003; Gilbert ve Wysocki, 1991; Shingo vd., 2003). Gerçekleştirilen çalışmalarda gebelik hormonlarının olfaktör nörogenez üzerinde büyük değişimlere yol açtığı gösterilmiştir (Shingo vd., 2003). Ayrıca rodentlerde laktasyon sırasında önemli olfaktör nörogenez değişimlerinin olduğu da anlaşılmıştır (Feierstein, 2012; Shingo vd., 2003). Gebelik ve laktasyon sırasında koku algısının değiştiği bilgisi literatüre ek olarak araştırma grubumuz üyelerinin gelişimsel sinirbilim alanında yönettiği veya gerçekleştirdiği tez ve katıldığı yurtdışı araştırma çalışmalarından elde ettiği ampirik deneysel tecrübelerle daha da olgunlaşmış durumdadır (Chen vd., 2011; Chen vd., 2013). Ayrıca söz konusu tez veya araştırma çalışmalarının önemli bir kısmı beyin gelişimi sırasında DNA metilasyon dinamiklerinin anlaşılması üzerine gerçekleştirilmiştir. (Chen vd., 2011; Chen vd., 2013, Resendiz vd., 2013). Bu nedenle elde ettiğimiz teorik bilgilerin yanı sıra mevcut tecrübemiz de bu çalışma hipotezinin oluşturulmasında etkili olmuştur.

Çalışmamızda öncelikli olarak, erişkin nullipar (daha önce gebe kalmamış) farelerdeki olfaktör nörogenez basamaklarıyla karakterize hücre fenotiplerinin histolojik ve moleküler yöntemler kullanılarak DNA metilasyon ve demetilasyon dinamikleri belirlenecektir. Nullipar hayvanlarda belirlenen bu pattern *normal* ya da kontrol olarak kabul edilip yüksek olfaktör nörogenez değişimlerin öngörüldüğü gebelik ve laktasyon hayvanlarının metilasyon ve demetilasyon dinamikleriyle karşılaştırılacaktır. Bu deney tasarısı ile gebelik öncesi, sırası ve sonrasında olfaktör nörogenez basamaklarının DNA metilasyon ve demetilasyon dinamiklerinin belirlenebileceği düşünülmektedir. Böylece, oldukça maliyetli olan transgenik hayvan modelleri kullanmadan, araştırma hedefimiz olan DNA metilasyon ve demetilasyon dinamiklerinin erişkin olfaktör nörogenez üzerindeki rolününün, endojen ve aynı zamanda geçici bir etki olan gebelik ve laktasyon modeli kullanılarak etkin düzeyde aydınlatılabileceği öngörülmektedir.

#### 4. ÖZGÜN DEĞER



Proje önerisinin, özgün değeri (bilimsel kalitesi, farklılığı ve yeniliği, hangi eksikliği nasıl gidereceği veya hangi soruna nasıl bir çözüm geliştireceği ve/veya ilgili bilim/teknoloji alan(lar)ına metodolojik/kavramsal/kuramsal olarak ne gibi özgün katkılarda bulunacağı vb.) ayrıntılı olarak açıklanmalıdır.

Memeli beyni hayvanlar âlemindeki en karmaşık biyolojik yapı olarak kabul edilmektedir. Memelilerin hayvanlar âleminde gelişmişlik seviyesinde en üst sırada yerini almasını sağlayan memeli beyninin işleyişi hakkında bildiklerimizin bilmediklerimize kıyasla çok yetersiz olduğu görülmektedir. Günümüzde Tıp alanında en az aydınlatılmış konuların başında beyin fonksiyonlarının normal işleyişindeki aksaklıklara bağlı bozukluk ve hastalıklar gelmektedir. Bu nedenle temel ve klinik düzeyde sinirbilimle ilgilenen bilim insanları beyin fonksiyonlarının normal dışı işleyişine bağlı bozuklukların altında yatan temel unsurları anlamaya çalışmaktadır. Şüphesiz ki bu eşsiz organın normal dışı işleyişi veya patogenezinin anlaşılabilmesi için öncelikle normal işleyişinin nasıl gerçekleştiğinin moleküler düzeyde doğru şekilde tarif edilmesi gerekmektedir. Beynin normal çalışma düzeni hakkında ne kadar bilgiye sahip olursak normal dışı durumu tarif etmek ve çözüm getirmek yani teşhis ve tedavi yöntemleri geliştirmek için o ölçüde kabileyete sahip olabileceğimiz düşünülmektedir.

Önerisini yaptığımız çalışmada, proje başvurusunda ayrıntılı şekilde tarif edilen memeli beyin gelişimi için büyük öneme sahip DNA metilasyon ve demetilasyon mekanizmalarının Erişkin Olfaktör Nörogenezi'ndeki rolü gebelik ve laktasyon etkisini model olarak kullanarak aydınlatılmaya çalışılacaktır. Literatür incelendiğinde, gerek gelişim gerekse erişkin hayatta gerçekleşen nörogenez dinamiklerini oluşturan nörobiyolojik olayların büyük benzerlik gösterdiği anlaşılmıştır. Ayrıca birçok nörodejeneratif bozukluğun patogenezi incelendiğinde temel nörogenez olaylarının bozulduğu görülmektedir. Temel nörobiyolojik olayların farklı beyin bölgelerinde gerçekleşmesine rağmen çok benzer şekilde işlediği göz önünde bulundurulduğunda farklı sistemlerde nörogenez olaylarının altında yatan molükeler mekanizmalarının anlaşılması birçok nörodejeneratif bozukluğun aydınlatılmasına ışık tutacaktır.

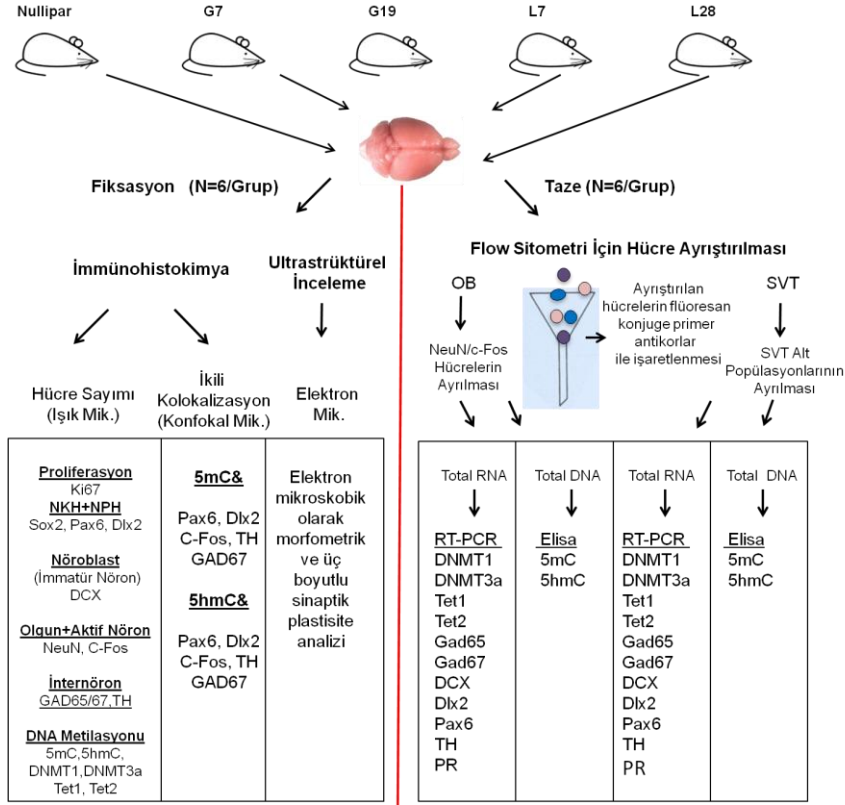
Erişkin olfaktör nörogeneziyle ilgili yapılmış olan çalışmalar bu sistemin işleyişinin anlaşılabilmesi için iyi bir temel oluşturmaktadır. Ayrıca, yöntemsel olarak çalışılabilirliği kolay olan bu sistem genel olarak erişkin nörogenezinin anlaşılması için mükemmel bir model oluşturmaktadır. Literatür incelendiğinde, işleyişi hakkında birçok temel soru işareti bulunan bu sistemin memeli beyin gelişimi için büyük öneme sahip DNA metilasyon karakterinin bilinmediği gözlenmiştir. Yapılması planlanan çalışmada, DNA metilasyon mekanizmaları alanında şimdiye kadar elde etmiş olduğumuz teorik bilgi ve pratik tecrübeyi kullanarak erişkin olfaktör nörogenez basamaklarının kontrolünün nasıl gerçekleştiğini aydınlatmaya çalışacağız. Özgün bilgiler elde etmeyi umduğumuz hipotezimize ait soruların yanıtlanması durumunda erişkin yaşamda beynin farklı bölgelerinde gerçekleşen nörogenez olaylarının daha iyi anlaşılabilmesi için önemli bir bilgi birikimi oluşturacağı kanaatindeyiz.

## 5. YÖNTEM

Projede uygulanacak yöntem ve araştırma teknikleri (veri toplama araçları ve analiz yöntemleri dahil) ilgili literatüre atıf yapılarak (gerekirse ön çalışma yapılarak) belirgin ve tutarlı bir şekilde ayrıntılı olarak açıklanmalı ve bu yöntem ve tekniklerin projede öngörülen amaç ve hedeflere ulaşmaya elverişli olduğu ortaya konulmalıdır.

Projede uygulanacak yöntem(ler)le ilerleme kaydedilememesi durumunda devreye sokulacak alternatif yöntem(ler) de (B planı) belirlenerek açık bir şekilde ifade edilmelidir.

Aşağıdaki şematik çizimde deney tasarımı ve gerçekleştirmeyi planladığımız tüm işlemler özetlenmektedir.



### Çalışma Ana Grupları:

Çalışmamızda MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan temin edilecek C57 BL6 soy erişkin dişi fareler kullanılacaktır. Çalışma tasarımı ana gruplar; Nullipar (hiç gebe kalmamış), Gebelik 7. Günü (G7), G19, 7. Lohusa Günü (L7) ve L19 grubu dişi farelerden oluşmaktadır.

Çalışmamızda 5 ana grup ve elde edilecek dokular üzerinde yapılacak birçok işlem bulunmaktadır. Benzer alanlarda yapılan araştırmalarda laboratuvar ortamında çeşitli işlemler sırasında birçok karışıklık olabildiği gözlenmektedir. Bu karışıklıklar çok değerli olan doku, kimyasal sarf ve zamanın kaybıyla sonuçlanabilmektedir. Sıkça karşılaşılabilen bu karışıklıkların önlenmesi için, tasarımı yaptığımız çalışmaya başlamadan önce farklı deney grupları ve onlarla gerçekleştireceğimiz tüm işlemler için bir renk belirlenip tüm çalışma boyunca ilgili renk bant ve işaretleyicilerin hayvan kafesi, numune tüpleri, mikrotüpler ve benzeri malzemeler üzerine yapıştırılmasıyla söz konusu karışıklıkların önlenmesi planlanmaktadır.

### Çiftleştirme Paradigması ve Gebelik Tayin Yöntemi:

Çiftleştirme işleminin kalitesini arttırmak amacıyla damızlık olarak kullanılacak erkek fareler bir hafta boyunca her biri ayrı kafeslerde barındırılacaklardır. Çiftleştirme işlemi MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı üretim biriminde, karanlık evresinin başlangıcında her bir erkek fare kafesine ikişer dişi farenin iki saat süreyle bırakılmasıyla gerçekleştirilecektir. İki saatlik çiftleştirme işlemi sonunda dişi fareler vajinal tıkaç için kontrol edilip (kırmızı lamba ışığı yardımıyla), vajinal tıkaç görülen dişi fareler, sıfırıncı gün gebe (G0) kabul edilerek ağırlıkları ölçülecektir (Chen vd., 2011; Chen vd., 2013). Gebe Tayin Edilen G7 ve G19 grubu gebe fareler kesim günlerine kadar ayrı kafeslerde barındırılacaktır. L7 ve L28 grubu fareler ise hem gebelik sırasında hem de doğumdan sonra yavrularıyla beraber ayrı kafeslerde barındırılacaktır.

### Dokuların Elde Edilişi:

Her bir ana grup dokuların elde edilişi bakımından 2 alt gruba (n=6) ayrılacaktır. Birinci alt gruba ait farelerden elde edilen dokular histolojik işlemlerde kullanılacağı için bu alt grup farelerin %4'lük paraformaldehit solüsyonu ile intrakardiyak perfüzyonları gerçekleştirilecektir. İkinci alt grup farelerden elde edilecek dokular ise Flow Sitometrik ve moleküler analizlerde kullanılacağı için taze şekilde izole edilecektir.



### **Intrakardiyak Perfüzyon:**

Kesim saati gelen fareler vücut ağırlıklarına göre 10 mg/kg Ksilazin ve 100 mg/kg dozda Ketamin kullanılarak intraperitoneal enjeksiyon yoluyla derin anestezi altına alınacaktır. Daha sonra göğüs kafesleri uygun cerrahi yöntem ile açılacak ve kalp kontraksiyona devam ederken, bir kanül ile kalbin apeksinden sol ventrikül içine girilerek oda sıcaklığındaki %9'luk serum fizyolojik sıvısı dolaşıma verilmeye başlanacaktır. Sonra sağ atriuma makasla bir kesi yapılarak, kanın dışarı akışı gözlenecektir. Ardından aynı şekilde, +4°C sıcaklıkta 0.1M'lık sodyum fosfat ile tamponlanan % 4'lük paraformaldehit tespit solüsyonu sol ventrikülden dolaşıma verilecektir. Bu işlem sonrasında uygun cerrahi aletler yardımıyla ilk önce deri ve ardından da kafatası açılarak beyin dokusu dikkatli bir şekilde izole edilecektir. +4°C sıcaklıkta yeni hazırlanmış paraformaldehit solüsyonu içerisinde en az 48 saat boyunca tespit edilmesi sağlanacaktır. Uzun dönem saklanması gereken beyin dokuları 48 saatlik %4'lük paraformaldehit fiksasyonundan sonra %0.1'lik paraformaldehit solüsyonu içerisine alınacak ve iki haftada bir kez bu solüsyon taze ile değiştirilecektir ve immunohistokimyasal işlemlerde kullanılabilecek kadar +4°C sıcaklıkta muhafaza edilecektir.

### **Fikse Edilmiş Beyin Dokularının İmmunohistokimyasal İşlemlere Hazırlanması:**

Çalışmamızdaki tüm immunohistokimyasal işlemler serbest yüzdürme (Free Floating) tekniğiyle gerçekleştirilecektir. Serbest yüzdürme tekniğiyle işaretleme işlemine sokulacak beyinlerden vibratom aleti ile kesitler alınacaktır. Çalışmamızda belirlenen proteinlerin immunohistokimyasal ekspresyonlarının amaca yönelik olarak koronal veya sagittal kesitler üzerinde tespit edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle her beyin sagittal hatta ortadan ikiye ayrılacak ve her bir beyin yarı küresinden amaca yönelik olarak koronal ve sagittal planda kesitler alınacaktır. Serbest yüzdürme tekniğiyle işaretleme yapacağımız beyin kesitlerinden vibratom kesitler almak için beyinler %10'luk jelatin bloklara gömülecektir. Laboratuvarımızda kullandığımız protokole göre aynı jelatin bloğuna 3 beyin yarımını birarada gömülebilmekteyiz. Buna göre farklı gruplara ait 3 beyin yarımını aynı jelatin blok içerisine gömülecektir. Böylece gerçekleştirilecek immunohistokimya işleminde birden fazla grubun aynı jelatin kesitler içerisinde eş zamanlı olarak tüm işlemlere maruz kalması sağlanacaktır (Chen vd., 2011; Chen vd., 2013).

### **Jelatin Blok Hazırlanması:**

Bu işlem için ilk önce distile su içerisinde %10'luk jelatin solüsyonu hazırlanacaktır. İlk aşamada jelatin solüsyonu plastik kalıbın yarısına kadar doldurularak +4°C'de yarım saat süreyle bekletilecek ve jelatinin katılaşması sağlanacak ve kalıp oda sıcaklığına çıkarılacaktır. Beyin yarımını bir petri kabının içerisindeki sıvı haldeki jelatin solüsyonuna batırılıp çıkarılarak hızlı bir şekilde katılaşmış olan yarısı dolu halde bulunan jelatin bloğunun üzerine rostrokaudal ve dorsoventral düzlemde çok dikkatli biçimde yerleştirilecektir. Beyin yarımını yerleştirilmiş olan bloğun geri kalan kısmı dikkatli bir şekilde jelatin solüsyonu ile tamamlanarak bloğun +4°C'de yarım saat süreyle katılaşması beklenmektedir. Katılaşmış jelatin blok plastik kalıp içerisinde çıkarılarak en az iki gün süreyle +4°C sıcaklıkta % 4'lük paraformaldehit solüsyonu içerisinde tespit edilecektir. Yeterli derecede fikse olmuş jelatin bloklar titreşimli vibratom aletine yerleştirilerek blok içerisindeki beyin dokularından 40µm kalınlığında koronal veya sagittal kesitler alınacak ve kesitler +4°C'de PBS içerisinde immunohistokimyasal işlemler gerçekleştirilene kadar muhafaza edilecektir (Chen vd., 2011; Chen vd., 2013). Elde edilen beyin amaca yönelik olarak immunohistokimyasal (3,3'-Diaminobenzidine (DAB) ile işaretleme) ya da immunofloresan (floresan konjuge boya ile işaretleme) yöntemleriyle boyanacaktır. İmmunohistokimyasal olarak boyanan kesitler ışık mikroskobu, immünfloresan olarak boyananlar ise ilk önce floresan sonrasında ise konfokal mikroskop altında değerlendirilecektir.

### **Serbest Yüzdürmeli (Free Floating) İmmunohistokimya Yöntemi:**

Bu yöntemde antikor inkübasyonu, yıkanması ve benzeri işlemlerde 6'lı kuyucuklu hücre kültürü tabakları kullanılarak vibratom kesitlerin ilgili boyama basamağının gerektirdiği solüsyon içerisinde serbest olarak yüzdürülmesi yoluyla gerçekleştirilmektedir. Tüm bu işlemler orbital çalkalayıcı kullanılarak gerçekleştirilmektedir. Serbest yüzdürme tekniği kullanarak daha önce gerçekleştirdiğimiz çalışmalara ait bilgilere ilgili referanslardan ulaşılabilmektedir (Chen vd., 2011; Chen vd., 2013).

### **İmmunohistokimyasal İşaretlemelerde Seçilecek Antikorlar İçin Genel Kriterler:**

Yeteri kadar özelleşmiş olmayan bir antikorun kullanılması, zaten oldukça pahalı olan bu sarf malzemelerinin, değeri tartışmasız olan hayvan dokularının hem de araştırma için harcanan zamanın boşa gitmesi ile sonuçlanmaktadır. Çalışmamızda planladığımız ticari olarak elde edilecek primer veya sekonder antikorların çoğunluğu şimdiki dek kullandığımız ve güvenilirliğini denediğimiz antikorlardır. İlk defa kullanılacak antikorlar ise literatür tarafından kabul görmüş yüksek kalitedeki araştırmalarda birçok kere kullanılmış olanlar arasından seçilecektir. Buna rağmen ticari olarak elde edilen her bir antikorun yüksek kalitede çalışıp çalışmadığı ve özgünlük derecesi farklı konsantrasyonlar kullanılarak ve mutlaka negatif kontroller oluşturularak optimum boyanma koşullarıyla en az iki farklı pilot boyama protokolüyle birbirlerine eş 3 farklı doku üzerinde belirlenecektir. Tüm bu işlemlere rağmen beklenen kaliteye ulaşmayan hiçbir antikor çalışmamızda kullanılmayacaktır.

### **Işık Mikroskopik (3,3'-Diaminobenzidine tetrahidroklorür) İnceleme İçin İşlemler:**

- 0,1M PBS ile 3 kez 5`er dakika (3x5) yıkanır.
- %3`lük hidrojen peroksit solüsyonunda 10 dakika inkübe edilir.
- 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.
- PBS içinde hazırlanmış %1`lik triton-X solüsyonunda bir gece muamele edilir.
- Ertesi sabah 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.
- % 0,1 Triton-X ve %1,5 normal serum içeren PBS solüsyonunda 90 dakika bloklanır.





- İlgili primer antikorun bloklama solüsyonu içerisinde uygun dilüsyonu sağlanır ve oda sıcaklığında en az 18 saat inkübasyona bırakılır.
- 0,1M PBS ile 6x5 yıkanır.
- Uygun sekonder antikorun bloklama solüsyonu içerisinde optimum dilüsyonuyla oda sıcaklığında en az 90 dakika inkübasyona bırakılır.
- 0,1M PBS ile 6x5 yıkanır.
- Peroksidaz konjuge streptavidin solüsyonu ile 90 dakika inkübe edilir.
- 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.
- 0,1M Tris-HCL tamponu (TBS) ile 3x5 yıkanır.
- 1mg/ml oranında 3,3'-Diaminobenzidine tetrahidroklorür (DAB) solüsyonunda 15 dakika inkübe edilir.
- DAB solüsyonuna 1ml/1µl oranında %3'lük hidrojen peroksit eklenerek renk reaksiyonu sağlanır.
- Genellikle 5-10 dakikalık süreç boyunca kesitler mikroskop altında uygun renk sağlanana kadar kontrol edilecektir. Not: Bu basmağın süresi her primer antikor için optimize edilecektir.
- 0,1M TBS ile 3x5 yıkanır.
- 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.
- Lam üzerine zarar vermeden yapıştırılır (mounting) ve bir gece bekletilerek kurumaları sağlanır.
- Lamalar metil green (counterstaining) ile boyandıktan sonra lamel ile kapatılır.

### İmmünofloresan İşaretleme İçin:

- 0,1M PBS ile 3 kez 5'er dakika (3x5) yıkanır.
- PBS içinde hazırlanmış %1'lik triton-X solüsyonunda bir gece muamele edilir.
- Ertesi sabah 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır.
- % 0,1 Triton-X100 ve %1,5 normal serum içeren PBS solüsyonunda 90 dakika bloklanır.
- Birinci primer antikorun bloklama solüsyonu içerisinde uygun dilüsyonu sağlanır ve oda sıcaklığında en az 18 saat inkübasyona bırakılır.
- 0,1M PBS ile 6x5 yıkanır.
- Uygun floresan konjuge sekonder antikorun bloklama solüsyonu içerisinde optimum dilüsyonuyla oda sıcaklığında en az 90 dakika inkübasyona bırakılır.
- 0,1M PBS ile 3x5, 3x15, 3x45 yıkanır. (+4°C'de (buzdolabında) ve karanlık ortamda)
- İkinci primer antikorun bloklama solüsyonu içerisinde uygun dilüsyonu sağlanır ve +4°C'de (buzdolabında) 48 saat süreyle inkübasyona bırakılır
- Ertesi sabah 0,1M PBS ile 3x5 yıkanır (Oda Sıcaklığında)
- Uygun floresan konjuge sekonder antikorun bloklama solüsyonu içerisinde optimum dilüsyonuyla oda sıcaklığında en az 90 dakika inkübasyona bırakılır.
- 0,1M PBS ile 3x5, 3x15, 3x45 yıkanır. (+4°C'de (buzdolabında) ve karanlık ortamda)
- 4',6-Diamidino-2-Phenylindole (DAPI) içeren kapatma medyumunu ile dikkatlice lam üzerine yapıştırılır (mounting) ve hızlıca lamel ile kapatılır. (Floresan boyaların solmaması için hızla gerçekleştirilir)

Çalışmamızda immünofloresan işaretleme yalnızca ikili boyamalar için kullanılacaktır. İkili işaretlemede öncelikli dikkat edilmesi gereken hususlar aşağıda kurgusal örnekleriyle birlikte sıralanmıştır.

1. Kullanılacak primer antikorlar aynı türden elde edilmemiş olmasına dikkat edilecektir.

Örnek: mouse-anti-5mC/mouse-anti-NeuN (**Yanlış**)  
mouse-anti-5mC/goat-anti-NeuN (**Doğru**)

2. Bloklama solüsyonunda kullanılan normal serumun elde edildiği türün kullanılan primer antikorlardan herhangi birinin elde edildiği türle aynı olmamasına dikkat edilecektir.

Örnek: Birinci Grup: mouse-anti-5mC (primer antikor)/Alexa488 konjuge donkey-anti-mouse (sekonder antikor)  
İkinci Grup: goat-anti-NeuN (primer antikor)/Alexa550 konjuge donkey-anti-goat (sekonder antikor)  
Bloklamada kullanılan normal serumun elde edildiği tür: Normal Goat Serum (**Yanlış**), Normal Donkey Serum (**Doğru**)

### Hedef Hücre Fenotipleri İçin Kullanılacak İşaretleyiciler:

Çoğalan Hücre: Ki67  
Nöral Kök Hücre ve Nöral Progenitor Hücre: Sox2, Pax6, Dlx2  
İmmatür Nöron: Doublecortin (DCX)  
Olgun Nöron: Neuronal Nuclei (NeuN)  
İnternöron: Glutamate Decarboxylase 65/67 (Gad65/67), Tyrosine Hydroxylase (TH)  
Aktif Nöron: c-fos  
DNA metilasyon: 5mC, DNMT1, DNMT3a  
DNA demetilasyon: 5mC, Tet1, Tet2

### Hedef Hücre Sayımı İçin Kullanılacak İşaretleyiciler ve Sayım Yapılacak Anatomik Bölgeler:



SVT: Ki67, Sox2, Pax6, Dlx2, DCX, DNMT1, DNMT3a, Tet1/2, 5mC, 5hmC  
RGY: DCX, 5mC, 5hmC, DNMT1, DNMT3a, Tet1/2  
BO: NeuN, c-Fos, 5mC, 5hmC, DNMT1, DNMT3a, Tet1/2

#### DNA Metilasyon ve ile Fenotipik Hücre İşaretleyicilerin Kolokalizasyonu:

Çalışmamızda olfaktör nörogenез yolundaki dönüşüm halinde farklı kimliklerdeki hücrelerin DNA metilasyon işaretleyicileri ile kolokalizasyonları konfokal mikroskop altında kalitatif olarak incelenecektir.

Hedef Bölge	Temel DNA metilasyon markır	Kolokalizasyonu Belirlenecek Fenotipik İşaretleyiciler
SVT	5mC	Ki67, Sox2, Pax6, Dlx2
	5hmC	Ki67, Sox2, Pax6, Dlx2
RGY	5mC	DCX
	5hmC	DCX
BO	5mC	NeuN, c-fos, Gad65/67, TH
	5hmC	NeuN, c-fos, Gad65/67, TH

Yukarıda belirlenen kolokalizasyon işaretleme kombinasyonları çalışmamızda çeşitli hücre fenotiplerinin DNA metilasyon karakterlerini belirlemek için, diğer immünohistokimyasal işlemler de göz önünde bulundurulduğunda; elde edilecek kesitlerin ve ticari kimyasal sarf malzemelerinin en ekonomik şekilde kullanılabilmesi bakımından en ekonomik sayıdır. Şüphesiz ki çalışma önerisinde adı geçen diğer DNA metilasyon ve fenotipik işaretleyicilerin kolokalizasyonları önemsiz değildir. Fakat bir önceki cümlede açıkladığımız nedenden ötürü yalnız yukarı tablodaki kombinasyonların denenmesi planlanmıştır.

#### Transmisyon Elektron Mikroskopuyla Sinaptik Ölçümler:

Çıkarılan beyinlerden glomerüler ve periglomerüler bölgeleri içeren bulbus olfaktorius parçaları dikkatlice alınacak ve 4% agar içine gömüldükten sonra vibratomda 100 µm'lik dilimlere kesilecektir. Örnekler daha sonra osmium tetraoksit içinde postfikse edilecek ve rutin takip işlemi ardından EPON resin içinde, iki asetat filmi arasında yassi gömme kalıplarına (flat-embed?) gömülecektir. Bloklar 60 °C etüvde 2 gün polimerize edilecektir. Yassi-bloklar daha sonra beem kapsül içinde tekrar polimerize edilecektir. Daha sonra, bloklar 1mmx2mm trapezoid sekillendirilecek ve bloklardan 70 nm'lik ultra ince kesitler Leica Ultramicrotome ile alınıp 200 mesh nikel gridlere toplanacaktır. Seri kesit için, bloklar 500 µm X 200 µm trapezoid şeklinde, bir trimming elmas bıçağı kullanarak sekillendirilecek, ve seri kesitler halinde single slot formvar kaplı bakır gridlere alınacaktır. Alınan seri kesitler kontrastlandıktan sonra Transmisyon Elektron Mikroskopuyla görüntülenecek (JEOL JEM1010 ve 16Mpixel CCD kamera) ve elde edilen görüntüler 3D rekonstrüksiyon yapabilen bir yazılımla birleştirilerek 3 boyutlu morfolojik analiz yapılacaktır. Ayrıca kesitler üzerinde stereolojik yöntem ile sinaps sıklığındaki değişimler de kantitatif olarak ölçülerek karşılaştırılacaktır.

Tüm bu işlemler, elektron tomografik yöntemler konusunda deneyimli bir ekibin desteğiyle tam donanımlı bir elektron mikroskopu laboratuvarı olan, Virginia Üniversitesi, Psikoloji Departmanı Nöral Gelişim ve Plastisite Laboratuvarında gerçekleştirilecektir.

#### Taze BO ve SVT Dokusu İzolasyon Protokolü:

1. Fareler derin anestezi altındayken dekapite edileceklerdir.
2. Büyük cerrahi makas kullanılarak baş kısmı kraniyoservikal bileşkeden kesilecektir. İnce uçlu cerrahi makas kullanılarak rostro-kaudal hattın ortasından bir kesi yapılarak deri kafatasından ayrılacaktır.
3. Yine ince uçlu cerrahi makas yardımıyla kafa tabanına yakın bir noktadan longitudinal bir insizyon yapılarak sutura sagittalis süperior boyunca kesi ilerletilecektir. Kafatası orta hattı boyunca elde edilen bu kesi uygun uçlu forseps kullanılarak her iki hemisfer tarafında da kaldırılarak beyin ortaya çıkarılacaktır.
4. Daha sonra optik sinirler kesilerek ve uygun spatula yardımıyla beyin nazikçe kafa tabanından ayrılacaktır.
5. İlk iş olarak her iki bulbus olfaktorius çıkarılarak flow sitometrik işlemlerden geçirilmek üzere +4°C sıcaklıktaki %0,6'lık glukoz PBS solüsyonu içerisine alınacaktır.
5. Bulbus olfaktorius'lar çıkarıldıktan sonra beyin, ticari olarak elde edilecek *fare beyini dilim kalıbına* yerleştirilecek ve fare beyini hızlıca 400 µm'lik koronal dilimlere bölünecektir.
6. Elde edilen dilimler hızla +4°C sıcaklıktaki %0,6'lık glukoz içeren PBS solüsyonu içeren petri kabına alınacak (petri kabı tüm işlem boyunca buz bloğunun üstünde bulundurulacaktır) ve uygun mikro cerrahi set kullanılarak lateral ventriküllerin etrafını çeviren SVT diseksiyon mikroskobu altında lateral ventriküllerden ayrılacaktır. Genellikle 400 µm'lik altı koronal beyin dilimi SVT'yi içermektedir. Ayrılan SVT dokusu +4°C sıcaklıktaki %0,6'lık glukoz içeren PBS solüsyonu içerisinde flow sitometrik işlemlerden geçirilmek üzere kullanılacaktır (Guo vd., 2012).

#### İzole Edilen Taze Dokuların Hücrelere Ayrıştırılması:



İzole edilmiş olan %0,6'lık glukoz içeren PBS solüsyonu içerisindeki hedef dokular, hücre formuna ayrıştırma işlemi için ticari olarak elde edilecek papain doku ayırma solüsyonu içerisinde 37°C sıcaklıkta inkübe edilecektir. Papain ile muamele edilen ayrılmış doku solüsyonu 200 ul'lık mikropipet ucu kullanılarak tekli hücre süspansiyonlarına ayrılacaktır. Ayrıştırma işlemi hücrelerin antikor bağlama özelliklerini maksimum düzeyde koruyabilmek için optimum süre olan dokunun izole edilmesinden sonraki 10 dakikada içerisinde gerçekleştirilecektir (Daynac vd., 2013).

#### Hedef Hücre Popülasyonlarının FS Analizi Öncesi İşaretlenmesi:

Çalışmamızda erişkin olfaktör nörogenez dönüşümünün farklı basamaklarındaki hücre popülasyonlarına ait DNA metilasyon karakterlerini analiz edebilmek için, farklı kimliklerdeki hücre gruplarının izole edilmesi gerekmektedir. Buna göre iki hedef doku olan OB ve SVT'dan olfaktör nörogenezinin farklı evrelerinde olan hücre popülasyonlarını izole etmek için literatürde daha önce söz konusu hücre gruplarını FS kullanarak ayıran araştırmacıların protokolleri çalışmamıza adapte edilecektir. Bu amaçla elde edeceğimiz süspansiyon halindeki hücreler, FS işlemine sokulmadan önce hedef hücre popülasyonları ile karakterize antikorlar kullanılarak immünohistokimyasal olarak işaretlenecektir (Daynac vd., 2013).

#### Subventriküler Tabaka'daki Ayrıştırılması Hedeflenen Hücre Popülasyonları:

1. Çoğalma aktivitesi durmuş matür nöroblastlar
2. Çoğalma aktivitesi gösteren immatür nöroblastlar
3. Yoğun çoğalma ve farklılaşma aktivitesi gösteren nöral kök hücreler ile nöroblastlar arasında ara geçiş formu sayılan nöral progenitor hücreler
4. İstirahat halindeki yavaş bölünme kapasitesine sahip ve farklılaşma indeksi düşük nöral kök hücreler

Yukarıdaki 4 popülasyonu ayırt edebilmek için FS öncesinde işaretleyici olarak aşağıdaki 3 primer antikor kullanılacaktır.

Anti-LeX: İstirahat halindeki nöral kök/progenitor hücreleri işaretlemek için  
Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR): Aktif olarak çoğalan hücreleri göstermek için  
Anti-Cluster of Differentiation 24 (CD24): Nöroblast hücrelerini işaretlemek için

Hedef Popülasyon Numarası	Ayırt Etme Stratejisi
1	CD24+ LeX- EGFR-
2	CD24+ LeX- EGFR+
3	CD24- LeX- EGFR+
4	CD24- LeX+ EGFR-

Dokular, öncelikle süspansiyon halindeki hücrelerdeki DNA miktar analizini yapmak için %2'lik BR7 takviyesi içeren Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM/F12) tamponunda 5 µg/mL oranında Hoechst 33342 (canlı DNA boyası) ile 90 dakika 37 °C'de inkübe edileceklerdir. Daha sonra hücreler %0.15'lik bovine serum albumin (BSA) içeren PBS içerisinde yıkanacaktır. Subventriküler tabaka hücreleri için %0.15'lik BSA içeren PBS içerisinde aşağıdaki antikorlar uygun dilusyonlarda hazırlanacaktır.

- Phycoerythrin (PE)- konjuge rat-anti CD24, fluorescein isothiocyanate (FITC) konjuge mouse-anti- LeX ve Alexa647 konjuge EGFR.

Üç farklı antikorlu içeren bu solüsyon içerisinde hücreler +4°C'de 25 dakika inkübe edilecektir. Daha sonra hücreler FS analizi öncesinde PBS ile yıkanacaktır. Yıkanan hücrelerin bulunduğu solüsyona FS analizinden hemen öncesinde, ölü hücreleri ayırt edebilmek için tekrar 2 µg/mL konsantrasyonunda Hoechst 33258 boyası eklenecektir. Daha sonra hücreler BD FACSAria III cihazında FS analizine sokulacak ve hedef hücre popülasyonları yukarıda verilen işaretleme stratejisine uygun olarak ayrılacaktır. Hoechst 33258 boyası ile ayırt edilen ölü hücreler daha sonraki analizler için kullanılmayacaktır (Daynac vd., 2013).

#### Bulbus Olfaktorius'taki Ayrıştırılması Hedeflenen Hücre Popülasyonları

1. Elektro fizyolojik (EF) olarak aktif olgun nöronlar
2. Henüz EF olarak aktif olmayan olgun nöronlar

Yukarıdaki 2 popülasyonu ayırt edebilmek için FS öncesinde işaretleyici olarak aşağıdaki 2 primer antikor kullanılacaktır.

Anti-c-Fos: EF olarak aktif nöronlar  
Anti-Neuronal Nuclei (NeuN): Henüz EF olarak aktif olmayan olgun nöronlar

Hedef Popülasyon Numarası	Ayırt Etme Stratejisi
1	NeuN+ c-Fos+
2	NeuN+ c-Fos-



Flow sitometrik analiz öncesinde SVT hücrelerinin ayırımı için gerçekleştirilecek işaretleme basamaklarına uygun şekilde floresan konjuge mouse-anti-NeuN ve rabbit-anti-c-Fos antikorları kullanılarak işaretlenecektir.

### Gen Ekspresyonu Analizleri:

1. Hücrelerden total RNA izolasyonu
2. Elde edilen RNA dan cDNA sentezi
3. Sentezlenen cDNA'ların  $\beta$ -aktin primerleri kullanılarak PCR için uygunluklarının belirlenmesi
4. cDNA lardan çalışmaya konu olan genlerin ekspresyon düzeylerinin real-time kantitatif PCR ile gösterilmesi (RT-qPCR)

#### 1.Total RNA izolasyonu:

Flow sitometri ile izole edilen SVT ve BO hücrelerinden total RNA izolasyonu, hücre sayısının, klasik guanidyum-fenol-kloroform (AGPC) yöntemi için uygun olmaması nedeniyle ticari olarak çok daha az sayıdaki hücrelerden RNA elde edilmesini sağlayan kitlerle gerçekleştirilecektir. Fenol/kloroform ekstraksiyonu ve CsCl gradiyentine ihtiyaç olmayan bu kitler ile çok az sayıdaki hücrelerden RNA eldesi mümkün olabilmektedir. Yöntem basamakları aşağıdaki gibidir:

1. Hücre süspansiyonu 10 dk 4500 rpm'de santrifüjlenir,
2. Hücreler spin kolon içine alınır ve ekstraksiyon tamponu eklendikten sonra 42°C'de 30 dakika inkübe edilerek total RNA'nın spin kolona ekstrakte olması sağlanır
3. 1000 rpm'de +4°C'de 2 dakika santrifüjlenerek RNA tüp içine çöktürülür,
4. Elde edilen süpernatant RNase-free tüplere alınır,
5. Hemen cDNA eldesi yapılmıyacaksa -80°C'de uzun dönem muhafaza edilebilir.

#### 2.cDNA Sentezi:

cDNA sentezi öncesinde tüm RNA örneklerinin miktar tayinleri yapılarak saflık oranları belirlenecektir. Miktar ve saflık oranları cDNA eldesine uygun olan RNA'lardan cDNA sentezi aşağıdaki protokole göre gerçekleştirilecektir:

- cDNA sentezinde kullanılacak RNA miktarlarının tüm örnekler için eşit olmasına dikkat edilerek, Kalıp RNA,
- Random Hekzamer(0.2 $\mu$ g/ $\mu$ l) cDNA sentez primeri,
- Ribonükleaz inhibitörü(20 U/ $\mu$ l),
- dNTP karışımı (10mM),
- M-MuLV reverse transkriptaz (200 U/ $\mu$ l),
- dH<sub>2</sub>O (reaksiyon son volümünü 20  $\mu$ l'ye tamamlayacak şekilde) 'dan oluşan cDNA sentez karışımı
  - o hazırlanır, cDNA sentezi için uygulanacak PCR termal profili olan 25°C'de 10 dakika, 42°C'de 60 dakika ve 70°C'de 10 dakika termal cykler cihazında uygulanarak cDNA eldesi gerçekleştirilir.

#### 3.cDNA'ların uygunluklarının $\beta$ -aktin RT-PCR ile belirlenmesi:

Sentezlenen cDNA'ların real time PCR için uygunlukları evrimsel olarak iyi korunmuş ve tüm hücrelerde eksprese olduğu bilinen  $\beta$ -aktin'in RT-PCR ile ekspresyonunun gösterilmesi ile internal kontrol olarak test edilecektir. Uygulanacak yöntem aşağıda özetlenmiştir:

1.  $\beta$ -aktin RT-PCR için kullanılacak primer dizileri  
F: 5'-ATCATGTTTGAAACCTTCAA-3'  
R: 5'-CATCTCCTGCTCGAAAGTCCA-3' dir.
2. Reaksiyon karışımı(total volüm 25 $\mu$ l);
  - dH<sub>2</sub>O((DNase free)
  - 10Xreaksiyon Tamponu(MgCl<sub>2</sub>süz)
  - MgCl<sub>2</sub> (2.5mM)
  - dNTP karışımı (10mM),
  - Primer F(25pmol)
  - Primer R(25pmol)
  - Taq DNA polimeraz(1U)
  - cDNA kalıp (2  $\mu$ l) olacak şekilde hazırlanır.
3. İlk denaturasyon 93°C/5 dk, denaturasyon 93°C/40 sn, bağlanma 56°C/40 sn, uzama 72°C/40 sn ve son uzama 72°C/5 dk olacak şekilde PCR uygulanır. Döngü sayısı 30, ürün büyüklüğü 320 bp'dir.
4. PCR sonrası elde edilen ürün agaroz jelde yürütülerek 320 bp'lik  $\beta$ -aktin bandı kontrol edilir.

#### 4.Real-time kantitatif PCR ile gen ekspresyonlarının belirlenmesi:

Sentez edilen cDNA'lardan çalışmaya konu olan genlerin, ekspresyon düzeylerinin rölatif kantitasyonu her bir gen için ayrı ayrı belirlenen özgül primer ve prob dizileri kullanılarak Real Time PCR (ABI 7500, Applied Biosystem) ile gerçekleştirilecektir. Ekspresyon düzeylerinin kantitasyonunda ise "Comparative CT ( $\Delta\Delta C_T$ )" analizi ile yapılacaktır.

Yöntem; hedef gen ve endojen kontrol ile pozitif RNA örneğine(TaqMan Human Control Total RNA-4307281 den sentezlenen cDNA) göre ekspresyon düzeylerindeki farklılıkları belirleme şeklinde çalışmaktadır. Reaksiyon sonrası elde edilen  $\Delta\Delta C_T$  değerleri kullanılarak  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  hesaplanacak ve endojen kontrol ile referans RNA ya karşı araştırılan genin ekspresyon düzeyleri belirlenecektir.

Literatürde araştırılan genlere özgü birçok real time PCR primer ve prob dizisi mevcut olmakla birlikte ilgilenilen genlere özgü primer ve prob dizileri tarafımızdan dizayn edilerek literatüre kazandırılacaktır.



Real time PCR karışımı (toplam volüm 25 µl) aşağıda verilmiştir:

- 12.5 µl 2xTaqMan Gene Ekspresyon Master Miks (Applied Biosystem)
- Son konsantrasyonu 900 nmol olacak şekilde primer
- Son konsantrasyonu 200 nmol olacak şekilde prob
- 2.5 µl cDNA

Gen ekspresyon analizi yapılmak istenilen genlere uygun primer ve prob dizileri mevcut literatürden adapte edilerek sentez ettirilecektir. Söz konusu hedef genler aşağıdaki gibidir.

- DNMT1, DNMT3a, Tet1, Tet2, Tet3, DCX, Pax6, Dlx2, Gad65, Gad67, TH, Prolactine Receptor Gene

Uygulanacak PCR termal profili ise her bir gen için ayrı ayrı belirlenecek ve uygulanacaktır.

Her bir örnek için Real Time PCR çalışması 3 kez tekrarlanarak elde edilen veriler birlikte değerlendirilecektir.

PCR analizleri temel olarak Yrd. Doç. Dr. Ertan AY tarafından yapılacak olmakla birlikte, çalışılacak materyalin konvansiyonel miktarlardan az olması ve çok sayıda gen ekspresyonunun analizinin yapılması nedeniyle Prof. Dr. M. Emin ERDAL çalışmamızda danışman olarak yer alacaktır.

#### **Global DNA 5mC ve 5hmC Miktarlarının Hesaplanması İçin Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) Analizi:**

Elde edilen hedef hücre popülasyonlarındaki global 5mC ve 5hmC miktarları ticari olarak elde edilecek metile DNA (5mC) ve hidrosimetile DNA (5hmC) kantifikasyon kitleri kullanılarak ELISA yöntemiyle hesaplanacaktır. Bu analiz, ticari kitin elde edildiği şirketin protokolüne uygun şekilde gerçekleştirilecektir. Öncelikle, elde edilen hücre popülasyonlarından total DNA izolasyonu yapılacaktır. Daha sonra 50 ng'lık tek iplikçikli DNA (single strand DNA) sodyum hidroksit (NaOH) ile muamele ettirilecek ve 96 kuyucuklu mikropate kullanılarak metile ve hidrosimetile DNA parçaları ticari kit içerisindeki uygun antikorlar kullanılarak tespit edilecek ve mikropate spektrofotometresinde (Thermo Scientific, MULTISKAN GO) 450 nm dalga boyundaki absorbansta kolorimetrik olarak okutularak kantite edilecektir (Kathleen vd, 2012; Svetlana vd., 2012).

#### **İstatistiksel Analiz:**

Veriler, ortalama  $\pm$  standart hata olarak ifade edilecektir. İstatistiksel değerlendirme için ANOVA, uygun bir post hoc testi ve gerekirse *t* testi kullanılacaktır.  $P < 0,05$  olan veriler anlamlı kabul edilecektir. Tüm istatistiksel analizler Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı'na danışılarak gerçekleştirilecektir.

## **6. PROJE YÖNETİMİ, EKİP VE ARAŞTIRMA OLANAKLARI**

### **6.1 PROJE YÖNETİMİ**

#### **6.1.1. YÖNETİM DÜZENİ (İş Paketleri (İP), Görev Dağılımı ve Süreleri)**

Projede yer alacak başlıca iş paketleri, her bir iş paketinin kim/kimler tarafından ne kadarlık bir zaman diliminde gerçekleştirileceği hakkındaki bilgiler aşağıda yer alan **İş-Zaman Çizelgesi** doldurularak verilmelidir. Her bir iş paketinde görev alacak personelin niteliği (yürütücü, araştırmacı, danışman, bursiyer, yardımcı personel) belirtilmelidir. Gelişme ve sonuç raporu hazırlama aşamaları proje çalışmalarına paralel olarak yürütülmeli ve ayrı bir iş paketi olarak gösterilmemelidir.

<b>Proje Ekibi</b>	<b>Projedeki Sorumluluğu</b>
Prof. Dr. Ş. Necat YILMAZ (Yürütücü)	<b>Yürütücü</b> İP1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9
Yrd. Doç. Dr. Nail Can Öztürk	<b>Araştırmacı</b> İP1, 2, 3, 4, 6, 7, 8, 9
Yrd. Doç. Dr. Ertan AY	<b>Araştırmacı</b> İP 5, 9
Prof. Dr. M. Emin ERDAL	<b>Danışman</b> (PCR analizleri temel olarak Yrd. Doç. Dr. Ertan AY tarafından yapılacak olmakla birlikte, çalışılacak materyalin konvansiyonel miktarlardan az olması ve çok sayıda gen ekspresyonunun analizinin yapılması nedeniyle Prof. Dr. M. Emin ERDAL çalışmamızda danışman olarak yer alacaktır.) İP 5, 9
Yüksek Lisans Öğrencisi (Bursiyer 1)	Tüm iş paketleri
Doktora öğrencisi (Bursiyer 2)	Tüm iş paketleri
Doktora öğrencisi (Bursiyer 3)	Tüm iş paketleri

İP No	İP Adı/Tanımı	Kim(ler) Tarafından Yapılacağı																																							
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36			
1	Cihaz ve sarf malzemelerinin satın alınarak temin edilmesi	Yürütücü Dr. Necat YILMAZ ve araştırmacı Dr. Nail Can Öztürk tarafından	■	■	■																																				
2	Hayvan çiftleştirme işlemleri ve grupların oluşturulması	Yürütücü Dr. Necat YILMAZ ve araştırmacı Dr. Nail Can Öztürk ve onların gözetiminde bursiyer 1, 2 ve 3 tarafından				■	■	■	■																																
3	Elde edilen örneklerden akım sitometri-cell sorting yöntemi ile hücre alt popülasyonlarının analizi ve saflaştırılması	Yürütücü Dr. Necat YILMAZ ve araştırmacı Dr. Nail Can Öztürk ve onların gözetiminde bursiyer 1 ve 2 tarafından							■	■																															
4	Hayvanların kesilmesi ve RT-PCR, immün işaretleme, elektron tomografi çalışmaları için örneklerin hazırlanması	Yürütücü Dr. Necat YILMAZ ve araştırmacı Dr. Nail Can Öztürk ve onların gözetiminde bursiyer 1 ve 2 tarafından							■	■																															
5	Saflaştırılarak ayrılan hücre popülasyonlarında qRT-PCR analizi	Danışman Prof. Dr. M. Emin ERDAL, Araştırmacı Dr. Ertan AY ve yüksek lisans öğrencisi tarafından									■	■	■	■																											
6	Elde edilen örneklerden kesitler alınarak immün işaretlemelerin yapılması ve görüntülenmesi	Yürütücü Dr. Necat YILMAZ ve araştırmacı Dr. Nail Can Öztürk ve onların gözetiminde bursiyer 1,2 ve 3 tarafından													■	■	■	■	■	■	■																				
7	ELISA ile dokulardan analizlerin yapılması	Yürütücü Dr. Necat YILMAZ ve araştırmacı Dr. Nail Can Öztürk ve onların gözetiminde bursiyer 1 ve 2 tarafından																					■	■	■																
8	Elektron tomografi yöntemi ile sinaptik plastisite analizinin yapılması	Yürütücü Dr. Necat YILMAZ ve araştırmacı Dr. Nail Can Öztürk tarafından																								■	■	■	■												
9	Sonuçların değerlendirilmesi, istatistiksel analizi ve yazımı	Tüm ekip tarafından																																							

İŞ-ZAMAN ÇİZELGESİ (\*)



## 6.1.2. BAŞARI ÖLÇÜTLERİ VE RİSK YÖNETİMİ

Projenin tam anlamıyla başarıya ulaşmış sayılabilmesi için **İş-Zaman Çizelgesinde** yer alan her bir ana iş paketinin hedefi, başarı ölçütü (ne ölçüde gerçekleşmesi gerektiği) ve projenin başarısındaki önem derecesi aşağıdaki **Başarı Ölçütleri Tablosu**'nda belirtilmelidir.

**BAŞARI ÖLÇÜTLERİ TABLOSU (\*)**

İP No	İş Paketi Hedefi	Başarı Ölçütü (% , sayı, ifade, vb.)	Projenin Başarısındaki Önemi (%)**
1	Cihaz ve sarf malzemelerinin satın alınarak temin edilmesi	100	10
2	Hayvan çiftleştirme işlemleri ve grupların oluşturulması deneylerin gerçekleştirilebilmesi için temel öneme sahiptir	100	20
3	Elde edilen örneklerden akım sitometri-cell sorting yöntemi ile hücre alt popülasyonlarının analizi ve saflaştırılması	80	10
4	Hayvanların kesilmesi ve RT-PCR, immün işaretleme, elektron tomografi çalışmaları için örneklerin hazırlanması	100	10
5	Saflaştırılarak ayrılan hücre popülasyonlarında qRT-PCR analizi	80	10
6	Elde edilen örneklerden kesitler alınarak immün işaretleme yapılması ve görüntülenmesi	80	10
7	ELISA ile dokulardan analizlerin yapılması metilasyon demetilasyonun değerlendirilmesi için gereklidir	80	10
8	Elektron tomografi yöntemi ile sinaptik plastisite analizinin yapılması	80	10
9	Sonuçların değerlendirilmesi, istatistiksel analizi ve yazımı	90	10

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

(\*\*) Sütun toplamı 100 olmalıdır.

Projenin başarısını olumsuz yönde etkileyebilecek riskler ve bu risklerle karşılaşıldığında projenin başarıyla yürütülmesini sağlamak için alınacak tedbirler (**B Planı**) ilgili iş paketleri belirtilerek ana hatlarıyla aşağıdaki **Risk Yönetimi Tablosu**'nda ifade edilmelidir.

**RİSK YÖNETİMİ TABLOSU (\*)**

İP No	En Önemli Risk(ler)	B Planı
3	Solid beyin dokusundan alt hücre popülasyonlarının hücre süspansiyonları olarak izole edilmesi	Enzimatik yöntemlerle izolasyonu ayrıştırılması tasarlanan solid dokus.
4	qRT-PCR analizi için yeterli miktarda mRNA izolasyonu yapılamaması	Satın alınması düşünülen RNA izolasyon kiti ile 15-20 tane hücreden bile RNA izolasyonu yapılarak analiz yapılabildiği için protokolda gerekli modifikasyonlar yapılarak izolasyon ve analiz optimize edilecektir.
5	Örneklerde immün işaretleme yetersiz olması	Ekibimiz immün işaretleme konusunda oldukça deneyimlidir. Antikor dilüsyonları, süre ve sıcaklıklar gibi parametreler modifiye edilerek işaretleme optimize edilecektir.
7	Elektron tomografik görüntülemenin başarısız olması	Bu konuda yardım alınacak olan Virginia Üniversitesi sinirbilim laboratuvarı yıllardır bu yöntemi başarıyla uygulamış, çok sayıda yayın çıkarmış deneyimli ve yetkin bir merkezdir. Yaptığımız görüşmeler sonucunda çalışmamıza her tür desteğe hazır olduklarını bildirmişlerdir. Planımız, hazırladığımız örnekleri alıp Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bu merkeze götürmek ve hem analizleri yaptırıp hem de yöntemin yapılışını öğrenerek ülkemizde de uygulanır hale getirmektir.

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.



## 6.2. PROJE EKİBİ

### 6.2.1. PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN DİĞER PROJELERİ VE GÜNCEL YAYINLARI

Proje yürütücüsünün TÜBİTAK, üniversite ya da diğer kurum/kuruluşların desteği ile tamamlamış olduğu projeler ile şu sırada yürütmekte olduğu veya destek almak için başvurduğu projeler hakkında aşağıdaki tablolarda yer alan bilgiler verilmelidir. Proje değerlendirme süreci sırasında destek kararı çıkması ve/veya yeni bir başvuru daha yapılması durumunda derhal TÜBİTAK'a yazılı olarak bildirilmelidir.

#### PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN TÜBİTAK DESTEKLİ PROJELERİ (\*)

Proje No	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Destek Miktarı (TL)
2012-371	Araştırmacı	Bazı östrojenik kimyasalların Mersin körfezi'ndeki düzeylerinin ve endokrin sistem üzerine etkilerinin biyoindikatör parametreler yardımıyla belirlenmesi		

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

#### PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN DİĞER PROJELERİ (DPT, BAP, FP6-7 vb.) (\*)

Proje No	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Destek Miktarı (TL)
BAP	Araştırmacı	İmipramine'in Prostat Kanseri Potasyum Kanal Kinetikleri Üzerine Etkilerinin Araştırılması	2011-	20000 TL
BAP	Araştırmacı	Neonikotinoid İnsektisitlerden İmidacloprid'in Sıçan Beyin Dilimlerinde İyon Kanalları Üzerine Etkileri	2011-	19985 TL
BAP	Araştırmacı	Deneysel Hiperoksi Aracılı Akciğer Hasarı Oluşturulan Sıçanlarda Hava Yoluyla Verilen Mezenkimal Kök Hücre Tedavisinin Sonuçları	2011-	23500 TL
BAP	Araştırmacı	İn situ kırık doku mühendisliği	2010-2011	19999 TL
BAP	Araştırmacı	Matriks Destekli Otolog Kondrosit İmplantasyonunda Kollajen Membran Yüzey Düzensizliğinin İyileşmeye Etkisi	2010-2011	23946 TL
BAP	Araştırmacı	Yüksek Şiddette Monopolar ve Bipolar Sinir Stimulasyonunda Fasiyal Sinir Fonksiyonu Üzerinde Steroidlerin Muhtemel Etkileri	2010-2011	24303 TL
BAP	Araştırmacı	Farede Prenatal Etanol Uygulaması ile Beraber Bioaktif Noroprotektif Peptid D-SAL'in Serebral Korteks Gelişimi Üzerine Etkisinin Araştırılması	2009-2010	14288 TL
BAP	Araştırmacı	Deneysel Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Astrosit Kök Hücre Naklinin Bilişsel ve Motor Yetiler Üzerine Etkilerinin Araştırılması	2009-2010	12990 TL
BAP	Araştırmacı	Rat groin flebinde eritropoetin ve iskemik ön koşullandırmanın iskemi reperfüzyon hasarına etkileri	2009-2010	10793 TL
BAP	Araştırmacı	Tekrarlayan İmplantasyon Başarısızlığı (TİB) olan olgularda, ejakulat, epididimal ve testiküler sperm ile İntrasitoplazmik sperm injeksiyonu (ICSI) uygulamasının gebelik sonuçlarına etkisi.	2009	171500 TL
BAP	Araştırmacı	Selektif Rho-kinaz İnhibitörü Y-27632'nin Periferik İskemi/Reperfüzyona Bağlı Hedef Organ İskelet Kası ve Uzak Organ Böbrek Hasarı Üzerine Etkisi	2008-2009	71186 TL





BAP	Araştırmacı	Deneysel Hipoksik İskemik Beyin Hasarı Oluşturulmuş Sıçanlarda Astrosit Kök Hücre Naklinin Bilişsel ve Motor Yetiler Üzerine Etkilerinin Araştırılması	2008-2009	
BAP	Araştırmacı	Periferik iskemi reperfüzyon hasarına bağlı uzak ve hedef organ hücre apoptozisi üzerine iloprost'un etkisi	2007-2009	2242 TL
BAP	Araştırmacı	Yapısal Distal Femur Osteokondral Otogreft Üretimi Ve Uygulaması:Hücre Kültürü,Doku Mühendisliği Ve Cerrahi Uygulama Deneysel Çalışması	2007-2009	17543 TL
BAP	Araştırmacı	Normal ve kompaksiyon kusuru gösteren insan embriyolarındaki bağlantı komplekslerinin karşılaştırmalı olarak incelenmesi ve gebelik oranlarına etkisi	2007-2010	7560 TL
BAP	Yürütücü	GEBELİKTE ORTAYA ÇIKAN SİNAPTİK DEĞİŞİKLİKLERİN İNHİBİTÖR NÖROTRANSMİTTER GABA VE GEBELİK HORMONLARIYLA OLASI İLİŞKİSİ	2010-2013	150360 TL
BAP	Yürütücü	Diyabetik farelerin ovarian follikül morfolojisinde ve ZP proteinleri dağılımında görülen değişikliklerin immünohistokimyasal ve ince yapı düzeyinde incelenmesi	2009-2010	6000 TL
BAP	Yürütücü	Diyabetin, implantasyon penceresi dönemindeki sıçan endometriyumunda alfaV $\beta$ 3 integrin ekspresyonuna ve ince yapıya etkisi	2009-2010	71199 TL

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

#### PROJE YÜRÜTÜCÜSÜNÜN SON 5 YILDA YAPTIĞI YAYINLAR (\*)

Yazar(lar)	Makale Başlığı	Dergi	Cilt/Sayı/Sayfa	Tarih
Dinc Erdem, Yıldırım Ozlem, Necat Yılmaz S., Canacankatan Necmiye, Ayaz Lokman, Ozcan Tuba, Temel Gulhan O	Intravitreal bevacizumab effects on VEGF levels in distant organs: an experimental study	Cutaneous and Ocular Toxicology	1-8 (Epub ahead of print)	2013
Aydın Bahri, Dinç Erdem, Yılmaz Ş. Necat, Altıparmak U. Emrah, Yülek Fatma, Ertekin Sevdâ, Yılmaz Mustafa, Yakın Mehmet	Retinal endoilluminator toxicity of xenon and light-emitting diode (LED) light source: rabbit model	Cutaneous and Ocular Toxicology	1-5	2013
Yalın S, Çömelekoğlu Ü, Bağış S, Yılmaz N	Effects of Strontium Ranelate on Cortical Bone Collagen Integrity	SAUDI MEDICAL JOURNAL	33(5), 515-519	2012
Düdükcü Meltem, Beytaroğlu Anya, Yılmaz Nejat, Köleli Fatih	Characterization of stainless steel electrode modified by a thin film of polyaniline containing pt particles and its electrocatalytic activity for methanol oxidation	Russian Journal of Electrochemistry	47(8), 959-964	2011
Yılmaz Banu Coskun, Yılmaz Cengiz, Yılmaz Necat S., Ballı Ebru, Tasdelen Bahar	Optimal Transport Time and Conditions for Cartilage Tissue Samples and Expanded Chondrocyte Suspensions	Orthopedics	33(1), 25-29	2010

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

#### 6.2.2. PROJE EKİBİNİN ÖNERİLEN PROJE KONUSU İLE İLGİLİ PROJELERİ

Proje ekibinin (proje yürütücüsü, araştırmacı, danışman) TÜBİTAK'a, herhangi bir kamu kurum ve kuruluşuna veya Türkiye'nin taraf olduğu uluslararası anlaşmalara dayalı olarak sağlanan fonlara sunulmuş olup öneri durumunda olan, yürüyen veya



sonuçlanmış benzer konudaki projeleri varsa bu projeler hakkındaki bilgiler ve önerilen projeden ne gibi farkları olduğu aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

### PROJE EKİBİNİN ÖNERİLEN PROJE KONUSU İLE İLGİLİ PROJELERİ (\*)

Adı ve Soyadı	Projedeki Görevi	Proje Adı	Başlama-Bitiş Tarihi	Önerilen Projeden Farkı
Nail Can Öztürk	Araştırmacı	"Fetal Alkol Spektrum Bozukluklarının C57 BL6/J Soy Farelerde Epigenetik Olarak Değerlendirilmesi" BAP-SBE A (NCÖ) 2011-5 DR numaralı doktora tez projesi	2011-2013	Bu çalışmada fetal alkol maruziyetinin beyin gelişimi üzerindeki olumsuz etkileri epigenetiksel olarak incelenmiştir. Temel farklar; fetal beyin gelişimi, farklı beyin bölgeleri ve limitli sayıda epigenetik faktörün incelenmiş olması.
Ertan AY	Araştırmacı			
M. Emin ERDAL	Danışman			

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

### 6.3. ARAŞTIRMA OLANAKLARI

Bu bölümde projenin yürütüleceği kurum/kuruluş(lar)da var olup da projede kullanılacak olan altyapı/ekipman (laboratuvar, araç, makine-teçhizat vb.) olanaklar aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

### MEVCUT ARAŞTIRMA OLANAKLARI TABLOSU (\*)

Mevcut Altyapı/Ekipman Türü, Modeli (Laboratuvar, Araç, Makine-Teçhizat vb.)	Mevcut Olduğu Kurum/Kuruluş	Projede Kullanım Amacı
Zeiss LSM 700 Lazer Taramalı Konfokal Mikroskop	Mersin Üniversitesi İleri Teknoloji Eğitim, Araştırma ve Uygulama Merkezi (MEİTAM)	İmmüno Floresan işaretleme yapılmış kesitleri görüntülemek ve fotoğraflamak için
Inverted Floresan Mikroskop (Nikon Eclipse Ti)	MEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.	İmmüno Floresan işaretleme yapılmış kesitlerin konfokal mikroskop öncesi ön değerlendirmesinin yapılması için
BD Facsaria III Cell Sorter	MEİTAM	Beyin dokularından izole edilecek hücrelerde akım sitometrik analizleri yapmak için
Vibratom (Leica VT 1000S)	MEÜ Tıp Fakültesi Biyofizik A.D.	İmmünohistokimyasal işaretlemelerde kullanılacak kesitleri almak için
(-86°C) Derin Dondurucu New Brunswick U 410	MEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.	Biyolojik örneklerin ve çeşitli işlemlerde kullanılacak kimyasalların muhafaza edilmesi için
Real Time PCR (Applied Biosystem, ABI 7500)	MEÜ Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D.	Gen ekspresyonu analizlerinin yapılması için
Spektrofotometre (Thermo Scientific, MULTISKAN GO)	MEİTAM	Global 5mC ve 5hmC analizinde 450 nm dalga boyundaki absorbansta kolorimetrik ölçüm yapmak için
Stereo Mikroskop (Olympus SZ51)	MEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji A.D.	Mikro beyin dokularının izolasyonu ve yüzdürmeli immunohistokimya işaretlemesinden sonra jelatin kesitlerin lamlara yapıştırılması (mounting) için

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

## 7. YAYGIN ETKİ

### 7.1. PROJEDEN BEKLENEN YAYGIN ETKİ

Proje başarıyla gerçekleştirildiği takdirde projeden elde edilmesi öngörülen/beklenen yaygın etkilerin (bilimsel/akademik, ekonomik/ticari/sosyal, araştırmacı yetiştirilmesi ve yeni projeler oluşturulması) neler olabileceği diğer bir ifadeyle projeden ne gibi çıktı, sonuç ve etkilerin elde edileceği kısa ve net cümlelerle aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.



TÜBİTAK

## PROJEDEN BEKLENEN YAYGIN ETKİ TABLOSU

Yaygın Etki Türleri	Projede Öngörülen/Beklenen Çıktı, Sonuç ve Etkiler
<b>Bilimsel/Akademik</b> (Makale, Bildiri, Kitap)	1-Erişkin nöroenezinin altında yatan mekanizmaların tam olarak aydınlatılmamış olması önemli bir temel bilgi eksikliğidir. Bu eksiklik, beyin dinamiklerinin anlaşılmasını, nörodejeneratif hastalıklar, inme gibi patolojik durumların iyileştirilebilmesi için tedavi modellerinin tasarlanmasını engelleyen en önemli nedenlerdendir. Çalışmamızın sonucunda elde etmeyi umduğumuz bilgiler bu işleyişler için önemli temel bilgi üretebilir. 2- Çalışmamızın sonucunda en az 2 adet yayın yapılması da düşünülmektedir. Bu yayınların da literatüre önemli bilgiler kazandıracaklarını ummaktayız. 3-Ülkemizde şu an için uygulaması olmayan elektron tomografi tekniğiyle 3 boyutlu analiz yönteminin ülkemizde de uygulanır hale gelmesi çalışmanın yaygın etkisini artıran bir husus olacaktır.
<b>Ekonomik/Ticari/Sosyal</b> (Ürün, Prototip Ürün, Patent, Faydalı Model, Üretim İzni, Çeşit Tescilli, Spin-off/Start-up Şirket, Görsel/İşitsel Arşiv, Envanter/Veri Tabanı/Belgeleme Üretimi, Telif Konu Olan Eser, medyada Yer Alma, Fuar, Proje Pazarı, Çalıştay, Eğitim vb. Bilimsel Etkinlik, Proje Sonuçlarını Kullanacak Kurum/Kuruluş, vb. diğer yaygın etkiler)	Proje sonuçları hem ulusal, hem de uluslar arası toplantılarda sunulacak ve ileri teknik olanaklara sahip, sinirbilim konusunda isim yapmış diğer araştırma merkezleri arasında ülkemiz de önemli bir yer kazanabilecektir.
<b>Araştırmacı Yetiştirilmesi ve Yeni Proje(ler) Oluşturma</b> (Yüksek Lisans/Doktora Tezi, Ulusal/Uluslararası Yeni Proje)	Projenin konusu oldukça güncel ve yeni araştırma konuları tasarlanmasına çok uygundur. Projenin üreteceği bilgilerin de yeni araştırma konularına esin kaynağı olabileceğine inanmaktayız. Ayrıca, projede çalışacak olan 4 adet bursiyer de (2 yüksek lisans, 2 doktora öğrencisi) hem büyük bir projede yer alma deneyimini yaşayacak ve hem de güncel sinirbilim araştırmaları konusunda bilgi ve deneyim sahibi olacaklardır.

## 7.2. PROJE ÇIKTILARININ PAYLAŞIMI VE YAYILIMI

Proje faaliyetleri boyunca elde edilecek çıktılarının ve ulaşılabilecek sonuçların ilgili paydaşlar ve potansiyel kullanıcılara ulaştırılması ve yayılmasına yönelik yapılacak toplantı, çalıştay, eğitim, web sitesi, vb. ne tür faaliyetler yapılacağı aşağıdaki tabloda belirtilmelidir.

## PROJE ÇIKTILARININ PAYLAŞIMI VE YAYILIMI TABLOSU (\*)

Faaliyet Türü (Toplantı, Çalıştay, Eğitim, Web sayfası vb.)	Paydaş / Potansiyel Kullanıcılar	Faaliyetin Zamanı ve Süresi
<b>Çalıştay</b>	Sinirbilim ve epigenetik konusuyla ilgilenen tüm araştırmacılara özellikle metodoloji konusunda bilgi paylaşımı yapılacaktır	Projenin 26-29. aylarına tekabül eden en uygun bir günde
<b>Web Sayfası</b>	Sinirbilim ve epigenetik konularında çalışan araştırmacılar	Projenin 6. ayı itibarıyla, projenin sonuna kadar
<b>Eğitim</b>	İlgi duyan araştırmacılara web sayfası üzerinden başvuru şansı tanıyarak	Tüm proje boyunca çalışmalarına katılma şeklinde ve projenin 26-29. ayları arasında uygun bir günde duyuru olarak

(\*) Tablodaki satırlar gerektiği kadar genişletilebilir ve çoğaltılabilir.

## BAŞVURU FORMU EKLERİ

EK-1: KAYNAKLAR

EK-2: BÜTÇE VE GEREKÇESİ

(\*) EK-1 ve EK-2 hariç toplam 20 sayfayı geçen proje önerileri değerlendirmeye alınmadan iade edilir.  
(Sayfa kontrolü sistem tarafından yapılmayıp, proje yürütücüsünün sorumluluğundadır.)