

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

FETAL ALKOL SPEKTRUM BOZUKLUKLARI'NIN
C57BL6/J SOY FARELERDE EPIGENETİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

Nail Can ÖZTÜRK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. A. Hakan ÖZTÜRK

Prof. Dr. Feng C. ZHOU

MERSİN-2012

T.C.
MERSİN ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
ANATOMİ ANABİLİM DALI

FETAL ALKOL SPEKTRUM BOZUKLUKLARI'NIN
C57BL6/J SOY FARELERDE EPİGENETİK OLARAK
DEĞERLENDİRİLMESİ

Nail Can ÖZTÜRK
DOKTORA TEZİ

DANIŞMANLAR

Prof. Dr. A. Hakan ÖZTÜRK
Prof. Dr. Feng C. ZHOU

Bu tez, Mersin Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi tarafından
BAP-SBE A (NCÖ) 2011-5 DR nolu proje olarak desteklenmiştir.

Tez No: 30

MERSİN – 2012

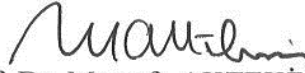
MERSİN - 2012

Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Anatomi Anabilim Dalı Doktora Programı çerçevesinde yürütülmüş olan “Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları'nın C57BL6/J Soy Farelerde Epigenetik Olarak Değerlendirilmesi” başlıklı çalışma, aşağıdaki jüri tarafından Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi

24.12.2012



Prof. Dr. Mustafa AKTEKİN

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Anatomi Anabilim Dalı

Jüri Başkanı

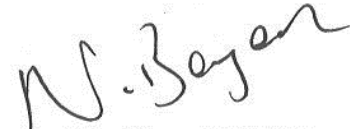


Prof. Dr. A. Hakan ÖZTÜRK

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Anatomi Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Neslihan BOYAN

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi

Anatomi Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Doç. Dr. Necat YILMAZ

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi



Doç. Dr. İ. Öner BARLAS

Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi

Tabii Biyoloji Anabilim Dalı

Jüri Üyesi

Bu tez, Enstitü Yönetim Kurulunun 25/12/2012 tarih ve 2012/398 sayılı kararı ile kabul edilmiştir.

Enstitü Müdürü

Prof. Dr. Ülkü COMELEKÇİ



TEŞEKKÜR

Yüksek lisans, doktora eğitimim ve tez çalışmam süresince deneyimlerini ve bilgi birikimlerini paylaşarak, beni pek çok konuda aydınlatan, yol gösteren, her konuda yardım ve desteklerini gördüğüm Anatomi Anabilim Dalı öğretim üyesi tez danışmanı hocam Prof. Dr. A. Hakan ÖZTÜRK'e, Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Mustafa AKTEKİN'e, yüksek lisans tez danışmanım Prof. Dr. Zeliha KURTOĞLU'na, Doç. Dr. Alev KARA'ya ve Uzm. Dr. Deniz UZMANSEL'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Amerika Birleşik Devletleri (ABD) Indiana Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ve Hücre Biyolojisi öğretim üyesi ve aynı zamanda Mersin Üniversitesi'nde Yardımcı Öğretim Üyesi (Adjunct Professor) olan doktora tezimin bir yılını kendi araştırma laboratuvarında yürüttüğüm ikinci tez danışman hocam Prof. Dr. Feng C. ZHOU'ya sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Yüksek lisans eğitimim sürecinde yüksek lisans tez danışmanlığımı yaparak, doktora eğitimim süresince de bilgi ve deneyimlerinden çok fazla yararlandığım, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Necat YILMAZ'a, ayrıca, bu uzun süreçte gerek kendi tecrübeleri ve anlayışları, gerekse Histoloji ve Embriyoloji A.D.'nin hiçbir imkanını benden esirgemeyen Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Tülin BAYKAL, Prof. Dr. Banu COŞKUN YILMAZ, Doç. Dr. Ebru BALLI ve Yrd. Doç. Dr. Savaş AKTAŞ hocalarıma sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

ABD Maryland Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ve Nörobiyoloji Bölümü'nde öğretim üyesi olan 2008 yılı yazında 4 aylık süreyle kendi laboratuvarında bana nöroanatomik boyama tekniklerini öğreten ve gelişimsel sinirbilim alanında üstün tecrübelerinden çok fazla yararlandığım Prof. Dr. Reha ERZURUMLU hocama sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızda kullandığımız sıvı deney modelini 2009 yılı yazında bana büyük bir sabırla öğreten ABD West Virginia Wesleyan College Biyokimya Bölümü öğretim üyesi Yrd. Doç Dr. Bruce Anthony'e sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmamızın çeşitli deneysel ve laboratuvar işlemlerine yardımcı olan Arş. Gör. Derya YETKİN başta olmak üzere tüm MEÜ Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'nda görevli asistan arkadaşlarıma, deney hayvanı modeli oluşturma aşamasında her türlü teknik ve teorik desteklerini sunan MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı çalışanlarına, gaz kromatografik analizlerimizi yürüten Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde görevli Arş. Gör. Emrah MAMUR'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Tezimin bulgularının istatistiksel analizleri aşamasındaki yardımlarından dolayı MEÜ Tıp Fakültesi Biyoistatistik ve Tıbbi Bilişim Anabilim Dalı Arş. Gör. Havva Didem OVLA'ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Lisansüstü eğitimim sırasında birlikte görev yaptığım Anatomi Anabilim Dalı'ndaki Arş. Gör. Özlem ELVAN başta olmak üzere tüm çalışma arkadaşlarıma ve tez çalışmam sırasında teknik ve teorik desteklerini gördüğüm, Prof. Dr. Feng ZHOU'nun laboratuvarında görev yapan mesai arkadaşlarım Dr. Anna RIETZ, Yuan Yuan CHEN, Marisol RESENDIZ, Manuel Serna MARTINEZ , Fang YUAN ve Floyd TIMM'e sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Doktora çalışmamın bir yılını ABD'de yürütmemi maddi olarak destekleyen Türkiye Fulbright Komisyonu ve Mersin Üniversitesi'ne sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Ve son olarak, hayatımın her aşamasında olduğu gibi bu tez çalışmam sırasında da beni maddi ve manevi olarak destekleyen aileme sonsuz saygı ve teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

KABUL VE ONAY	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	viii
ÇİZELGELER DİZİNİ.....	ix
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ.....	x
ÖZET.....	xi
ABSTRACT.....	xii
1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları.....	3
2.2. FASB ve Beyin Hasarları.....	4
2.3. Çalışmalardan Çıkan Sonuç.....	4
2.4. FASB’da Genetik Varyasyonların Rolü.....	5
2.5. Alkolün Biyolojik Yolaklar Üzerine Etkisi	6
2.6. Epigenetik.....	7
2.7. DNA Metilasyonu.....	8
2.8. Kromatin, Gen Ekspresyonu ve Epigenetik	8
2.9. Mitoz Bölünme ile Epigenetik Kalıtsallık	10
2.10. Epigenetik Modifikasyonların Çevresel Kökenleri	10
2.11. Epigenetik Tekrar Programlanma	11
2.12. DNA Metilasyon Dinamikleri	12
2.13 DNA Metilasyon Programı.....	12
2.14. Etanole Bağlı Teratogeneizde ETP.....	14
2.14.1. Etanol ve DNA Metilasyonu.....	14
2.14.2. Etanol ve Tek-Karbon Metabolizması.....	15

2.15. Serebral Korteks Gelişimi.....	15
2.15.1. Ara Nöronal Progenitör Hücreler.....	15
2.15.2. T-brain gene 2.....	16
2.15.3. Kortikal Göç.....	17
2.15.4. Kortikal Migrasyon ve P2Y1 Reseptörü.....	18
2.15.5. P2Y1 Reseptörü ve Ara Nöronal Progenitör Hücreler	18
2.15.6. Subplate Gelişimi.....	19
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
3.1. Çalışmanın Aşamaları	21
3.2. Sıvı Diyet Modeli.....	21
3.2.1. Deney Grupları.....	22
3.3. Dokuların Elde Edilişi.....	23
3.4. Çiftleştirme Paradigması.....	23
3.5. Kuyruk Kanı Örneği Elde Edilişi.....	24
3.5.1. Kan Alkol Seviyesi Ölçümü.....	25
3.6. Histolojik İşlemler.....	25
3.7. İmmünohistokimyasal Boyama.....	25
3.7.1. Boyama Protokolü.....	26
3.8. Western Blot Analizi.....	27
3.9. Densitometrik Görüntü Analizi.....	29
3.10. İstatistiksel Analiz.....	31
3.11. Kullanılan Araç ve Gereçler.....	31
3.11.1. Kullanılan Cihazlar.....	31
3.12. Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
3.12.1. Western Blot Sarfları	32
3.12.2. İmmünohistokimya Sarfları	33
3.12.3. Kullanılan Antikorlar	33
3.12.4. Sıvı Diyet Modeli için Kullanılanlar	34
4. BULGULAR.....	35
4.1. Kan Alkol Seviyesi Ölçümü	35
4.2. Fenotipik Farklılıklar	35

4.2.1. Embriyonik Vücut Ağırlıklarındaki Değişimler.....	36
4.2.2. Embriyonik Beyin Ağırlıklarındaki Değişimler	36
4.2.3. Embriyonik Korteksteki Değişimler.....	38
4.3. DNA Metilasyonu ve Nöronal Markırlar	40
4.4. Nöronal Markır Boyama Sonuçları.....	41
4.4.1. NeuN Boyaması	41
4.4.2. P2Y1 Boyaması.....	43
4.4.3. Tbr2 Boyaması.....	45
4.5. DNA Metilasyonu İşaretleme Sonuçları	46
4.5.1. 5mC Boyaması.....	46
4.5.2. 5hmC Boyaması.....	48
4.5.3. MeCP2 Boyaması.....	50
4.6. Western Blot Yöntemi ile MeCP2 Protein Ekspresyonu.....	52
5. TARTIŞMA.....	54
5.1. FASB Hayvan Modeli.....	54
5.2. Serebral Korteks Gelişimi ve DNA Metilasyon Dinamikleri.....	55
5.3. Prenatal Alkol Maruziyeti Sonrası Fetal Alkol Fenotipi.....	58
5.4. Nöronal Fenotip Değişiklikleri.....	59
5.5. Prenatal Alkol Maruziyeti Sonrası DNA Metilasyon Dinamikleri.....	64
6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER.....	69
7. KAYNAKLAR.....	71
ÖZGEÇMİŞ.....	84

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 4.1. E17 Chow, Alc ve E16 Chow grubu embriyonik beyinlerinin genel görüntüsü.....	37
Şekil 4.2. Chow, PF ve Alc grubu frontal serebral korteksinin X6'lık büyütmedeki koronal kesitlerinin görüntüsü	38
Şekil 4.3. Kontrol grubu E17 serebral korteksinde nöronal ve DNA metilasyon işaretlemelerinin görüntüsü	40
Şekil 4.4. NeuN protein ekspresyonunun, E17 Chow, PF ve Alc grubu frontal serebral kortekslerdeki görünümü	42
Şekil 4.5. P2Y1 protein ekspresyonunun, E17 Chow, PF ve Alc ve E 16 Chow grubu frontal serebral kortekslerdeki görünümü	44
Şekil 4.6. Tbr2 protein ekspresyonunun, E17 Chow, PF ve Alc ve E 16 Chow grubu frontal serebral kortekslerdeki görünümü	45
Şekil 4.7. 5mC protein ekspresyonunun, Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral kortekslerdeki görünümü	47
Şekil 4.8. 5hmC protein ekspresyonunun, Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral kortekslerdeki görünümü	49
Şekil 4.9. MeCP2 protein ekspresyonunun, Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral kortekslerdeki görünümü	52
Şekil 4.10. Chow, PF ve Alc grubu tüm beyinlerdeki MeCP2 ve internal kontrol (<i>housekeeping genes</i>) olarak kullanılan β -Tubulin ve GAPDH protein ekspresyonlarını temsil eden bantların görüntüsü	53

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1. Gaz kromatografisi kullanılarak elde edilen kan alkol değerleri grafiği	35
Çizelge 4.2. . Chow, PF ve Alc grubu tüm vücut ağırlıklarının gram cinsinden dağılım grafiği	36
Çizelge 4.3. Chow, PF ve Alc grubu tüm beyin ağırlıklarının gram cinsinden dağılım grafiği	37
Çizelge 4.4. Chow, PF ve Alc grubu beyinlerin serebral korteks kalınlık değişim grafiği	39
Çizelge 4.5. Chow, PF ve Alc grubu beyinlerin cortical plate tabakasının kalınlık değişim grafiği	39
Çizelge 4.6. Chow, PF ve Alc grubu SP ve CP tabakalarındaki NeuN immunohistokimyasal boyamasının densitometrik analizine ait değişim grafiği	43
Çizelge 4.7. Chow, PF ve Alc grubu VZ, SP ve CP tabakalarındaki 5mC immunohistokimyasal boyamasının densitometrik analizine ait değişim grafiği	48
Çizelge 4.8. Chow, PF ve Alc grubu VZ, SP ve CP tabakalarındaki 5hmC immunohistokimyasal boyamasının densitometrik analizine ait değişim grafiği	50
Çizelge 4.9. Chow, PF ve Alc grubu VZ, SP ve CP tabakalarındaki MeCP2 immunohistokimyasal boyamasının densitometrik analizine ait değişim grafiği	52
Çizelge 4.10. MeCP2 protein ekspresyonu bant yoğunluğunun, Chow, PF ve Alc grubu E17 beyinlerindeki değişim grafiği.....	53

SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

ADH	Alkol Dehidrogenaz
ALDH	Aldehid Dehidrogenaz
CP	Cortical Plate
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
DMP	DNA Metilasyon Programı
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNMT	DNA Metil Transferaz Enzimi
ETP	Epigenetik Tekrar Programlanma
FAS	Fetal Alkol Sendromu
FASB	Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları
H3K9Me	H3 histon üzerindeki lizin 9 metilasyonu
INP	Intermediate Neuronal Progenitor Cells
IZ	Intermediate Zone
MBD1	DNA Methylation Binding Domain 1
MeCP2	Methyl CpG-binding Protein 2
miRNA	mikroRNA
MZ	Marginal Zone
PF	Pair Fed
RIPA	Radioimmunoprecipitation Assay Buffer
SP	Subplate
SVZ	Subventricular Zone
Tbr2	T-brain gene 2
TCDD	2,3,7,8-tetrachlorodibenzopdioxin
TET	on-onbir translokasyon
VZ	Ventricular Zone
5mC	5-methylcytidine
5hmC	5-hydroxymethylcytidine

ÖZET

Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları'nın C57BL6/J Soy Farelerde Epigenetik Olarak Değerlendirilmesi

Gebeler tarafından alkol kullanımı, fetal gelişimi geniş bir spektrumda gelişimsel kusurlara ve büyüme geriliklerine neden olacak şekilde olumsuz yönde etkilemekte ve bu durum Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları (FASB) olarak tanımlanmaktadır. FASB'nin en belirgin özelliklerinden birisi, kognitif ve nörodavranışsal hastalıkların eşlik ettiği ve genellikle hayat boyu devam eden çeşitli derecelerdeki beyin hasarlarıdır. Henüz yeni bir yol olarak sayılabilecek epigenetik bilimi FASB sonucu ortaya çıkan beyin hasarlarının altında yatan moleküler temellere ışık tutmaktadır.

En temel epigenetik mekanizmalardan biri olarak kabul edilen DNA metilasyonunun, nöral tüp gelişimi sırasında nöronal farklılaşmaya paralel olarak gerçekleşen DNA Metilasyon Programı (DMP) olarak adlandırılan epigenetiksel bir süreç olduğu ve prenatal alkol maruziyetinin, embriyonik büyüme geriliğiyle eş zamanlı olarak bu programı geciktirdiği bilinmektedir. Söz konusu DMP'nin daha iyi anlaşılabilmesi için, çalışmamızda C57BL6/J farelerdeki serebral korteks gelişimi model olarak kullanılmıştır. Böylece, gerek DMP'nin normal kortikal gelişimdeki rolü, gerekse FASB modeli oluşturulmasıyla prenatal alkol maruziyetinin DMP üzerindeki etkileri DNA metilasyon dinamikleri incelenerek araştırılmıştır.

İnsanlarda gözlenen FASB'nin etkilerini taklit edebilmek için sıvı diyet paradigması kullanılarak %4'lük alkol solüsyonu içeren sıvı diyet fare gelişiminin gestasyonel 7. gününden (E7) E17'ne kadar uygulanmıştır.

Alkol sıvı diyet uygulaması neticesinde insanlardaki FASB fenotiplerine benzer olarak, beyin ağırlıklarının ve serebral korteks kalınlığının azaldığı görülmüştür. Çalışmamızda DNA metilasyon markırları 5-metilsitozin (5mC), 5-hidroksimetilsitozin (5hmC) ve onların bağlayıcı proteini olan MeCP2'yi de içeren karakterestik bir DMP'nin serebral kortekste, fenotipik nöronal işaretlemelerle de desteklendiği üzere kortikal nöronal farklılaşmayı ve olgunlaşmayı yönlendirdiği gösterilmiştir. Bunun yanında alkolün, oluşturduğu gelişimsel geriliğe paralel olarak, söz konusu DMP'nin işleyişini metilasyon markır dinamiklerini değiştirerek bozduğu gösterilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları, Nöronal Gelişim, DNA Metilasyonu, 5mC, 5hmC

ABSTRACT

Evaluation of Fetal Alcohol Spectrum Disorders in C57BL6/J Mice In An Epigenetic Perspective

Maternal alcohol intake during pregnancy adversely affects the fetal development, leading to various degrees of developmental deficits and growth retardation, collectively referred to as Fetal Alcohol Spectrum Disorder (FASD). One of the cardinal features, as well as the most severe consequence is the brain deficit and accompanying cognitive and neurobehavioral disorders which often persist into adulthood. A new path, epigenetics, shed light in understanding the molecular mechanisms underlying the brain damages seen in FASD. Recently, it's shown that DNA methylation is a program (DMP), which parallel to embryonic maturation during early neural tube development, and, alcohol exposure delayed this DMP along with retarded embryonic growth. For further understanding the DMP, we attempted to use developing cerebral cortex in C57BL6/J mice as a model and studied the DNA methylation dynamics in alcohol-induced embryonic brains.

To mimic the similar patterns of brain damage known to occur when pregnant women drink alcohol in chronic drinking pattern, we employed Liquid Diet (LD) paradigm [4% v/v alcohol in liquid diet on gestational (E) days 7 to E17.

Alcohol in LD paradigm reduced the brain weights on E17, and a significant reduction in cerebral cortex thickness which is concordant with the brain deficits seen in FASD. We found that a characteristic DMP, including 5-methylcytidine (5mC), 5-hydroxymethylcytidine (5hmC) and their binding protein Methyl CpG Binding Protein 2 (MeCP2), lead the cortical neuronal differentiation and maturation as indicated by their phenotypic marks in each cortical layer prenatally. Overall, alcohol hinders the acquisition and progression of methylation marks which is correlated with developmental retardation.

Key Words: Fetal Alcohol Spectrum Disorders, Neuronal Development, DNA Methylation, 5mC, 5hmC

1. GİRİŞ

Alkolün evrimin başlangıcından beri, aynı şeker gibi, yaşamın her formu ile yakından ilgili bir madde olduğu bilinmektedir. Birçok yaşam formu hayatta kalmak için şekere bağımlı olmakla birlikte, evrim süreci boyunca gerçekleşen çok sayıda mutasyon ve seleksiyonun bu bağımlılığın gelişmesine neden olduğu bilinmektedir. Buna bağlı olarak insanlar dahil birçok canlıda, tatlı “şekerimsi” tadı aramaya yönelik eğilim yeni bir öğrenme gerektirmemekle birlikte bu eğilimin zaten kalıtsal geçişten köken aldığı düşünülmektedir. Diğer yandan alkol, hayatta kalmak için gereklilik olmadığından dolayı evrimin, vazgeçilmez olan “alkolü arama eğilimini” zevk alma gibi daha farklı bir işlevde bugüne kadar genler yoluyla taşıdığı düşünülmektedir. Alkolle ilgili hedonistlik yani zevke ait olan eğilimin sonsuza kadar devam edemeyeceği, büyük olasılıkla evrimsel sürecin alkolün rolünü zevkten çok bağımlılık yönünde değiştireceği düşünülmektedir. Alkol bağımlılığı sadece insanlarda değil, maymun, domuz, kemirgen ve meyve sineği gibi canlı gruplarında da görülmektedir. Evrimsel süreçte gerçekleşen mutasyonlar ve seleksiyonların, araştırmalarda kullanılan alkolü tercih eden ratlar ve C57 soyu farelerde görüldüğü gibi, alkolü tercih eden “alcohol-preferring” özelliğın genler içerisinde bugüne kadar taşınmış olduğu düşünülmektedir.

Alkol günümüzde tüm dünyada yaygın olarak kullanılmakla birlikte geniş spektrumda gelişimsel kusurlara neden olabilen klasik teratojen bir madde olarak da kabul edilmektedir. Prenatal dönemde gebeler tarafından alkol kullanımı geniş bir dağılımda gözlenen nöro-davranışsal ve fiziksel bozukluklara yol açabilmektedir. Bu bozuklukların derecesi, hafif seviyeden spontan düşüklere kadar çok geniş bir spektrumda gözlenebilmekte ve Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları (*FASB* - “*Fetal Alcohol Spectrum Disorders*”) olarak bilinmektedir.

Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları'nın tanımlanmasından kısa bir süre sonra, bu bozuklukların altında yatan mekanizmaların ortaya çıkarılması üzerine yoğunlaşmıştır. Yukarıda açıklandığı üzere, intra-uterin alkol maruziyetinin klinik sonuçları çok fazla değişkenlik göstermektedir. Buna bağlı olarak, bu alanda erken dönemlerde yapılan araştırmalar çeşitli hayvan modelleri kullanarak, gözlenen değişkenliğin alkol maruziyetinin zamanlamasına ve dozuna bağlı olup olmadığının üzerine yoğunlaşmıştır. Araştırmacıların konuyla ilgili diğer yaklaşımları ise alkol teratojenitesinin genetik, biyokimyasal, hücrel ve morfolojik bakış açıları üzerine olmuştur. Örneğin, alkole bağlı büyüme faktörlerinin seviyesinin düşmesinin hücrel proliferasyonu azalttığı ve bunun da beyin dokusu

organizasyonunda geriliğe yol açtığı gözlenmiştir. FASB araştırmalarında karşılaşılan en önemli zorluk, çok geniş ve birbirinden bağımsız olarak gözlenen klinik durumların altında yatan mekanizmaların nedenlerin tatmin edici şekilde açıklanamamasıdır. Bu sorunun çözülmesi oldukça önemlidir çünkü FASB'nın altında yatan esas nedenlerin tek bir bakışla ele alınarak anlaşılmasının mümkün olamayacağı, aksine FASB'nın gelişimsel bir bozukluk olması nedeniyle çok sayıda tekrarlanan gelişimsel moleküler yolakların ve etkileşimlerin bir arada değerlendirilebileceği bir bakış açısıyla ele alınmasının daha doğru olacağı bildirilmiştir. Fakat günümüzde FASB araştırmalarında böyle bir bakış açısı maalesef mevcut görülmemektedir. Memeli embriyonik gelişiminin kendi başına bir seri çok karmaşık gelişimsel moleküler işlemler tarafından kontrol edildiği düşünöldüğünde, prenatal alkol maruziyetinin embriyonik gelişimi esas olarak ne zaman, nasıl ve özellikle hangi moleküler mekanizmaları ne derecede etkileyerek FASB benzeri fenotiplere yol açtığına dair halen pek az bilgi bulunmaktadır. Bu noktada, henüz yeni gelişmekte olan epigenetik biliminin FASB araştırmalarında gereksinim duyulan geniş perspektifte bir bakış açısını kazandırabileceği amaçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları

Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları fetal dönemde alkole maruz kalma sonucu gelişen yapısal ve nörogelişimsel anomalilerin bütünüdür. Doğru bir teşhise gidebilmeyi kolaylaştırmak amacıyla alkole bağlı ortaya çıktığı bilinen doğum defektleri ve nörogelişimsel hastalıkları kapsayan geniş bir spektrumdaki bozuklukları ayırt edebilmek için çeşitli klinik teşhis rehberleri oluşturulmuştur (1-3). FASB kendisini bir takım belirtilerle gösterir ki bunlar; kraniofasiyal dismorfoloji (*ince üst dudak, düzleşmiş philtrum ve küçülmüş göz açıklıkları*), pre- ve postnatal büyüme geriliği ve hayat boyu sürebilen kognitif ve davranışsal bozukluklara yol açan merkezi sinir sisteminin anormal büyüme ve gelişimidir. FASB mental bozukluğun en sık önlenemez sebebidir. Birçok ülkede FASB prevalansı 1000 canlı doğumda 0,5 ile 2,0 aralığında olmakla birlikte, birçok toplumda çarpıcı bir şekilde çok daha yüksektir. Güney Afrika'da karışık akrabalık bağlarının olduğu Western Cape bölgesinde 1000 okul çağı çocukta 65,2 kadar yüksek bir prevalans ile görülmektedir ve Kuzey Cape bölgesinde prevalans 67,2'ye kadar çıkmaktadır (4-6).

1990 yılında, hayat boyu süren engellilikte alkole bağlı hastalıkların global olarak sıklığı %3,5 olarak açıklanmış, fakat 2004 yılında çarpıcı bir şekilde bölgesel farklılıklar olmakla birlikte bunun %4'e çıktığı bildirilmiştir (7). In-utero alkole maruz kalmış çocukların ancak %5 ila %10'unda alkole bağlı defisitler görüldüğü tahmin edilse de, bu oran muhtemelen tahmin edilenin de altında kalmaktadır (8,9). Otizm ile dikkat eksikliği ve hiperaktivite hastalığı (*attention deficit and hyperactivity disorder-ADHD*) gibi birçok idyopatik nörogelişimsel hastalığı alkol maruziyetinin nesilden nesile aktarılan etkilerine bağlamak mümkündür. Amerika Birleşik Devletleri'nde FASB'nın toplumun %1'ini etkilediği düşünülmekle ve çok ciddi boyutta sağlık harcamalarına sebep olduğu tahmin edilmekle beraber, özellikle orta ve alt gelirli ülkelerde prevalansın tahminlerden çok daha yüksek olduğu düşünülmektedir (10-13).

2.2. FASB ve Beyin Hasarları

Fetal alkol sendromlu kişiler, çeşitli derecelerde anormal proliferasyon, nöronal ve glial migrasyonlar yolu ile, nöral tüp defektleri, neokortikal veya serebellar morfogenezde değişiklikler gibi yapısal farklılıklar göstermektedir (14). Bu farklılıklara, mikrosefali, holoprozensefali, şizensefali, septoptik displazi, corpus callosum'un agenezi veya hipoplazisi, lizensefali, polimikrogri, heterotopiler veya özellikle vermis'i ilgilendiren başka serebellar değişiklikler, hipokampus, ve bazal ganglionlardaki (özellikle nucleus caudatus) değişiklikler örnek verilebilir (15-20). Alkole maruz kalmış laboratuvar hayvanlarında, beynin bazı bölgelerinde azalmış nöron sayısı (hipokampus'ta mossy liflerin anormal dağılımı tipiktir) ve anormal sinaptogenez oluşumuyla ilgili bozulmuş nöronal organizasyonlar gözlenmiştir (21). Ayrıca dendritik dikensi oluşumların gelişiminde gecikme ve anormal kortikal morfogenez de gözlenmiştir (22,23). Bu malformasyonların ışığında, fetal alkol spektrum bozukluklarında epilepsi ve epileptiform anormallikler genel popülasyona göre daha fazla görülmektedir (% 1-6) (24).

Fetal alkol sendromlu veya fetal alkol spektrum bozuklukları olan kişilerde yapılan nörogörüntüleme çalışmalarında gözlenen en sık bulgu genel olarak beyin volümünün düşük olması olarak görülmektedir (15,16). Ayrıca, FAS'u veya FASB olanlarda, bazal ganglionların orantısız bir şekilde azalmış hacime, serebellum'un küçülmüş hacime ve azalmış yüzey alanına, frontal, parietal, temporal ve daha az oranda oksipital lobun, normal gelişim gösteren kontrol deneklerine göre nispeten daha düşük bir hacime sahip oldukları görülmüştür (15,19,25). Birçok vakada FASB'lu kriterlerine tam olarak uymayan ara derece FASB'lu kabul edilen hastaların FASB'lu hastalara ve kontrollere göre birçok bölgenin hacim ölçümlerinin de arada değerlerde çıktığı gözlenmiştir (16,26). Ancak, FAS'ın teşhisi için gerekli fiziksel ve fasiyal malformasyon göstergelerine sahip olmayan, ağır bir şekilde alkole maruz kalmış hastalarda da önemli derecelerde nörodavranışsal hastalıklar gözlendiği bildirilmiştir (15).

2.3. Çalışmalardan Çıkan Sonuç

Parental alkol kullanımının, doğan çocuklara olan zarar verici etkileri yüzyıllardır bilinmekte ve dökümanente edilmekte olup, bu konudaki ilk bilgilerimiz 1720-1750 yılları

arasında İngiltere’de yaşanmış olan “*gin epidemic*” olayındaki gözlemlerle, 19. ve 20. yüzyıllarda yayınlanan raporlara dayanmaktadır (27). Fetal Alkol Sendromu ifadesinin kullanımı ve resmi medikal tanımı ilk kez 1973 yılı gibi yakın bir tarihte olmuştur (28).

In-utero etanol maruziyeti ile ilgili birçok deney hayvanı çalışması sonuçları değerlendirildiğinde, klinik belirtilerin ağırlığıyla gelişim evresinin, alınan dozun ve maruziyet sıklığının (*kronik/akut*) ilişki gösterdiği görülmektedir (29,30).

2.4. FASB’da Genetik Varyasyonların Rolü

In-utero alkol maruziyetinde görülen istenmeyen etkilere yatkınlıkta, genetik varyasyonların rolünün olmadığı yönünde herhangi bir soru işareti bulunmamaktadır. Soru işareti sadece genetik etkinin doğası ve şiddeti ile ilgilidir ve alkolün teratojenik etkilerini göstermede genetik varyasyonların çevresel faktörlerle (*beslenme ve çevre etkisiyle tetiklenmiş epigenetik tekrar şekillenme-epigenetic remodeling*) nasıl bir etkileşimde bulunduğu ile ilgili olduğu düşünülmektedir. Rodent modelleriyle yapılan birçok çalışma, aynı şartlarda etanole maruz bırakılmasına rağmen bilinen bazı yatkın inbred fare soyları ve başka inbred soylarda aynı etkilerin görülmemesinden dolayı, olası bozuklukları anlamada genetik geçmişin büyük öneme sahip olduğunu göstermektedir (31-33). Bu soylar arasındaki farklılıklar soyların alkol tercihi, alkol metabolizması ve davranışlarıyla ilişkili olabilmektedir. Örneğin; fare çalışmalarında, maternal alkol dehidrogenaz enzim aktivitesi ile maternal kan alkol düzeyleriyle nihai fetal anormallikler arasında ters bir ilişki olduğu gösterilmiş, ancak anneden ve fetüsten miras kalan diğer bazı kalıtsal faktörlerin de önemli olduğu da bu çalışmalardan çıkan bir sonuç olarak görülmektedir (32,34-36).

Bu sonuçlara rağmen, yatkınlığı ve klinik durumu belirlemek için insanlardaki genetik varyasyonların rolü nispeten çok az çalışmada araştırılmıştır. Yine de, FAS’lı çocukların kardeşlerinde dramatik bir şekilde artmış FAS riski (*genel popülasyonda prevalans 1000’de 1,9 olmasına rağmen, FAS’lı çocukların kardeşleri incelendiğinde; prevalans 1000 büyük kardeşte 170 ve 1000 küçük kardeşte 771’dir*) olduğu bildirilmiş ve monozigotik ikizlerde FAS görülme sıklığının, dizigotik ikizlerde görülme sıklığından daha fazla olduğu ortaya çıkmıştır (37,38). Genetik çalışmalar, annelerde ve onların FAS’lı çocuklarında öncelikle alkol dehidrogenazı (*ADH*), aldehid dehidrogenazı (*ALDH*) ve cytochrome P450 2E1’yi (*CYP2E1*) içeren alkol metabolize edici enzimlerin rolünü açığa çıkarmakla birlikte, bu

çalışmalarda deney grupları oldukça az sayıda örnek içermektedir (39,40). Fonksiyonel olarak, etanolün hızlı ve daha etkili bir şekilde atılmasıyla sonuçlanan ADH1B loküste (*ADH1B*2* ve *ADH1B*3*) birbirine eş olmayan önemli varyantların, farklı allellere sahip olmalarına rağmen Afrikan Amerikalıları kapsayan ve ortak ataları olan Güney Afrikalılar gibi birçok popülasyondaki vaka-kontrollü ve destekleyici çalışmalarda hafif düzeyde koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir (39-43). Etki mekanizması kesin olmamakla beraber, geniş bir Avrupa popülasyonunda yeni yapılan bir çalışmada bu ADH1B'in birbirine eş olmayan varyant alleli (*ADH1B*2*; *rs1229984*) ile gebelik öncesi ve gebelik sırasında düşük alkol kullanımı arasında kuvvetli bir ilişki olduğu gösterilmiştir (44). Fazladan alkole maruziyet alkol metabolizmasında farklı bir yol olan CYP2E1 ekspresyonunu tetikleyebilmektedir. Bazı CYP2E1 allel varyantları artmış metabolik kapasiteyle alakalı olup, FAS riskini module edebilmektedir. Ayrıca, CYP2E1, organogenez sırasında etanolün CYP2E1 ile katalizlenmiş oksidasyonunun oksidatif strese yol açabildiği plasenta, fetal karaciğer ve fetal beyinde eksprese edilmektedir (40). FASB ile ilgili genom düzeyinde gerçekleştirilen çalışmalar muhtemelen birçok ortak çevresel risk faktörlerinin hesaplanmasının zorluğundan ve büyük örnek sayılarının azlığı ile uygun kontrollerin olmamasından dolayı yapılamamıştır.

2.5. Alkolün Biyolojik Yolaklar Üzerine Etkisi

Alkol maruziyetinin, gelişmekte olan ve erişkin beynine etkilerini, aynı zamanda diğer bazı fizyolojik etkilerini anlamaya çalışmak için yapılan, alkolün hücreler, organlar ve organizmalar üzerindeki etkilerini tarif eden çok geniş bir literatür bilgisi oluşmuştur (45-47). Predispozisyona genetik katkı belli bir düzeye kadar ortaya çıkartılmış olmakla beraber, konunun daha iyi anlaşılması, gen ekspresyonu araştırmaları ile pre- ve postnatal alkol maruziyetinin fizyolojik etkilerinin araştırılması ile sağlanmıştır. Bu olaylar karaciğer (*etanol ve onun toksik metabolitlerinden olan asetilaldehidin metabolizmasının gerçekleştiği asıl yer*) ve sinir sisteminde yapılan birçok çalışmada birçok yolağı ilgilendiren patolojik mekanizmaların ortaya çıkartılması ile anlaşılmuştur. Fetal maruziyet sonucunda kraniofasial dismorfizm gelişiminin mekanizmaları araştırılmış ve alkolün teratojenik etkilerini arttıran ve azaltan bileşiklerin, antioksidanlar, sonic hedgehog protein ve retinoidler gibi etkenlerden kaynaklandığı gösterilmiştir (48).

Sıçan ve fare modellerinde in-utero alkol maruziyeti ardından gözlenen ortak fonksiyonel defisitler, doku gelişimini ve tekrar şekillenmeyi (*remodeling*) ve özel olarak da nöronal büyüme ve canlı kalmayı etkileyen, hücre proliferasyonu, diferansiasyonu ve apoptosis gibi olayları içermektedir. Tüm genom düzeyinde gerçekleştirilen ilk ekspresyon çalışmaları bu bulguların bazılarını doğrulamış ve bir grup genin fonksiyon ve ortak yolaklarla etkili olduğunu göstermiştir (49-53).

Alkole maruz kalmış ya da kalmamış fetüslerden elde edilen gen ekspresyonu mikrodizi verilerinin biyoinformatik analizleri, ortak transkripsiyon bağlama bölgeleri (*common transcription binding sites*) ve farklı eksprese edilmiş genler açısından potansiyel mikroRNA (miRNA) bağlama sahaları için translasyonu gerçekleşmemiş 5' bölgelerini ortaya çıkartmak adına yukarı yönde düzenleyici bölgeleri (*upstream regulatory regions*) incelemiştir. Elde edilen sonuçlar miRNA fonksiyonlarındaki değişikliklerin alkole bağlı teratojenitede etkin rol oynadığını düşündürmektedir (53). Ayrıca fetal alkol maruziyetinin, hücre motilitesini ve aynı zamanda metabolik kapasitenin değişmesine sebep olan reseptör aktivitesini hücre iskeleti reorganizasyonuna bağlayan ortak sinyal yollarını değiştirdiği gösterilmiştir (52). Rodentlerde gerçekleştirilmiş olan gen ekspresyonu çalışmaları, in-utero alkol maruziyeti sonucunda, merkezi sinir sistemi gelişimi ve nöral migrasyonu, glikokortikoid sinyalizasyonu ile nitrik oksit, insulin ve retinol seviyelerini ortaya çıkartmıştır (53-58).

2.6. Epigenetik

Biyolojide ve spesifik olarak genetikte, epigenetik, DNA dizilimini değiştirmeyen mekanizmaların sebep olduğu, gen ekspresyonunda veya hücre fenotipinde kalıtsal değişikliklerin çalışıldığı bir alan olmasından dolayı bu çalışma alanına epi- (*Yunancada üstünde, dışında anlamlarına gelen*) – genetik terimi kullanılmıştır. Bu terim nükleotid sırasında bir değişiklik olmaksızın sadece genomdaki fonksiyonel açıdan ilişkili değişiklikleri ifade etmek için kullanılmaktadır (57). Bu değişikliklere örnek, DNA dizisini değiştirmeden gen ekspresyonunu regüle eden olaylar olan DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gösterilebilmektedir. Bu değişiklikler hücrenin bütün hayatı boyunca hücre bölünmeleri süresince devam edebilir ve birçok kuşak boyunca da devam edebilmektedir. Fakat bu süreçte organizmanın DNA diziliminde herhangi bir değişiklik olmamakta ve genetik olmayan bazı

faktörlerin de katkısıyla organizmanın farklı bir şekilde davranmasına sebep olmaktadır (58). Yine de, histon modifikasyonlarının kimyasal tarifinde bu değişikliklerin kalıtsal olduğunu gösteren kuvvetli deliller olmamasından dolayı, epigenetik teriminin kullanımına itirazlar da bulunmaktadır (59).

2.7. DNA Metilasyonu

DNA metilasyonu DNA metiltransferaz enzimleri (*DNMTlar*) tarafından katalizlenen bir kovalent DNA modifikasyonudur. Bu işlemin vertebralı genomunda bir metil grubunun sitozin ve guanin dinükleotidleri (*CpG adacıkları olarak isimlendirilmektedir*) içerisindeki sitozine eklenmesiyle gerçekleştiği bilinmektedir (59). Prokaryotlarda hem sitozin hem de adenin metilasyonu, alıcı kısıtlayıcı olarak isimlendirilmiş bir sisteminin parçası şeklinde ifade edilirken, daha yüksek ökaryotik canlılarda DNA metilasyonunun baskılanmış kromatin ortamıyla ilişkili olduğu gösterilmiştir (61). Uygun DNA metilasyonu, normal gelişim için bir gereklilik olmakla birlikte, gen baskılama, imprinting, X-kromozom inaktivasyonu, tekrarlayan genomik elemanların supresyonu ve karsinogenezis gibi birçok olayın içerisinde de yer almaktadır (62).

2.8. Kromatin, Gen Ekspresyonu ve Epigenetik

Kromatinin en temel yapı taşı olan DNA'nın, histon proteinleri ile ipteği boncuk tanelerine benzer bir konfigürasyonda oluşturduğu yapı nükleozom olarak bilinmektedir. Nükleozomun ana yapısı H2A, H2B, H3 ve nükleozomlar arasında bağlayıcı rol üstlenen H1 histonlarından oluşmaktadır (8, 63). Kromatinin en bilinen epigenetik modifikasyonları, DNA metilasyonu ve histon proteinleri arasındaki kovalent modifikasyonları içermektedir. DNA metilasyonu genellikle vertebralı genomunda metile edilen CpG dinükleotidlerinde gerçekleşmektedir. Histon modifikasyonları ise H3 ve H4 histonları ile H2A ve H3 histonların ana gövdesinin N-terminal uçlarında gerçekleşmektedir. Bu histonların amino asit artıkları asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubikitinasyon, ADP-ribozilasyon ve sumolasyon ile kovalent bir şekilde modifiye edilebilmektedirler (63). Bu kovalent modifikasyonların, kromatinin çeşitli evrelerde kompaktlaşması ve kıvrılmasına yol açarak transkripsiyonel

mekanizmaları etkilediği düşünülmektedir. Transkripsiyonel açıdan, mikroskobik olarak az yoğun (*ökromatin*) olarak görülen kromatin bölgelerin yüksek oranda aktif, çok yoğun (*heterokromatin*) bölgelerin ise sessiz olduğu gözlenmiştir. İki asıl kromatin tipinin de belirgin epigenetik modifikasyonlar ile ilgili olmaya eğilimli olduğu görülmüştür. Örneğin, heterokromatin CpG dinükleotidlerin metilasyonu, H3 ve H4 histonların hipoasetilasyonu ve H3 histon üzerindeki lizin 9'un (*H3K9Me*) dimetilasyon/trimetilasyonu ile ilişkili olduğu bilinmektedir (64). Diğer taraftan, ökromatin ise CpG dinükleotidlerin hipometilasyonu, H3 ve H4 histonların asetilasyonu ve H3 histon üzerindeki lizin 4'ün (*H3K4Me*) dimetilasyon/trimetilasyonu ile ilişkili olmaktadır (64).

Bütün bu modifikasyonlar, histonların geri dönüşebilir asetilasyonunu katalizleyen histon asetiltransferazlar ve histon deasetilazlar gibi kromatin modifiye eden enzimler tarafından regüle edilmektedir (65). Diğer önemli enzimler histon metiltransferazlar, devam ettiren DNA metiltransferaz DNMT1 ve DNMT3A ve DNMT3B de novo metil transferazlar olarak bililmektedir (66,67).

Bu epigenetik modifikasyonlar ve kromatin yapısı arasındaki ilişkinin mekanizması, kromatini tekrar şekillendiren enzimler ve diğer nonhiston proteinlerin yeniden düzenlenmesi için kısmen kromatin işaretlerinin kabiliyeti ile düzenlenmektedir. Örneğin, farede H19 imprinting kontrol bölgesi denem bölgesinin paternal allelindeki metilasyon, sınırlayıcı eleman olan CCCTC-binding factor denem faktörünün bağlanmasını bloke etmektedir (68).

Protein bağlanmasını durdurmak amaçlı gerçekleşen DNA metilasyonuna dayanan yukarıda belirtilen mekanizmaya aykırı olarak, diğer bazı kromatin proteinlerinin tercihen metile edilmiş DNA'ya bağlandığı bilinmektedir. Fonksiyonel olarak Rett sendromu ile ilgili olan Methyl CpG-binding protein 2 (*MECP2*); methyl CpG-binding domain protein 1 (*MBD1*), MBD2, MBD4, ve Kaiso bu proteinlerden bazılarıdır (69-71).

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları, kromatin yapısı üzerinde etkileri aracılığla gen ekspresyonunu regüle etmektedirler. Aksine, küçük (*20–30 nukleotidlik*) ncRNA'lar gen ekspresyonunu hem kromatin düzeyinde hem de posttranskripsiyonel olarak işleyen RNA susturma yoluyla düzenlemektedirler (72). İki en iyi bilinen RNA susturma yollarından biri, kısa müdahaleci RNA'lar (*interfering RNAs*) tarafından düzenlenen RNA enterferansı, diğeri ise mikro-RNA'lar (*miRNA*) tarafından düzenlenen gelişimle programlanan susturucu yolları olarak bilinmektedir. Her iki RNA da daha uzun, çift sarmallı RNA öncülerinden dicer enzimi aracılığı ile üretilir ve bunlar homolog sıraları susturan ya da ayrıştırıcı (silence/degrade) protein efektör faktörleri için spesifik faktörler

olarak fonksiyon görmektedir (72). RNA susturucu yollarıyla ilgili birbiriyle örtüşen birçok mekanizma olmasına rağmen bazı önemli farklılıklar da bulunmaktadır. Örneğin, miRNA'ların genellikle endojen orijinli dsRNA'lardan üretilmesine karşın, siRNA'ların dsRNA öncülerinin ekzojen orijinleri (*transgenler veya virüsler*) olduğu bilinmektedir. Ayrıca, miRNA'lar genellikle diğer genlerden köken alan hedef mRNA'ların translasyonunu engellerken, siRNA'lar degradasyon için genellikle kendi öncülerini hedeflemektedirler (72).

2.9. Mitoz Bölünme ile Epigenetik Kalıtsallık

DNA metilasyonu ve histon modifikasyonları gibi epigenetik değişimlerin mitoz bölünmeyle bir sonraki hücreye aktararak kalıtsal olduğu bilinmektedir. Örneğin, “eski” DNA-metilasyon profillerinin yeni sentezlenen DNA sarmalları üzerine kopya edilmesi tercihen yarı metile edilmiş DNA'yı metile etmesiyle, DNA-metiltransferaz 1 (DNMT1) aracılığı ile sağlanmaktadır (70). Bu yolla “eski yarı”nın metilasyon profili “yeni yarı”nın sentezi için bir şablon vazifesi görmektedir. Hangi histon modifikasyonlarının mitoz yoluyla replike edileceği ve nakledileceği, eski histonların yeni sentezlenen DNA sarmallarına rastgele dağıldığının bilinmesine rağmen çok iyi anlaşılmamış bir konu olarak kalmaktadır. Histon modifikasyonlarının, tek önerilen model olmamakla birlikte DNA metilasyonuna benzer bir şekilde replike ediliyor olabileceği düşünülmektedir (66). “*Nascent transcript model*” olarak ifade edilen modelde, heterokromatinin kalıtımının siRNA'lar ve H3K9 metilasyonu arasındaki pozitif geribildirim döngüsünden kaynaklandığı düşünülmektedir (72).

Küçük RNA'ların, birçok hücre bölünmesi sürecinde nispeten uzun süre gen susturucu paternlerini koruyabildikleri ve RNA-bağımlı RNA polimeraz tarafından stabil bir şekilde replike edilebildikleri bilinmektedir. RNA tarafından indüklenen gen susturma işleminin, *caenorhabditis elegans*'larda birkaç jenerasyon boyunca sürebildiği gösterilmiştir (73).

2.10. Epigenetik Modifikasyonların Çevresel Kökenleri

Gelişim döneminde, büyüme faktörleri, hormonlar ve diğer bazı sinyal moleküllerinin kontrolü altında, sayısız sinyal ileti yolları, hücre fonksiyonu üzerine etkilerini kromatin ve gen ekspresyonu yoluyla göstermektedirler (64,66). Genomun kromatin yapısındaki

kalıtılabilir değişiklikler yoluyla gelişimsel sinyallere cevap verebilmesini sağlayabilmesi hücre farklılaşmasının kilit bir özelliğidir ve aynı kişide hücreler arası fonksiyonel varyasyonlar için çok açık bir şekilde önem arz etmektedir.

Epigenetik faktörlerin gelişimsel sinyallere cevap verebilmesinin altında yatan sebep ekzojen çevresel stimuluslara olan duyarlılığından kaynaklanmaktadır. Örneğin; “epigenom”, diyet tamamlayıcıları (*folik asit, B12 vitamini, kolin ve betaine gibi*), etanol, endokrin engelleyiciler, in vitro kültür teknikleri, 2,3,7,8-tetrachlorodibenzopdioxin (TCDD), ve maternal bakım ile değişime uğrayabilmektedir (73-81).

2.11. Epigenetik Tekrar Programlanma (ETP)

Gelişimsel olarak, kromatin modifikasyonlarının oluşturulması ya da silinmesi epigenetik tekrar programlanma “*epigenetic reprogramming*” olarak bilinmektedir. Prenatal dönemin dramatik epigenetik değişikliklerle karakterize olduğu bilinmektedir. Preimplantasyon sırasında, genom-boyu DNA metilasyonu neredeyse tamamen yok olur; bunu gastrulasyon sürecinde genom-boyu yeniden metilasyonu izler (67). Eşey hücresi dizilerinde de epigenetik değişiklikler düzenliliğini kaybetmektedir: somatik hücrelerde olduğu gibi primordial germ hücreleri de genom-boyu yeniden metilasyon kabiliyeti kazanmaktadır, fakat genital sırt (*genital ridge*) adı verilen bölgeye girdikten hem işaretlenmiş hem de işaretlenmemiş (*imprinted and nonimprinted loci*) bölgelerde DNA metilasyonu aniden silinmektedir (82). Gelişimin sonraki dönemlerinin, son farklılaşma olaylarının başlangıç evresinde, sinir büyüme faktörünce indüklenen nöronal farklılaşma yolağı, astroglial farklılaşma yolağı ve nöral kök hücrelerin farklılaşması gibi lokalize kromatin değişimi ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (83,84). İnsan Epigenom Projesi araştırmaları DNA metilasyonunun doku farklılaşması ile uyumlu olduğu görüşünü desteklemektedir (85). Örneğin, 12 farklı dokudaki 6, 20 ve 22. kromozomların bisülfid sıralanması, CD4 lenfositler ve CD8 lenfositler (%6) gibi fonksiyonel olarak benzer hücrelerin metilasyonunda çok küçük farklılıklar olduğunu, spermiler ve melanositler (%20) gibi fonksiyonel olarak benzer olmayan dokulardaki hücrelerin metilasyonunda ise nispeten daha büyük değişikliklerin olduğunu göstermiştir (85).

2.12. DNA Metilasyon Dinamikleri

Genomik metilasyon kromatinin 3 boyutlu yapısı ve dolayısıyla DNA paketlenmesi üzerine etkilidir. Bu gibi değişiklikler daha sonra transkripsiyon için gerekli biyoaktif proteinlerin bu bölgeye erişimini engeller. Promotör bölgelerdeki yoğun CpG metilasyonunun, DNA paketlenmesi ile ilişkili olup, genlerin transkripsiyonunu ve kodlamayan RNA'yı inhibe ettiği gösterilmiştir (86). Yeni keşfedilen 5mC'nin hidrosile edilmiş formu olan 5hmC bu basit bakış açısını güçlendirmektedir. Aktif demetilasyon sürecinde, 5mC tet 1.2.3 (*on-onbir translokasyon 1/2/3*) enzimleri tarafından 5hmC'ye oksitlenmektedir ki, bu da daha sonra 5-formilsitozine ve 5-karboksisitozine veya cytidine deaminase aracılığı ile 5-metil uracil'e deamine edilerek demetile ettiği gösterilmiştir (87). Gelişimsel demetilasyonun daha önceleri sadece replikasyon bağımlı veya pasif yollar aracılığı ile gerçekleştiği sanıldığından bu durum önem arz etmektedir (88).

5hmC embriyonik kök ve zigotik hücrelerde süregelen bir DNA metilasyon formu olarak bulunur (89,90). Genom düzeyinde analizler 5hmC'nin, transkripsiyonel olarak aktif veya embriyonik kök hücrelerde ve gelişmekte olan beyinde aktive edici genlerle ilişkili olduğunu göstermektedir (91,92). Diğer çalışmalarda, susturulmuş genlerdeki eksprese edilmiş şekle dönüşmekte olan 5hmC'nin, embriyonik kök hücrelerdeki aktive edici ve baskılayıcı histon 3 modifikasyonları ile iki değerlikli (*bivalent*) bir şekilde bağlı olduğu bulunmuştur (93,94). 5hmC'nin fonksiyonel sonuçları, gen gövdesi (*gene body*) ve gelişimsel düzenleyici genlerin promotör bölgeleri ile ilişkili olarak ve aktive edici histon kodları ile ilişkili bölgelerde zenginleştirilmiş olarak genomik dağılımı ile daha da desteklenmiştir (91,95). Sonuç olarak, 5mC ve 5hmC özgün metil bağlama proteinlerine bağlanmakta ve sırasıyla heterokromatin (5mC) ve ökromatine (5hmC) kolokelize halde bulunmaktadır (96).

2.13. DNA Metilasyon Programı

Kohort genlerin kesin zaman-uzamsal (*spatiotemporal*) davranışlarla tam vaktinde transkripsiyonunu tarif eden birçok çalışmaya rağmen, farklılaşma sürecinde onbinlerce genin hücrel ekspresyonunun nasıl düzenlendiği halen tam olarak anlaşılamamıştır. Sorulara cevaplar yetersiz olmasına rağmen, yukarı yönde epigenetik regülasyon (*upstream epigenetic regulation*) bu yönde ümitlendirici bir gelişme olarak görülmektedir. DNA metilasyonunun

epigenom boyunca rastlantısal olmadığı artık bilinmektedir. Tam tersine, gelişim süresince DNA metilasyonu, kök hücreler farklılaşırken planlı bir şekilde işleyen dinamik bir süreçtir. Zigotta, hem 5mC hem de 5hmC gametlerden parental olarak kalıtılabilmekte, ancak hücreler hızlı bir şekilde bölünürken DNMT eksikliğinde kaybolduğu bilinmektedir. Daha sonra, genomik fonksiyonun epigenetik regülasyonunu sağlamak için, çok iyi anlaşılammış bir şekilde DNMT tarafından yürütülen yaygın de novo remetilasyonu gerçekleşmektedir (97). Totipotent embriyonik kök hücreler de, dağılım oranı, %75 olan CpG metilasyonununa karşın %25 non-CpG metilasyonu iken, %99 CpG metilasyonu yönünde değişim göstererek, metilasyon tekrar programlanması sürecinden geçmektedirler (98). Bu olaylar, 5hmC'nin embriyonik kök (ES) hücrelerinin ve totipotent zigotların devamı ve programlanması ile ilişkili olmasına bağlanmaktadır (89,99).

Nöral tüp gelişimi döneminde, nöroepitelyal hücrelerde, kesin zaman-uzamsal bir şekilde DNA metilasyonu belirgin bir şekilde ilerler. Bu programın kısa zaman önce nöral diferansiasyon ile aynı zamana denk geldiği gösterilmiştir (100). Diferansiye olmamış nöroprogenitor hücreler immunhistokimya ile gösterildiği şekilde 5mC'den yoksundurlar, fakat E7-8'deki migrasyon ve diferansiasyonun başlangıcında DNA metilasyonu yetisi kazandıkları gösterilmiştir. Farede 5mC'nin ardından yaklaşık 1 gün sonra, benzer zaman-uzamsal ekspresyon paternleri izlenerek MBD1 ve DNMT1 görülmeye başlanmıştır. Ön-arka yönde açık bir şekilde DNA metilasyonu ilk önce arkabeyinde ve sonra rostrale doğru önbeyine ve kaudalde nöral tüpe ve medulla spinalis'e doğru ilerlediği görülmüştür. Bu nöral ekseninde uzun zamandır bilinen, diferansiasyon ilerlemesiyle aynı paternde gerçekleşmektedir. Dorso-ventral hatta DNA metilasyonu önce ventrale daha sonra da arka bölüme doğru gelişmektedir. Bu durum, nöral tüpteki dorso-ventral yönde olan diferansiasyon derecelenmesiyle hemen hemen uyumlu olmaktadır (100).

Nöral progenitor hücrelerin DNA metilasyonu devamlılığı, embriyolardaki ve farklılaşmakta olan nöral kök hücrelerdeki (*hücreesel heterojeniteyi kontrol etmek amaçlı*) DNA metilasyonunun genom boyu analizi ile doğrulanmıştır (101,102). Hiper- ve hipometilasyon, nörolasyon ve nöral kök hücre farklılaşması sırasında embriyonik genomda ortaya çıkarılmıştır (102). Bir çok pluripotent genin inhibe edilmesi (*Oct 4*) ve nöron spesifik genlerin aktive edilmesi (MAP2) olgunlaşan hücrelerin transkripsiyonel ihtiyaçlarıyla uyumlu olduğu düşünülmektedir (102). 5mC ve 5hmC'nin DNA metilasyon dinamiği normal gelişim süresince, 5mC ve 5hmC'nin zaman-uzamsal bir şekilde, nöroprogenitor hücrelerin fenotipik progresyonunun spesifik nöronlara ve gliaya doğru farklılaşması ile aynı zamana denk

gelmesi için ortaya çıkması ve dönüşmesi, tahmin edilebilir bir program dahilinde olur. Bu epigenetik programın, büyük oranda, nöral kaderin belirlenmesi ve spesifikasyonu için transkripsiyonel gereklilikleri desteklediği düşünülmüştür (103).

2.14. Etanole Bağlı Teratogenezde Epigenetik Tekrar Programlanma

Etanole bağlı anormallikler ETP olaylarının bozulması ile oluşmaktadır. Bu epigenetik perspektifin desteğiyle, alkolün, DNA transmetilasyon reaksiyonlarında metil donörü kaynağı olan bir-karbon metabolizmasını, DNA metil transferazı, DNA metilasyonunu ve küçük ncRNA'ları etkilediği bilinmektedir (76, 104-106).

2.14.1. Etanol ve DNA Metilasyonu

Garro ve ark. (76) yaklaşık olarak gestasyonun ortalarında gebe farelere etanol uygulayarak 11 günlük fetüslerinde genom-boyu hipometilasyon olduğunu göstermişlerdir. Gebe MF1 fareler %50 etanol (3g/kg(-) veya kalorik eşdeğeri olan glukoz-salin karışımını gavaj yöntemiyle hamileliğin 9, 10 ve 11. günlerinde uygulamışlardır. Metil-kabul eden bir analiz (*methyl-accepting assay*) ile, araştırmacılar elde edilen DNA'ların HpaII metilaz için substrat oluşturma kabiliyetini ölçmüşlerdir. Bir metil donörü olan S-adenosyl-L-methionine'nin doygunluğa ulaştığı koşullarda, etanolle beslenmiş farelerin fetüslerinin DNA'sının, kontrol grubuyla kıyaslandığında, deney grubunda metilasyon derecesinin azaldığını düşündürecek şekilde daha iyi bir substrat olduğunu göstermişlerdir. Araştırmacılar aynı zamanda, etanol grubundan elde edilen nükleusların kontrol grubuyla kıyaslandığında, etanol uygulanmış farelerin fetüslerinde DNA metiltransferazın düşük seviyelerde olduğunu düşündürecek şekilde önemli derecede azalmış metilaz aktivitesine sahip olduğunu göstermişlerdir. Bu etkinin mekanizması, DNA metiltransferaz aktivitesini in vitro olarak %20'den %90'a varan geniş bir aralıkta (3-100 IM) inhibe ettiği bulunan asetaldehid ile yürütülüyor olabileceği düşünülmektedir. Buna karşın etanol DNA metiltransferaz aktivitesini in vitro olarak çok yüksek konsantrasyonlarda bile (100 mM) inhibe edememiştir (76).

Başka bir çalışmada, erkek farelerin kronik bir şekilde alkol alması, eşey hücresi dizisinde DNA metilasyonundaki değişikliklerin yavruda fiziksel değişikliklere sebep

olabileceği görüşünü destekler şekilde, spermdeki DNA-metiltransferaz RNA'nın ve yavruların ağırlığının azaldığı gözlenmiştir (105).

2.14.2. Etanol ve Tek-Karbon Metabolizması

Alkolün ve DNA-transmetilasyon reaksiyonları arasında önemli bir bağ olduğunu düşündürten; folat ve homosisteini de içeren bir-karbon metabolizmasının birçok bileşeni ile etkileşim içerisinde olduğu çok uzun yıllardır bilinmektedir. Vaka-kontrollü bir çalışmada 32 kronik alkolikde, alkol kullanmayan kontrol grubu ile karşılaştırıldığında, azalmış kan folat düzeyi ve artmış plazma homosistein düzeyleri rapor edilmiştir (107). Kronik alkolizm hayvan modeli çalışmasında ise, etanolün, folat kısıtlanmış diyet ile beraber uygulandığında, artmış homosistein düzeyiyle birlikte karaciğerde DNA metilasyonunda global bir düşüş ile sonuçlandığı görülmüştür (104).

2.15. Serebral Korteks Gelişimi

2.15.1. Ara Nöronal Progenitör Hücreler

İnsanlarda serebral korteksin bu yönlü kompleks bir organizasyona ulaşması ve memeli evrimi boyunca benzersiz bir şekilde bölgesel özelleşme ve bölgesel hücre yapılanması göstermiş olması hakkında çok az şey bilinmektedir (108-110). Ancak, hem ontogeni hem de filogeni sürecinde, hücresel ve moleküler olayların neokortikal alanları etkileyici bir şekilde organize etmesi anlaşılmaya başlanmıştır (111-113). Serebral korteks embriyonik gelişim sürecinde telensefalon'un dorsal nöroepitelinden köken almaktadır. Mitotik olarak aktif iki çok belirgin tabakadaki hücre çoğalmaları kortikal genişlemeyi sağlamaktadır. Telensefalik ventriküler yüzeyi döşeyen radial olarak oriente olmuş glial hücreler (*RGC*) ventriküler bölgeyi (*ventricular zone-VZ*) oluştururken, bazal progenitörler ya da yüzey bölücü olmayan hücreler olarak da bilinen, subventriküler tabakayı (*SVZ*) şekillendiren ve bazalde yerleşmiş ara progenitor hücreler (*intermediate nöral progenitor cells-INP'ler*) ara bölgeye (*intermediate zone-IZ*) kadar uzanırlar (114-119). *RGC*'ler, hücre

bağlantıları ile sınırlandırılmış özelleşmiş apikal membranları ventriküle dönük iyi tarif edilmiş apiko-bazal bir polarite gösterdiği bilinmektedir. Bu onların VZ'ye yapışmasını ve stabilize olmasını sağlar (121-122). RGC'ler kendi hücre gruplarının çoğalması için, erken gelişim sürecinde, simetrik proliferasyon veya asimetrik nörojenik bölünmeler göstererek kendini yenileme kompartmanı olarak görev görürler (123-124). Tam tersine, INP'ler apikal ve bazal yüzeyleri ile kontağını kaybetmiş ve polarite belirtileri açık bir şekilde ortadan kaybolmuş gevşek olarak dizilmiş hücreler olarak görülmektedirler (125,126). INP'ler, SVZ'nin oluşması için yavru hücrelerin VZ'ye doğru yüzeyel olarak hareket etmesiyle RGC'lerin asimetrik bölünmelerinden kaynaklanmaktadır. Time-lapse görüntüleme çalışmaları, sırasıyla, çoğu IPC'nin tek bir simetrik bölünmeye gittiğini, ancak çok az bir kısmının ise bir veya iki çift nöron oluşturan ikinci bir mitozla gittiğini göstermiştir (117,118).

Subventriküler tabakası memeli evrimi sürecinde kortikal genişleme ile uyumlu olarak büyümesini sürdürmektedir (108,126). Dolayısıyla, INP'lerde veya simetrik mitotik bölünmelerinde bir artış, memeli beyin evrimine eşlik etmiş olan kortikal yüzeyin teğet genişlemesine katkı sağlamış olduğu düşünülmektedir (113, 126). INP'ler üzerine onca ilgiye rağmen, INP'lerin soyunun nihai kaderi ve yeri henüz tam olarak çözülememiştir. İki birbirine zıt modelden, biri INP'lerin sadece üst tabaka kortikal nöronlarına, diğersinin ise bütün kortikal tabakalara katkısının olduğunu düşündürmektedir (118,128-130).

INP'lerin kökeninin ve proliferasyonunun moleküler mekanizmalarının nasıl kontrol edildiği henüz tam olarak tespit edilememiştir. Pronöral genlerden Neurogenin 2 (*Ngn2*) ve Mash 1'in aktivitelerinin kortikogenez sırasında apikal ve bazal mitozların birbirlerine oranlarını belirlemede rolü bulunmaktadır (119,131). Erken evrelerde *Ngn2*'nin SVZ hücre olgunlaşmasını ve nöronal farklılaşmasını teşvik ederken, daha sonraki evrelerde bu genin fonksiyonu VZ'nin proliferatif aktivitesinin prematür tükenişini önlemeye yönelik değişmektedir (131). *Ngn2*'nin kortikal nörogenez sırasında, bu farklı fonksiyonları nasıl gösterdiği ve *NGn2*-bağımsız mekanizmaların SVZ'nin oluşumuna katkısının olup olmadığı halen bilinmemektedir.

2.15.2. T-brain gene 2

T-brain gene 2 (*Tbr2*) serebral korteksin gelişiminde INP'lerde özel bir şekilde eksprese edilmesine rağmen, fonksiyonu *Tbr2* mutant embriyoların erken dönemde

ölümünden dolayı bu güne kadar görmezden gelinmiştir (132,133). Tbr2'nin kondisyonel olarak çıkartılması, mutant kortekste, gelişmekte olan ön beyindeki INP'lerin kaybına ve farklılaşmış yeni hücelere dönüşümüyle sonuçlandığı gösterilmiştir. Merak uyandırıcı bir şekilde, INP'lerin erken kaybı, kortikal yüzey alanının genişlemesinde ve kalınlığında, bütün kortikal tabakalarda nöron sayısında azalmaya sebep olmuştur. Bu bulgular, INP neslinin her kortikal tabakanın doğru morfogeneze katkıda bulunduğunu düşündürmekte olup, Tbr2 transgenik fare kullanılarak, bu farelerdeki Tbr2 + INP hücre kaderinin izlendiğinde edinilen sonuçlar bunu doğrulamaktadır. Sonuç olarak, INP'nin kimliğini ortaya çıkarmada, ventriküler radial glial hücrelerde Tbr2'nin eksprese edilmemesinin yeterli olduğu gösterilmiştir (134). Bütün bu bulgular, kortikogenez sırasında INP'lerin özelleşmesi için Tbr2'nin kritik bir öneme sahip olduğunu göstermektedir.

2.15.3. Kortikal Göç

Primatlarda, SVZ'nin üzerindeki kortikal tabakaya radial olarak göç eden neokortikal nöronları üretmesinin çok iyi bir şekilde ortaya konmuş olmasına rağmen, E13 ve E14 fare embriyolarından elde edilen en son kanıtlar, bu sekonder proliferatif bölgenin aynı zamanda nöronları kortikal plağa yönlendirerek katkıda bulunduğu düşünülmektedir (118, 135-137). ek olarak SVZ hücrelerinin DNA sentezleyerek ve kortikogenezin geç safhalarında (E15-E16) bile mitotik bölünmeler göstererek, bu bölgenin nörogenezin bütün safhaları boyunca serebral kortekse nöron sunmakta olduğunu düşündürmektedir (144). In situ time-lapse canlı görüntüleme kullanarak Liu ve ark. (138) VZ'deki hücre bölünmeleri ve SVZ'ye migrasyonu ve ardından CP'ye doğru göç etmeden önce gerçekleşen ek bölünmelerden oluşan olayların tamamını gözlemlemişlerdir. Migrasyonları öncesinde bir süre bekleyen, postmitotik oluşlarından anlaşılan INP'ler bölünmelerinin hemen ardından VZ'ye göç ettikleri görülmüştür. INP'lerin lokal hücre içi sinyalizasyonu ile modüle edilebilen, SVZ'ye radial göçleri sırasında çok belirgin davranışlar sergilediği sonucu çıkartılmıştır.

2.15.4. Kortikal Migrasyon ve P2Y1 Reseptörü

Önemli bir çalışmada sık rastlanan ve ikincil mesajcı olarak bilinen Ca^{+2} 'nin ve VZ'deki yarım kanallardan ve hücreler arası bağlantılardan salınan ATP'nin INP'lerin göçünde ve hücre-hücre iletişimi sürecinde ilişkili olabileceğini öngörmüşlerdir (138). Hipotezlerini, Ca^{+2} sinyalizasyonunun embriyonik retinada nükleer interkinetik translokasyonunu ve nöronal progenitörlerin mitozunu etkilediği şeklindeki bulgulara ve Ca^{+2} oynamalarının aynı zamanda serebellar granüler hücrelerin (139-143), kültür edilmiş progenitör nöronların, ve postmitotik kortikal nöronların hücre migrasyonunu etkilemesi gibi daha önceki bilgilere dayandırmaktaydılar (143,144). Kortikogenez sırasındaki spontan Ca^{+2} dalgalanmaları ve geçici yoğunluktaki artış ile birlikte hem VZ'de hem de SVZ'de gözlenmesi bunların nöronal proliferasyon ve migrasyonda önemli olduğunu düşündürmektedir (145,146). Aynı zamanda, embriyonik VZ hücrelerinin birbirlerine gap-junctionlarla bağlı radial glia ve nöronal öncüler içeren radial kümeler içerisinde konneksinleri eksprese ettiği gösterilmiştir (147,148). Sonuç olarak, gap junctionların ve yarım kanal-bağımlı ATP sinyalizasyonunun, Ca^{+2} dalgalanmalarına bağlı olduğu ve Ca^{+2} dalgalarının tahrip edilmesinin hücrenin embriyonik VZ'de S-fazına girişini engellediği belirtilmiştir. Liu ve ark. (138) interselüler ATP sinyalizasyonunun IPC'lerin migrasyonunda ve embriyonik serebral duvarda SVZ'nin oluşumunun önemli bir rol oynadığı hipotezini test etmişlerdir.

2.15.5. P2Y1 Reseptörü ve Ara Nöronal Progenitör Hücreler

Ventriküler tabakadan SVZ'ye nöronal migrasyonda ATP sinyalizasyonunun ilgisini göstermek amacıyla, Liu ve ark.(138) ilk önce, ATP reseptörlerinin, sıçanlarda rapor edildiği şekilde olup olmadığını anlamak için fare embriyosunun VZ/SVZ'sinde uygun embriyonik yaşlarda eksprese edilip edilmediğini belirlemişlerdir. Aslında, E14'den E16'ya kadar olan dönemde, ventriküler yüzey daha zayıf bir ekspresyon gösterirken, VZ ve SVZ ara bölgesinde yoğun purinerjik P2Y1 reseptör ekspresyonu gözlenmiştir. Yine de, P2Y1 reseptör ekspresyonu SVZ'nin en yüzeysel bölümünde azalmış ve pial yüze doğru daha da azalmış olduğu gözlenmiştir. Hem INP'ler hem de postmitotik nöronlar, nöral öncü hücreler tarafından ventriküler yüzde asimetrik bölünmelerle geliştirilir ve bunlar daha sonra VZ'nin

dışına doğru göç ederler (117, 149). INP'leri ayırt etmek için, INP'ler ve VZ'deki postmitotik nöronlar için spesifik olan Ngn2 ile immün boyama yapılmıştır. Az sayıdaki Tuj1+ hücreler VZ/SVZ bölgesinde gözlenmiş ve bunların çoğunun P2Y1 negatif olması, kortekse göçleri sırasında P2Y1 reseptörünün ekspresyonunun VZ/SVZ'un postmitotik nöronlarında down regüle olduğunu düşündürmektedir (138).

Liu ve ark. (138), P2Y1 reseptörü VZ/SVZ'de yoğun bir şekilde eksprese edildiğinden, ATP'nin hücrelerdeki Ca^{+2} cevaplarını indükleyip indükleyemeyeceğini göstermeye karar vermişlerdir. ATP reseptör blokajı yapan suramin (100 mM) uygulamasının Ca^{+2} cevaplarını tamamen bloke ettiğini görmelerine karşın, ATP (10 mM) uygulanmasının VZ/SVZ hücrelerinde kuvvetli Ca^{+2} cevapları oluşturduğunu göstermişlerdir. Ayrıca bu Ca^{+2} cevapları P2Y1 reseptörünü bloke eden MRS2179 tarafından da engellenmiştir. ATP (1-10 mM) tarafından indüklenmiş Ca^{+2} cevapları çok küçük miktarda desensitizasyon belirtisi ile tekrarlanabilirken, daha önce rapor edildiği gibi ATP'nin yüksek konsantrasyonları (100 mM) Ca^{+2} cevaplarını genellikle desensitize etmiştir (140). Tepki veren hücreler hem VZ hem de SVZ bölgelerinde yer almakta ve bu proliferatif bölgelerdeki total hücre popülasyonunun %40-60'ını oluşturmaktadır. Bütün bu bulgular INP'lerin, ATP cevabını kaybetme eğiliminde olan postmitotik nöronların tersine, purinerjik P2Y1 reseptörünü eksprese etmeye devam ettiğini göstermiştir. Böylece, bu çalışma P2Y1'in VZ/SVZ'deki INP'lerin göç durumuyla ilgili spesifik bir belirleyici rolü olduğunu düşündürmektedir (138).

2.15.6. Subplate Gelişimi

Serebral korteksin subplate (SP) tabakası en önce gelişen nöronlardan oluşan heterojen bir hücre popülasyonu olup geçici bir kompartman olduğu düşünülmektedir (150). Son 60 yıldır çeşitli türlerde yapılan çalışmalar, SP'in kortikal gelişimde çok önemli bir aktör olduğunu göstermiştir (151,152). Farklı gelişim evrelerinde subplate hücreleri farklı farklı roller üstlenirler. Embriyonik subplate hücrelerinin kortikofugal ve talamokortikal aksonların yönlendirilmesinden ve topografik bağlantılar sağlanmasında etkili olduğu gösterilmiştir (153,154). Rodentlerde ve kedilerde erken postnatal subplate nöronları salınımlı bir aktivite geliştirilmesinde ve eksite ve inhibe edici talamokortikal bağlantıların olgunlaşmasında ve plastisitesinde çok önemli bir rol aldıkları gösterilmiştir (155-158). Geri kalan erişkin SP hücrelerinin kortikokortikal bağlantıları desteklediği düşünülmektedir (150, 159-161).

Kortikal gelişimdeki önemli rolleriyle uyumlu olarak, SP anormalliklerinin çeşitli gelişimsel hastalıkların patogeneğinde rolü olduğu düşünülmektedir. Bunlara örnek olarak, preterm hipoksi-iskemisini takip eden vizüel ve kognitif bozukluklar, şizofreni ve otizm spektrum hastalıkları verilmektedir (162-167).

Subplate fonksiyonları altında yatan moleküler mekanizmalar hakkında çok az bilgibulunmaktadır (168). En son çalışmalarda farklı gelişim evrelerindeki murin SP'in E12 ve postnatal 8. günde (P8) ve erişkinde gen ekspresyon profilini ortaya çıkarmıştır (169). Bu çalışmalar SP'e doğru yönelmiş preplate nöronlarda (*hippocalcin*, *glutamate receptor Eaac1*) veya postnatal ve erişkinde SP hücrelere (*monoxygenase MoxD1*, *complexin 3*) spesifik olarak eksprese edilen bazı genleri ortaya çıkartmıştır (169,170). Enteresan bir şekilde, bu genlerin çoğunun temporal ekspresyonu gelişen SP'in dinamik doğasını ve değişen rollerini vurgular bir şekilde çok sıkı bir şekilde regüle ettiği bilinmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Çalışmanın Aşamaları

Bu tez çalışması, Mersin Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Hayvan Etik Kurul Başkanlığı'nın 15.07.2011 tarih ve 2011/21 sayılı kararı ile "Etik Kurul Onayı" almıştır.

Çalışmamızda deney hayvanı modeli oluşturulması, gerekli dokuların elde edilmesi ve dokuların kullanım aşamasına kadar muhafaza edilmesi işlemleri, Mersin Üniversitesi (MEÜ) Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı, Anatomi ile Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalları Laboratuvarları'nda, dokuların uygun koşullarda transferi sağlandıktan sonra geriye kalan tüm işlemlerden geçirilmesi aşamaları ise Fulbright Doktora Tezi Araştırma Bursu desteği ile Amerika Birleşik Devletleri Indiana ve Purdue Üniversitesi Tıp Fakültesi Anatomi ve Hücre Biyoloji Bölümü'nde Prof. Dr. Feng C. Zhou'nun Gelişimsel Nörobiyoloji Araştırma Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir.

3.2. Sıvı Diyet Modeli

Çalışmamızda Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları'nın ortaya çıkmasında etken olan gebelik sırasında anne tarafından kronik olarak alkol kullanımının taklit edilmesi amacıyla literatürde güvenilirliği kabul görmüş olan İsteğe Bağlı Sıvı Diyet (*Volunteer Liquid Diet Drinking Paradigm*) modeli kullanılmıştır. Oluşturduğumuz sıvı diyet modelinde MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nın sağladığı genetik olarak özel tasarlanmış ve alkol kullanımına yatkınlığıyla (*alcohol preferring*) bilinen C57BL6/J altsoy fareler kullanılmıştır. Deney paradigmamızda çiftleştirme işlemi dışında sadece dişi fareler kullanılmıştır.

Sıvı diyet modeli için özel tasarlanmış üzeri filtre kapaklı sıçan kafesleri (2065 mm^2 taban alanı - $610 \times 435 \times 215 \text{ mm}$) kullanılmıştır. Bu kafeslerin içerisi krom plaklar ile dört odacığa bölünmüş ve bu deney modeli için özel tasarlanmış cam besleme tüpleri her bölmenin içerisine monte edilmiştir. Besleme tüplerinin içerisine, optimum düzeyde gerekli bütün besin maddelerini içeren söz konusu deneyler için özel tasarlanmış toz formda ve ticari olarak elde edilmiş diyet maddesi distile su içerisine karıştırılmak suretiyle farelere verilmiştir. Tüplerin içerisindeki sıvı diyetin hacmi literatürdeki benzer çalışmalarda tasarlanmış olan maksimum

25ml olarak belirlenmiştir. Deney fareleri tüm besin ihtiyacını söz konusu sıvı diyetten karşılayacak şekilde ve sıvı diyetten 24 saat boyunca 25ml'yi aşmayacak hacimde tüketmesine izin verilmiştir. Sıvı diyet uygulaması dışında fareler standart fare kafeslerinde barındırılmıştır.

3.2.1. Deney Grupları

Deney tasarımıımızda üç ana grup bulunmaktadır. Bunlar; alkol ve kalorik kontrol olmak üzere iki sıvı diyet grubu ve standart kontrol grubu olarak tasarlanmıştır.

Alkol (*Alc*) grubu farelerin sıvı diyeti içerisinde %95'lik yüksek kalite etanol karıştırılarak diyetin hacimsel olarak %4 oranında içermesi sağlanmıştır. Tutarlı kalori kontrolü sağlamak deneysel alkolizm sıvı diyet modellerinin en temel unsurlarından biri kabul edilmektedir. Bu nedenle kalorik kontrol grubu (*pair-fed, PF*) farelere *Alc* grubunda hazırlanan diyetin içerdiği etanolün kalorisine denk toz formunda maltoz-dekstrin eklenmiştir. Buna göre her iki sıvı diyetteki (*Alc ve PF*) hacimsel kalori oranı 1ml/1kcal olacak şekilde ayarlanmış ve *PF* grubu farelere verilen sıvı diyetin hacmi *Alc* grubu farelerin tükettiği ortalama diyet hacmi ile sınırlandırılmıştır. Buna göre *PF* grubundaki ve *Alc* grubundaki farelerin tükettiği diyet hacmi ve kalorisinin birbirlerine eşit olması sağlanmıştır. Sıvı diyet modeli besleme tüpleri cam materyal olup üzerinde hacimsel olarak ölçülebilir değerler bulunmaktadır. Her deney günü saat 09.00-10.00 arası her bir farenin ağırlığı ve tükettiği sıvı diyet miktarının ölçülmesinden sonra besleme tüpü dikkatlice temizlenerek yeni hazırlanmış sıvı diyet eklendikten sonra kafes bölmeleri içerisinde tekrar yerleştirilmiştir. Gün içerisinde saat 12.00-17.00 arasında bir kez kafeslerin kapakları açılmadan bölmeler içerisindeki şartların ve farelerin durumları hayvanlar rahatsız edilmeden kontrol edilmiştir. Sıvı diyet deney gruplarına paralel olarak standart kontrol grubundaki (*Chow*) fareler deney süresince standart fare kafeslerinde barındırılmıştır. Deney tasarımıımız dahilinde dişi fareler çiftleştirme işleminden bir hafta önce *Alc* ya da *PF* sıvı diyetlerine alıştırma amacıyla maruz bırakılmıştır. Fareler bu bir haftalık sürecin ilk 2 gününde %2'lik ve geriye kalan 5 gün ise %4'lük Alkol veya *PF* oranında diyete maruz bırakılmıştır. Dişi fareler bu bir haftalık sürecin ertesi günü çiftleştirme işlemine alınmıştır. Gebelik tayin edilen dişi fareler E7-17 gebelik sürecinde *Alc* veya *PF* sıvı diyetleri uygulamasına alınmıştır. Sıvı diyet gruplarına paralel olarak sıvı diyet uygulaması dışındaki tüm işlemler standart kontrol grubu olan *Chow* grubu

dişi farelere de E17'e kadar uygulanmıştır. E17'nde 3 farklı gruba ait gebe farelerin uygun anestezi altında, batinları açılarak sezeryan yöntemiyle embriyoları çıkarılmıştır. Deneylede, gebe farelerin (*embriyoları alındıktan sonra*) henüz anestezi altındayken servikal-dislokasyon yöntemi ile tenazisi gerçekleştirilmiştir ve bu materyal uygun poşetler içerisinde, üzerine deneyle ilgili not yazılmak suretiyle biyolojik atık birimi gelene kadar - 20°C'de muhafaza edilmiştir.

3.3. Dokuların Elde Edilişi

Çıkarılan embriyoların sayısı not edilip, yarısı %4'lük +4°C sıcaklıkta yeni hazırlanmış paraformaldehit solüsyonu içerisinde immersiyon fiksasyonu sağlanıp immünohistokimya işleminde kullanılana kadar buzdolabında +4°C'de saklanmıştır. Diğer yarısının ise ivedilikle tüm beyin dokuları mikrocerrahi alet yardımıyla çıkarıldıktan sonra uygun boyuttaki ependorf tüplerine alınarak western-blot analizinde kullanılmak üzere protein izolasyonu yapılarak analizde kullanılana kadar -80°C'lik derin dondurucuda muhafaza edilmiştir.

Fiksatif içerisindeki tüm haldeki E17'lk embriyoların, iki günlük fiksasyondan sonra hassas terazide ağırlıkları ölçülmüştür. Bu işlemden önce her bir embriyo kağıt peçete yardımıyla kurutularak içerisine filtre olmuş fiksatif sıvısının ağırlık ölçümünü etkilemesinin önüne geçilmiştir. Ağırlıkları llen embriyoların uygun mikrocerrahi yaklaşım ile tüm haldeki beyin dokuları çıkarılıp yukarıda tarif edildiği üzere ağırlıkları ölçülerek not edilmiştir. Ağırlık lmnden sonra E17'lk embriyo vücutları ve beyinleri her iki haftada bir fiksatif solüsyonu tazelenmek koşuluyla uygun büyüklükteki cam tüpler içerisinde immunohistokimyasal olarak kullanılana kadar +4°C'de muhafaza edilmiştir.

3.4. iftleştirme Paradigması

iftleştirme işleminde ME Tıp Fakültesi Deneyle Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nın sağladığı, daha önce çiftleştirme işlemine hiç sokulmamış, ortalama ağırlığı

20g olan 3 aylık dişi ve üremesi verimli olan damızlık erkek C57BL6/J altsoy fareler kullanılmıştır.

Çiftleştirme işlemi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'nın üretim odasında, karanlık evresinin başlangıcında yalnız olarak barındırılan damızlık erkek fare kafeslerine ikişer dişi farenin iki saat süreyle bırakılmasıyla gerçekleştirilmiştir. İki saatlik çiftleştirme işlemi sonunda dişi fareler vajinal plak için kontrol edilip, kontrolünde vajinal plak görülen dişi fareler embriyonik sıfırıncı gün (E0) olarak gebe kabul edilmiş ve ağırlıkları ölçülerek sıvı diyet uygulamasına alınana yani E7'ne kadar ayrı kafeslerde barındırılmıştır.

3.5. Kuyruk Kanı Örneği Elde Edilişi

Kan alma işlemi için ayrı bir grup fare (n=8) Alc grubuna uygulanan deney paradigmasında işleme sokulmuştur. Gebeliğin E7, E10 ve E15'leri kan alma günleri olarak tasarlanmıştır. Uygun gebelik gününde her bir fareden kuyruk kanları alkol diyeti verildikten iki (12:00) veya altı (16:00) saat sonra aşağıda açıklanan protokole uygun şekilde toplanmıştır. Kan alma işleminde kullanılan dişi farelerin embriyoları bu işlemin yaratacağı stres faktörünün gebelik üzerindeki olumsuz etkisini elimine etmek amacıyla değerlendirmeye alınmamıştır. Her bir fareden 30µL kan toplanmıştır. Bu işlem için; MEÜ Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Araştırma Laboratuvarı'ndan sağlanan farelere özel mekanik sabitleştirici aleti kullanılarak fare kibarca fikse edilmiştir. Daha sonra ılık su ve lamba yardımıyla kuyruğun köküne yakın lateral kuyruk venlerinin dilatasyonu ve aydınlatılması sağlanmıştır. Bu şekilde venlerin dilatasyonu sağlandıktan sonra, 25-30G çapında iğneyle kuyruk venine girilmiş ve gelen damlaya kapiller tüp sokularak kapilleriteyle kan toplanmıştır. Kuyruk tabanına lastik bandaj uygulanarak kanın alınması kolaylaştırılmıştır. Bu işlemin hemen ardından kuyruktaki kanamanın en kısa sürede durdurulması sağlanmış ve deney faresi daha önce barındırılmakta olan kafesine geri bırakılmıştır. Elde edilen kan örnekleri, +4°C'de 3000 rpm hızda 10 dakika santrifüj edilerek kan plazma bileşeni ayrıştırılmış ve işleme alınana kadar -80°C'de muhafaza edilmiştir.

3.5.1. Kan Alkol Seviyesi Ölçümü

Elde edilen kan plazma örneklerinin alkol ölçüm analizi MEÜ Fen Fakültesi Kimya Bölümü'nde gaz-kromatografik olarak miligram/desilitre (*mg/dl*) cinsinden gerçekleştirilmiştir. Buna göre 12:00 grubu farelerin kan alkol konsantrasyon seviyeleri $105,63 \pm 13,69$ mg/dl ve 16:00 grubunun ise $138,60 \pm 22,24$ mg/dl olarak ölçülmüştür. Elde edilen kan alkol değerleri Fetal Alkol Spektrum Bozuklukları'nı farede modellemek için beklenen yeterli seviyeye ulaştığı görülmüştür.

3.6. Histolojik İşlemler

Chow, PF ve Alc gruplarından 2'şerli kombinasyonlarda (*Chow-PF, Chow-Alc ya da PF-Alc olacak şekilde*) E17 beyin dokuları, %10'luk sıvı jelatin solüsyonu bulunan plastik kalıpların içerisine rostrokaudal ve dorsoventral düzlemde çok dikkatli biçimde yerleştirilip +4°C'de yarım saat süreyle sıvı jelatinin katılaşması sağlanmıştır. İçerisinde iki beyin dokusuyla gömülü bulunan katılaşmış haldeki jelatin blok plastik kalıptan dikkatlice sıyrılarak ayrılmıştır. Daha sonra jelatin blok %4'lük +4°C sıcaklıkta yeni hazırlanmış paraformaldehit solüsyonu içerisinde en az 48 saat boyunca fikse edilip bloğun kesit alma işlemine hazır hale gelmesi sağlanmıştır. Yeterli derecede fikse olmuş jelatin bloklar titreşimli vibratom aletine yerleştirilerek blok içerisindeki E17 beyin dokularından 40µm kalınlığında koronal kesitler alınmış ve kesitler +4°C'de 0,1M fosfat tamponu (*PBS*) içerisinde immünohistokimya işlemi gerçekleştirilene kadar muhafaza edilmiştir.

3.7. İmmünohistokimyasal Boyama

Çalışmamızda hedef proteinlerin E17 beyin dokularındaki ekspresyonlarının olup olmadığını, eğer varsa beyindeki lokalizasyonunu ve boyanma derecesini semi-kantitatif olarak belirlemek amacıyla her bir proteine özel ticari olarak elde ettiğimiz primer antikor kullanılmıştır. İmmünohistokimyasal tüm boyamalar aşağıdaki standart protokole uygun olarak gerçekleştirilmiştir.

3.7. 1. Boyama Protokolü

İmmünohistokimya işlemi tüm dünyada temel tıp bilimleri alanında çeşitli disiplinlerden birçok araştırmada dokuda protein ekspresyonunu belirlemek amaçlı kullanılan oldukça temel bir metottur. Bu boyama işleminin ardı sıra birçok basamağı olmakla birlikte her bir aşamada çeşitli kimyasalların kullanılması gerekmektedir. Özellikle kullanılması şart olan primer ve sekonder antikörlerin spesifikliğı, boyanma kalitesini ve tutarlılığını belirleyen en önemli unsur olmaktadır.

Bu metodu kullanan araştırmacıların bir kısmı, gerekli antikörleri kendi laboratuvarlarında sentez etmelerine rağmen, diğer birçok araştırmacı gerekli tüm kimyasalları ticari olarak elde etmektedir. Biyomedikal piyasasında immünohistokimya sarfları sağlayan birçok üretici firma bulunmaktadır. Örneğın belirli bir proteine spesifik dizayn edilmiş primer antikoru birçok firmadan elde etmek mümkün olmaktadır. Fakat her üretici firma aynı antikoru farklı şekillerde üretebilmekte ve aslında kimyasal olarak aynı diziyi temsil eden farklı üreticilere ait antikörler birbirlerinden farklı sonuçlar verebilmektedir. Bu nedenle planlanan çalışmadan tutarlı ve yüksek kalitede sonuç alınabilmesi için spesifik çalışan ve literatürde kabul gören bir antikoru kullanmak oldukça önem taşımaktadır. Ayrıca yeteri kadar özelleşmiş olmayan bir antikorum kullanılması, hem zaten oldukça pahalı olan bu sarf malzemeleri için harcanan paranın boşa gitmesi hem de araştırmacının değerli vaktini boşa harcamasına yol açmaktadır. Bu nedenlerden ötürü çalışmamızda kullanılmış olan tüm kimyasal sarf malzemeleri, literatür tarafından kabul görmüş yüksek kalitedeki araştırmalarda birçok kere kullanılmış olanlar arasından seçilmiştir.

Buna rağmen ticari olarak elde edilen her bir antikorum yüksek kalitede çalışıp çalışmadığı ve spesifiklik derecesi farklı konsantrasyonlar kullanılarak ve negatif kontroller oluşturularak optimum boyanma koşulları en az iki pilot boyama protokolü uygulanarak birbirlerine eş 3 farklı doku üzerinde belirlenmiştir. Tüm bu işlemlere rağmen beklenen kaliteye ulaşmayan hiçbir kimyasal çalışmamızda kullanılmamıştır.

Kesitler sırasıyla aşağıdaki işlemlerden geçirilmiştir:

- 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 2 saat bloklanır.
- Uygun primer antikorun bloklama solüsyonu içerisinde optimum dilüsyonuyla 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 (*5-10 dakikalık süreç boyunca kesitler mikroskop altında optimum renk sağlanana kadar kontrol edilir*).
- 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 metilen yeşili (*counterstaining*) ile boyandıktan sonra lamel ile kapatılır.

3.8. Western Blot Analizi

Çalışmamızda Chow, PF ve Alc grupları E17 tüm beyinlerindeki MeCP2 protein ekspresyonunun semi-kantitatif olarak karşılaştırılması amacıyla Western Blot yöntemi kullanılmıştır. E17 tüm beyinler 1,5ml'lik ependorf tüpleri içerisinde üzerine beyin ağırlığının (ortalama 50µg) yaklaşık 10 katı hacminde ticari olarak elde edilen 500µl RIPA tamponu (*radioimmunoprecipitation assay buffer*) ve proteaz inhibitörü kokteyli eklenerek mekanik doku öğütücüsü ile homojenize edilmiştir. RIPA tamponu içerisine eklemiş olduğumuz proteaz inhibitörü proteinlerin yıkılmasına neden olabilecek proteazların aktivitesini inhibe etmek amacıyla koyulmuştur. Homojenizasyon mutlaka buz içinde yapılmış olup RIPA

tamponu ile doku tamamen karışıp, krema haline gelinceye kadar öğütme işlemi devam ettirilmiştir. Homojenizasyonu takiben elimizdeki doku kokteyli, dokunun proteinli kısmını ayırtmak amacıyla 14000 RPM'de, +4°C derecede, 15 dakika merkezkaç ettirilmiştir. Oluşan süpernatantın bir kısmı Bradford yöntemine göre protein tayini amacı ile kullanılmış diğer kısmı ise Western blot analizinde kullanılmak üzere -80°C derin dondurucuda saklanmıştır.

Daha sonra Bradford yöntemi kullanılarak spektrofotometre ile protein abzorbanı ölçülmüştür. Bunun için 50µl örnek (5µl süpernatant 45µl distile su ile 10 kat seyreltilmiştir) güzelce karıştırılarak mikroküvete aktarılmış ve üzerine Bradford protein assay solüsyonu eklenmiştir. Sonra elimizdeki protein kokteyli karışımının protein konsantrasyonu 595 nm'deki abzorban değerleri spektrofotometre yöntemiyle belirlenmiştir.

Western blot uygulamasına başlandığında ilk olarak %8'lik SDS poliakrilamid jel hazırlanarak önceden kasete yerleştirilmiş olan camların arasına dökülmüştür. Jelin havayla temasının önlenmesi için üzerine bir miktar 1-bütanol dökülerek alt jelin polimerleşmesi için 45 dakika beklenmiştir. Bu aşamanın ardından iki cam arasındaki bütanol dökülerek bölme distile su ile yıkanmıştır. Daha sonra üst jel hazırlanmış ve polimerize olmuş alt jelin üzerine dökülmüştür. Üst jelin polimerize olması için yaklaşık 30-45 dakika beklendikten sonra taraklar çıkarılmıştır. Analizi yapılacak protein örnekleri 1:1 oranında 2X Laemmli buffer (Tris-HCl 0,125 M, SDS 0,14 M, gliserol %20, bromofenol mavisi 0,03 mM, 2-merkaptoetanol 0,2 mM) ile dilüe edilmiş ve 95-100°C'de kaynayan suda 5 dakika süresince kaynatılmıştır. Hücre lizatları dereceli otomatik pipet ile jeldeki kuyucuklara Bradford yöntemi ile yapılan hesaplama göre uygun miktarda protein (ortalama 40µg) olacak şekilde yüklenmiştir. Elektroforez tankı içerisine yürüme solüsyonu (100 ml 10X yürüme tamponu [0,025 M Tris base, 0,192 M glisin, % 0,1 SDS], 900 ml distile su) doldurularak dikey doğrultuda elektroforez işlemi 30 volt sabit gerilimde başlatılmıştır. Yüklenen örneklerin üst jeli geçmesinin ardından elektroforez işlemi 120 volt sabit gerilimde devam ettirilmiştir. Elektroforez işlemi, bu amaçla hazırlanmış soğuk ortamda 4°C'de gerçekleştirilmiştir. İşaretleyici boya olarak kullanılan bromofenol mavisi jelin alt ucuna ulaştığında elektroforez işlemi sonlandırılmıştır.

Elektroforez işleminin bitmesinin ardından elektroblot uygulamasına başlanmıştır. Elektroblot solüsyonu (100ml 10X yürüme tamponu +700ml distile su + 200ml metanol) ile doldurulmuş tank içerisinde +4°C'de 18 saat süresince 90 miliamper sabit akım şiddetinde transfer işlemi yapıldıktan sonra jel tutucu kaset açılarak membran çıkarılmıştır. Bunun

ardından membran üzerinde oluşabilecek non-spesifik protein bağlanmasını önlemek amacıyla membranlar oda ısısında 1 saat süresince bloklama solüsyonunda (%5 oranında yağsız süt tozu ve %0,2 oranında Tween-20 içeren Tris solüsyonu) bloklanmıştır. Daha sonra membranlar TBS-T (%0,05 Tween-20 içeren Tris solüsyonu) ile 3 defa 5'er dakika yıkanmıştır. Yıkama işlemi bitince membranlar hedef nükleer protein olan MeCP2 proteinine karşı rabbit anti-MeCP2 ve internal kontrol olarak kullanılacak GAPDH proteinine karşı mouse-anti-GAPDH primer antikoru ile üretici firmanın önerdiği oranlarda kullanılarak 4°C'de en az 18 saat süreyle inkübe edilmiştir. İnkübasyon işleminin ardından membranlar TBS-T solüsyonu ile 6 kez 5'er dakika yıkanmıştır. Bu aşamadan sonra primer antikora bağlanacak olan bu primer antikora özgül HRP (horseradish peroksidaz) enzimi ile konjuge sekonder antikora (üreticinin önerdiği oranlarda) 2 saat inkübe edilmiştir. Membranlar 6 defa 5'er dakika TBS-T solüsyonu ile yıkandıktan sonra görüntüleme solüsyonu (*chemiluminescence solution*) ile 2-10 dakika süresince dijital görüntüleme sistemi karanlık kabininde muamele edilmiş ve antikorun bağlandığı bölgelerde oluşmuş olan floresan ışımının bant şeklindeki görüntüleri Image J (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*) yazılımı ile analiz edilmiştir.

3.9. Densitometrik Görüntü Analizi

Chow, PF ve Alc gruplarına ait E17'ye ait frontal serebral korteks bölgesindeki NeuN, MeCP2, 5-mC ve 5-hmC nükleer protein ekspresyonları, immünohistokimyasal boyanma yoğunlukları açısından densitometrik olarak semi-kantitatif karşılaştırması gerçekleştirilmiştir. Bu işlem için, her ayrı antikor için üç farklı deney grubundan en az 5 farklı örnek aynı immünohistokimya protokolünde birlikte boyanmıştır. Tüm örneklerin aynı anda işleme sokulması immünohistokimyasal densitometrik karşılaştırma için ön şart kabul edilmiştir. Bunun sebebi ise immünohistokimyasal boyanmanın oluştuğu son basamak olan renk reaksiyonunun birkaç dakikada bile boyanma yoğunluğunu önemli ölçüde değiştirebilmesinden ve bu farklılıktan dolayı görüntü analizi aşamasında aslında olmayan ekspresyon farklılıklarının ortaya çıkabilmesinden kaynaklanmıştır. Bu nedenle deney gruplarımıza ait tüm kesitler tek seferde aynı süreyle renk reaksiyonuna maruz bırakılmıştır. Densitometrik analiz E17 beyinlerin frontal serebral korteksinin rostrakaudal hatta birbirine denk bölgelerinin görüntüleri üzerinde gerçekleştirilmiştir. Birbirine eş bölgeleri belirlemek

için corpus callosum ve lateral ventrikül bölgeleri anatomik referans olarak kullanılmıştır. Buna göre corpus callosum'un kontralateral beyin hemisferine orta hattın geçişi yapıldığı ve aynı zamanda lateral ventrikül boşluklarının birbirlerine eş olduğu bölgeler görüntüleme için kullanılmıştır. Bütün fotoğraflar Spot RT renkli kamera ataçmanlı Leitz Orthoplan2 mikroskop kullanılarak elde edilmiştir. Parlak-alanlı görüntüler her antikora uygun kurulum ve ışık zamanına göre alınmıştır. İmmünohistokimyasal boyalı görüntüler 16-bit renk formatına dönüştürülmüştür. Kalibrasyon ayarı 256 seviyeli gri skalaya göre yapılmıştır. Görüntüsü alınan koronal beyin kesitlerinde Image J (*National Institutes of Health, Bethesda, MD*) yazılımı kullanılarak frontolateral serebral kortekste cortical plate (CP), subplate (SP) ve ventricular zone (VZ) neokortikal tabakalarını kapsayan 150µm genişliğinde alanlar çizilmiştir. Daha sonra bu alanlardaki her bir hücrenin nükleuslarının periferleri aynı yazılımın ilgi alanı (*ROI-region of interest*) aracının serbest el (*free hand tool*) seçeneği ile çevrelenerek boyanma yoğunlukları ölçülmüştür. Her bir nükleusun gri skalaya göre ölçülen boyanma piksel yoğunluk değerleri; 0-30 = 0 (boyanma yok), 30-60 = 1 (*az boyanma*), 60-90 = 2 (*orta boyanma*), 90-120 = 3 (*orta üzeri boyanma*) ve 120-150 = 4 (*kuvvetli boyanma*) olacak şekilde skorlanmıştır. Bunun sonucunda her bir kesit için az boyanan hücrelerin yüzdesi x 1 +, orta boyanan hücrelerin yüzdesi x 2 +, iyi boyanan hücrelerin yüzdesi x 3 +, çok iyi boyanan hücrelerin yüzdesi x 4 denklemi ile 0-400 arasında bir immünohistokimyasal H Skoru elde edilmiştir. Elde edilen H Skorları Chow, PF ve Alc grupları arasında non-parametrik olarak karşılaştırılmıştır (*ayrıntıları istatistiksel analiz bölümünde verilmiştir*). Western blot analiziyle Chow, PF ve Alc gurubu ile E17'ne tüm beyinlerindeki MeCP2 proteinin ekspresyon farklılıkları elde edilen protein ekspresyonuna ait ekspresyon farklılıkları, birbirine eşit GAPDH internal kontrol proteinin ekspresyon yoğunluğuna göre ayarlanmıştır. Blotlama ertesinde chemiluminiscence renk reaksiyonu sonucu nitroselüloz membran üzerinde oluşan protein ekspresyonunu temsil eden bantların, immünohistokimyasal densitometrisinde kullanılan aynı görüntü analiz yazılımı kullanılarak boyanma yoğunlukları belirlenmiştir. Chow, PF ve Alc gruplarına ait bantların boyanma yoğunlukları oransal olarak karşılaştırılmıştır.

3.10. İstatistiksel Analiz

Çalışmamızda parametrik ve non-parametrik olmak üzere iki farklı istatistiksel analiz yapılmıştır. Parametrik olarak Chow, PF ve Alc grupları arasındaki farklılıklar; maternal ağırlık değişimleri, E17 embriyo vücut ve beyin ağırlıkları, western blot protein ekspresyon değişimleri one-way ANOVA testi kullanılarak belirlenmiştir. Fark elde edilen değişken bakımından hangi gruplar arasında fark olduğunu görmek için ise LSD post-hoc testi kullanılmıştır. Chow, PF ve Alc gurupları arasındaki immünohistokimya ile tayin edilen protein ekspresyon patern skorları açısından karşılaştırmak için Kruskal Wallis testi kullanılmıştır. Fark elde edilen değişken bakımından hangi gruplar arasında fark olduğunu görmek için ise Conover post-hoc testi kullanıldı. Analizler MedCalc v. 12.3.0 paket programıyla yapılmıştır.

3. 11. Kullanılan Araç ve Gereçler

3.11.1. Kullanılan Cihazlar

- Gaz Kromatografisi (Agilent)
- Spektrofotometre (Sigma)
- Elektroforez Sistemi (BioRad)
- Transblot Elektroforetik Transfer Sistemi (BioRad)
- Elektroforez Güç Kaynağı (BioRad)
- Membran Görüntüleme Sistemi (ImageQuant)
- -86 °C Derin Dondurucu (New Brunswick Scientific)
- -20 °C Derin Dondurucu (Siemens)
- Buzdolabı (Simens)
- Titreşimli Vibratome Aleti (Leica)
- Işık Mikroskobu (Leitz Orthoplan2 Ernst Leitz GMBH)
- Diseksiyon Mikroskobu (Carl Zeiss)
- Mikroskoba Ataçlı Dijital Kamera (Diagnostic Instruments)
- Soğutmalı Mikrosantrifüj (Hettich-Universal)

- pH Metre Cihazı (Thermo)
- Güvenlik Kabini (Heraeus-HERA safe)
- Mikrodalga Fırın (Beko)
- Hassas Terazı (Sartorius)
- Vortex (Memmert)
- Su Banyosu (Memmert)
- Distile su cihazı (Nüve)
- Mikropipet Seti (Gilson-Pipetman)
- Isı bloğu (Techne)

3.12. Kullanılan Kimyasal Maddeler

3.12.1. Western Blot Sarfları

- Methanol (sigma 494437-2L)
- Ammonium persulfate (APS) (sigma A 3678)
- TEMED (Sigma T9281)
- Ponceau Solution (Sigma P-7170)
- Sample buffer laemmli 2x (Sigma S-3401)
- Protease Inhibitor Tablet (Sigma S8820-20TAB)
- Sodium dodecyl sulfate (Sigma L4390-100G)
- Resolving Gel Buffer (Bio-rad 161-0798)
- Stacking gel buffer (Bio-rad 161-0799)
- Extra Thick Blot Paper (Bio-rad 170-3957)
- Nitrocellulose Membrane (Bio-rad 162-0115)
- Precision plus protein dual colour standarts (Bio-rad 350000506)
- Acrylamide %40 Solution (Fishers, BP1408-1)
- ECL Plus Western Blotting Detection Reagents (Amersham-RPN2132)
- RIPA BUFFER (radio precipitation assay buffer) (Boston bioproducts BP-115)
- Restrore western blot stripping buffer (Pierce 21059)
- Tween-80 (Sigma P043)

3.12.2. İmmünohistokimya Sarfları

- Triton (Sigma X-100)
- Phosphate buffered saline tablet (Sigma P-4417)
- Tris Buffered Saline (Sigma-T5030)
- Hidroklorik asit (Sigma 920-01)
- Gliserol (Sigma G516)
- H₂O₂ (Sigma H6520)
- Borik asit (Merck K29935665 204)
- % 3'-3'-diaminobenzidine (DAB) (Sigma D5905)
- Methyl Green Certified (Sigma M 5015)
- Gelatin Type B (Fishers 9000-70-8)
- Normal Goat Serum (ImmunoResearch 005-000-121)
- Normal Donkey Serum (ImmunoResearch 017-000-121)
- Normal Donkey Serum (ImmunoResearch. 013-000-121)
- Peroxidase-conjugated Streptavidin (ImmunoResearch 016-030-084)
- Vectastain Elit Kit (VectorLab PK6100)
- Mouse on Mouse Basic Kit (VectorLab BMK2202)
- Rectangular Mold, size 22x30mm (EMS 70183)
- Square Mold, size 22x22mm (EMS 70182)
- F. Double Edge Stainless Steel Razor Blade (EMS 72000)
- Netwell Carrier Kit, 24 mm (EMS 64736-01)
- 2ml'lik sample vial (EMS 60992-02)
- Netwell 24 mm, Sterile 74µm (EMS 64743-00)

3.12.3. Kullanılan Antikorlar

- Anti-5-methylcytidine Primary Antibody (Eurogenetec ABIN308218)
- Anti-5-hydroxymethylcytosine Primary Antibody (Active Motif 39769)
- Anti-MeCP2 Primary Antibody (Cell Signaling 3456)
- Anti-Methyl binding protein 1 Primary Antibody (Santa Cruz sc-10751)

- Anti-Neun Primary Antibody (Millipore MAB377)
- Anti-Ki67 Primary Antibody (Abcam ab15580)
- Anti-P2Y1 Primary Antibody (Abcam ab85896)
- Anti-Tbr2 Primer Antikor (Abcam ab23345)
- Anti-GAPDH Primary Antibody (Sigma G9295)
- Anti- β Tubulin Primary Antibody (Santa Cruz sc-9104)
- Goat Anti-Rabbit IgG Secondary Antibody (ImmunoResearch 111-065)
- Horse Anti-Mouse IgG (Vector BA2000)
- Peroxidase Goat Anti-Rabbit IgG Antibody (Vector PI 1000)

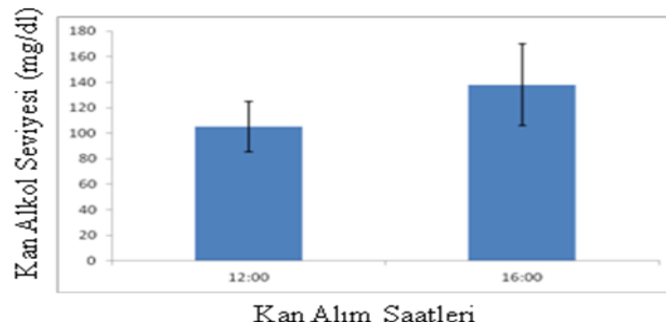
3.12.4. Sıvı Diyet Modeli için Kullanılanlar

- Micro-Stabilized Alcohol Rodent Liquid Diet (Test Diet LD 101A)
- Maltodextrin (Test Diet LD 104)
- Sükroz (Merck 1.07651)
- %95'lik etil alkol (Sigma E-285 USA)
- Steril Distile Su
- Graduated 30 ml. Feeding Tube 7.5" Height (Dyets 900012)
- Lipped Feeding Tube Holder (Dyets 901100)
- Fare Kafesi (Tecniplast 1290D)
- Filtre Kapaklı Sıçan Kafesi (Tecniplast 2000P)

4. BULGULAR

4.1. Kan Alkol Seviyesi Ölçümü

Çalışmamızda kullandığımız FASB deney modelinde C57BL6/J farelere uygulanan sıvı alkol diyetinin sistemik olarak kandaki alkol seviyelerini belirlemek amacıyla oluşturulan grupta (n=8) 3 ayrı deney gününde her bir fareden sıvı alkol diyetinin sunulduğu saat 10:00'dan 2 (12:00) ve 6 (16:00) saat sonra kuyruk kanları toplanmış ve kan plazma örneklerindeki kan alkol seviyeleri gaz kromatografisi kullanılarak miligram/desilitre (mg/dl) cinsinden hesaplanmıştır.



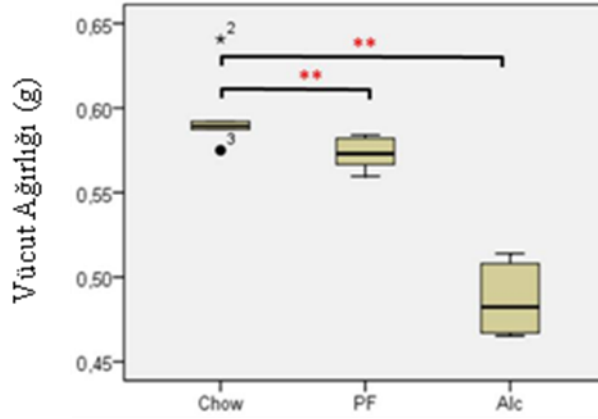
Çizelge 4.1. Gaz kromatografisi kullanılarak analiz edilen kan alkol değerleri saat 12:00 için 105mg/dl \pm 19 ve 16:00 için 138,6 mg/dl \pm 32 olarak görülmüştür.

4.2. Fenotipik Farklılıklar

Bu çalışmada oluşturduğumuz FASB hayvan modelinde gebe C57BL6/J farelere uyguladığımız alkol sıvı diyetinin, izole ettiğimiz E17 embriyoları tüm vücut ve beyinlerinde fetal büyüme geriliklerine yol açtığı gözlenmiştir.

4.2.1. Embriyonik Vücut Ağırlıklarındaki Değişimler

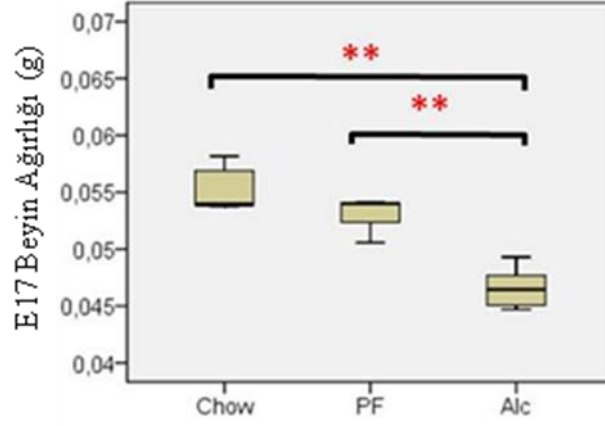
Chow, PF ve Alc grupları E17 tüm embriyo ağırlıkları ölçümleri Alc grubunda Chow ve PF gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğunu göstermiştir ($P < 0,005$). Chow ve PF grubu arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır ($P > 0,05$).



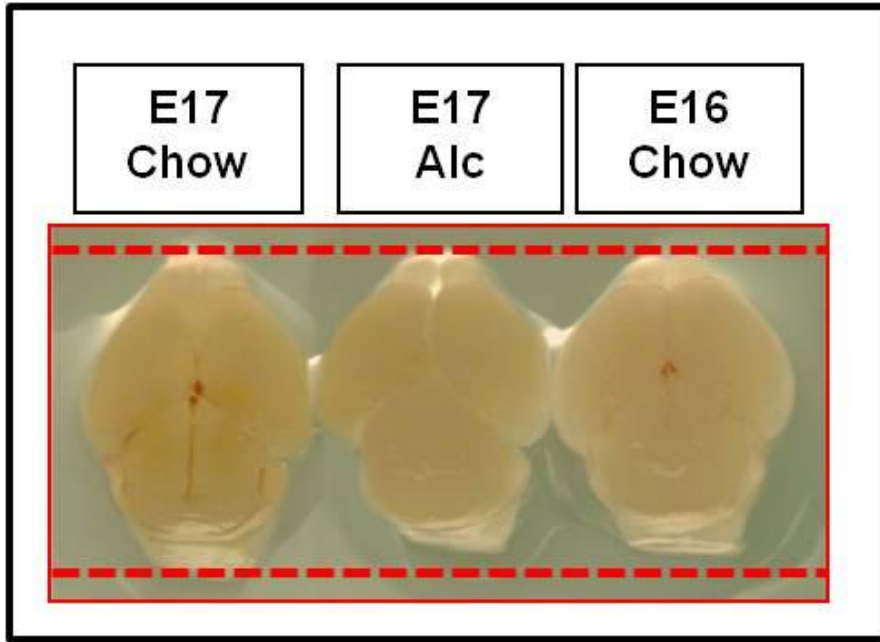
Çizelge 4.2. Chow, PF ve Alc grubu arasındaki E17 tüm vücut ağırlıklarının gram (g) cinsinden dağılımları sunulmuştur. One-way ANOVA testi üç grup arasında anlamlı fark olduğunu göstermiştir ($P < 0,005$). İkili gruplar arasında değişim olup olmadığının LSD post-hoc testiyle karşılaştırılması, Alc grubunun Chow ve PF grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük ($P < 0,005$) fakat Chow ve PF gruplarının birbirinden farklı olmadığını göstermiştir ($P > 0,05$) (Her bir grup için $n=5$) (** = $P < 0,005$).

4.2.2. Embriyonik Beyin Ağırlıklarındaki Değişimler

Chow, PF ve Alc grupları E17 tüm beyin ağırlıkları ölçümleri Alc grubunda Chow ve PF gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğunu göstermiştir ($P < 0,005$). Chow ve PF grubu arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır ($P > 0,05$).



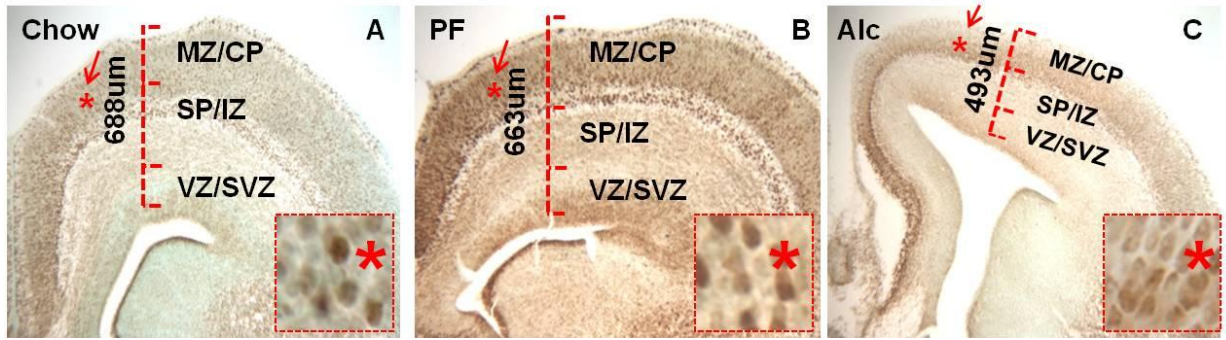
Çizelge 4.3. Chow, PF ve Alc grubu arasındaki E17 tüm beyin ağırlıklarının gram cinsinden dağılımları sunulmuştur. One-way ANOVA testi üç grup arasında anlamlı fark olduğunu göstermiştir ($P < 0,005$) . İkili gruplar arasında değişim olup olmadığının LSD post-hoc testiyle karşılaştırılması, Alc grubunun Chow ve PF grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük ($P < 0,005$) fakat Chow ve PF gruplarının birbirinden farklı olmadığını göstermiştir ($P > 0,05$) (Her bir grup için $n=5$) (** = $P < 0,005$).



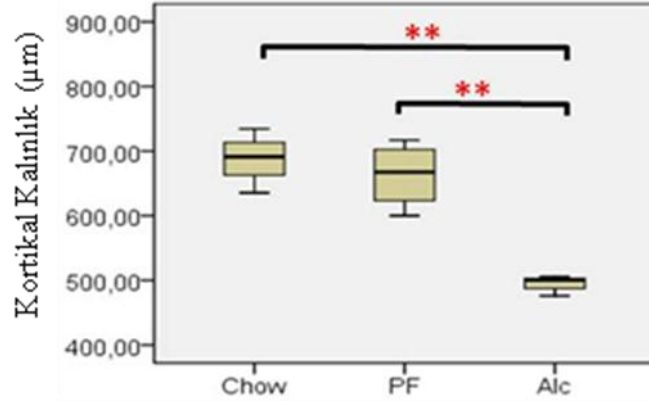
Şekil 4.1. Alc grubunda E17 tüm beyinde istatistiksel olarak gözlenen büyüme geriliğinin desteklenmesi amacıyla E17 Chow, Alc ve E16 Chow grubu tüm beyinlerinin görüntüsü birarada sunulmuştur. Şekildeki E17 Alc grubu beyninin rostrakaudal hatta E17 Chow grubu beynine oranla belirgin şekilde daha kısa fakat kendisinden bir embriyonik gün daha genç olan E16 Chow kontrol tüm beynine hemen hemen eşit olduğu gözlenmiştir.

4.2.3. Embriyonik Korteksteki Değişimler

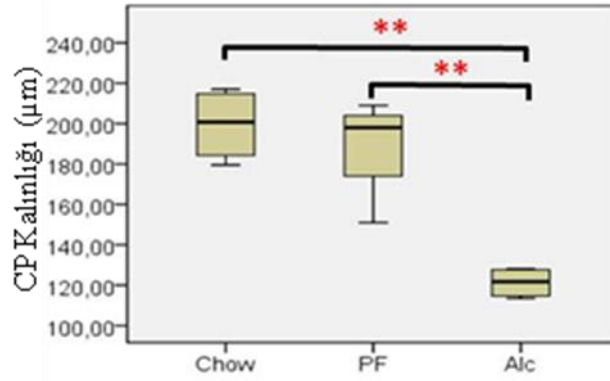
Chow, PF ve Alc grupları E17 frontal serebral korteks'inden alınan koronal histolojik kesitlerde korteks'in tüm ve cortical plate (CP) tabakasının uzunlukları μm cinsinden ölçülmüştür. Alc grubunda her iki ölçüm açısından da Chow ve PF gruplarına göre istatistiksel olarak anlamlı düşüş olduğunu gözlenmiştir ($P < 0,005$). Chow ve PF grubu arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır ($P > 0,05$).



Şekil 4.2. Chow, PF ve Alc grubu arasındaki E17 frontal serebral korteksinin X6'lık büyütmedeki koronal kesitleri görülmektedir (A-C). Her bir grubun ortalama korteks kalınlıkları mikro metre (μm) cinsinden sunulmuştur (A-C). Her bir fotoğrafın sağ alt köşesinde, kırmızı oklarla yıldızların işaret ettiği alanların X40'lık büyütmedeki görüntüsü sunulmuştur (A-C). Yüksek büyütmedeki görünüm, her üç gruptaki CP tabakasındaki hücre nükleuslarının morfolojisini göstermektedir. Chow ve PF grubu CP hücre nükleus şekillerinin yuvarlağa yakın ya da oval olduğu gözlenirken, Alc grubu nükleusların diğer iki gruptan farklı olarak mekik benzeri bir morfolojide olduğu saptanmıştır. Bu fotoğrafla temsil edilen hüresel görünüm her bir grup için 5 farklı sayıdaki ($n=5$) frontal korteksin genel morfolojisini yansıtmaktadır. CP (Cortical Plate), IZ (Intermediate Zone), MZ (Marginal Zone), SP (Subplate), SVZ (Subventricular Zone), VZ (Ventricular Zone).



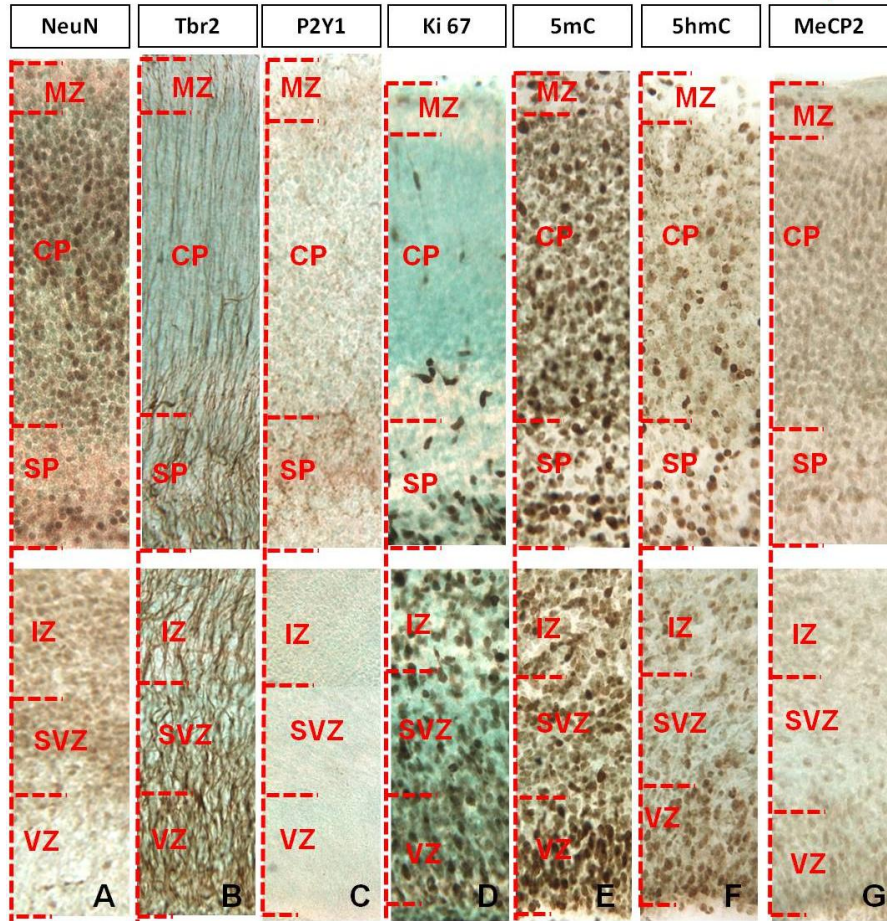
Çizelge 4.4. One-way ANOVA testi üç grup arasındaki frontal serebral korteksin μm cinsinden kalınlıkları arasında anlamlı fark olduğunu göstermiştir. İkili gruplar arasında değişim olup olmadığının LSD post-hoc testiyle karşılaştırılması, Alc grubunun Chow ve PF grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük ($P < 0,005$) fakat Chow ve PF gruplarının birbirinden farklı olmadığını göstermiştir ($P > 0,05$) (* *= $P < 0,005$) (Her bir grup için $n=5$).



Çizelge 4.5. One-way ANOVA testi üç grup arasındaki CP tabakasının μm cinsinden kalınlıkları arasında anlamlı fark olduğunu göstermiştir. İkili gruplar arasında değişim olup olmadığının LSD post-hoc testiyle karşılaştırılması, Alc grubunun Chow ve PF grubuna göre anlamlı düzeyde daha düşük ($P < 0,005$) fakat Chow ve PF gruplarının birbirinden farklı olmadığını göstermiştir ($P > 0,05$) (* *= $P < 0,005$) (Her bir grup için $n=5$).

4.3. DNA Metilasyonu ve Nöronal Markırlar

Çeşitli nöronal ve DNA metilasyonu markırları kullanılarak E17 frontal serebral korteks'inin nörogenezi sırasındaki DNA metilasyon dinamiklerinin görünümü sunulmuştur.



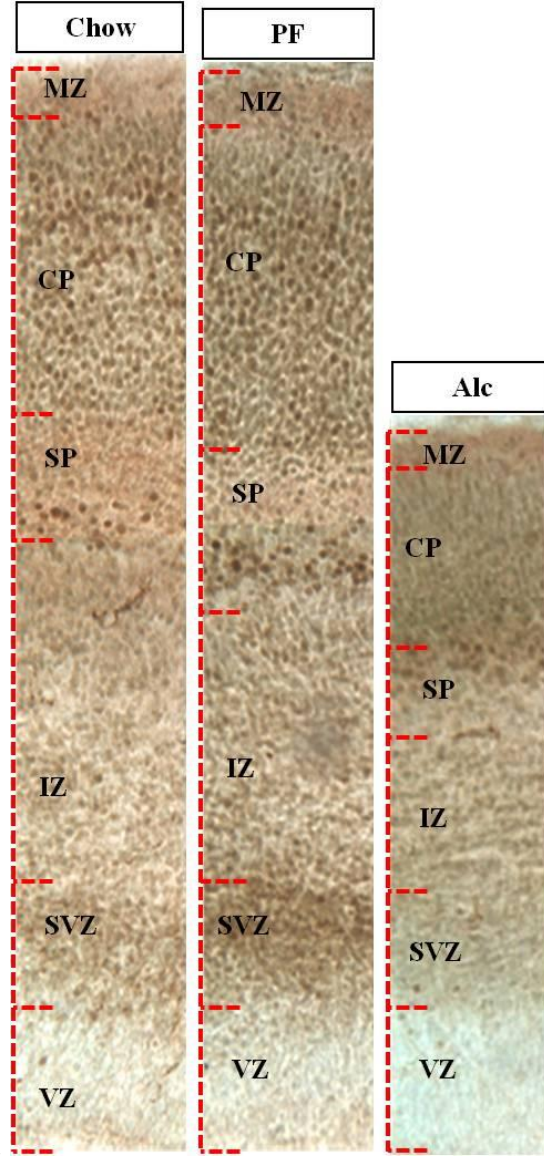
Şekil 4.3. Chow (kontrol) grubu E17 frontal serebral korteks'inde; olgun nöron için NeuN (A), ara nöronal progenitör hücreler (INP) için Tbr-2 ve P2Y1 (B,C), nöronal proliferasyon için Ki 67 (D) ve DNA metilasyonu 5mC, 5hmC ve MeCP2 (D-F) markır proteinlerinin immunohistokimyasal ekspresyonu korteks'in farklı tabakalarının 150 mm²'lik genişlikteki kolonlardaki ve X25'lik büyütmeleli representasyonu görülmektedir. Bu fotoğrafla temsil edilen görünüm; 5 farklı sayıdaki (n=5) E17 kontrol grubu serebral korteks'in her bir embriyonik tabakasındaki ilgili protein ekspresyonlarının genel dinamiklerini yansıtmaktadır. CP (Cortical Plate), IZ (Intermediate Zone), MZ (Marginal Zone), SP (Subplate), SVZ (Subventricular Zone), VZ (Ventricular Zone).

4.4. Nöronal Markır Boyama Sonuçları

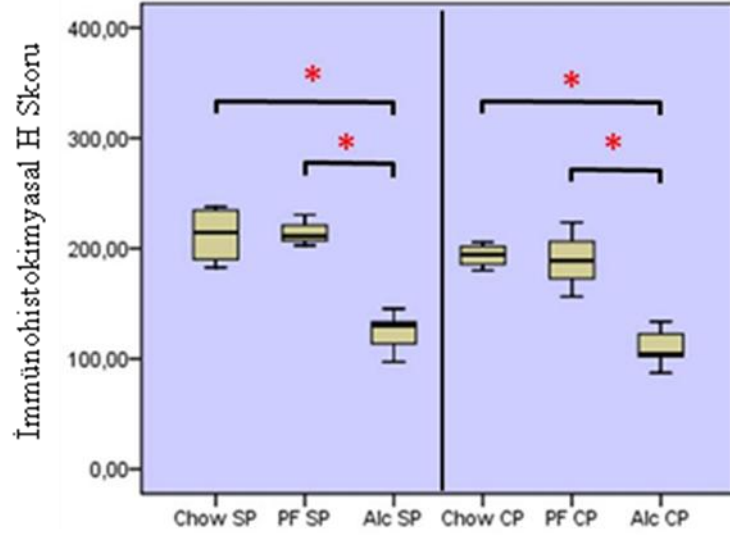
Serebral korteks'teki nörogenezin kontrol ve deney grupları arasında farklı olup olmadığını anlamak için değişik grup sinirsel hücrelere özel markır proteinlerinin ekspresyonları kalitatif ya da semi-kantitatif olarak immünohistokimya yöntemiyle belirlenmiştir.

4.4.1. NeuN Boyaması

Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral korteks'lerinin nöronal olgunlaşma durumunu belirlemek amacıyla, bu embriyonik beyin kesitleri üzerinde olgun nöronlara spesifik olan NeuN nükleer proteininin semi-kantitatif ekspresyonu immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir.



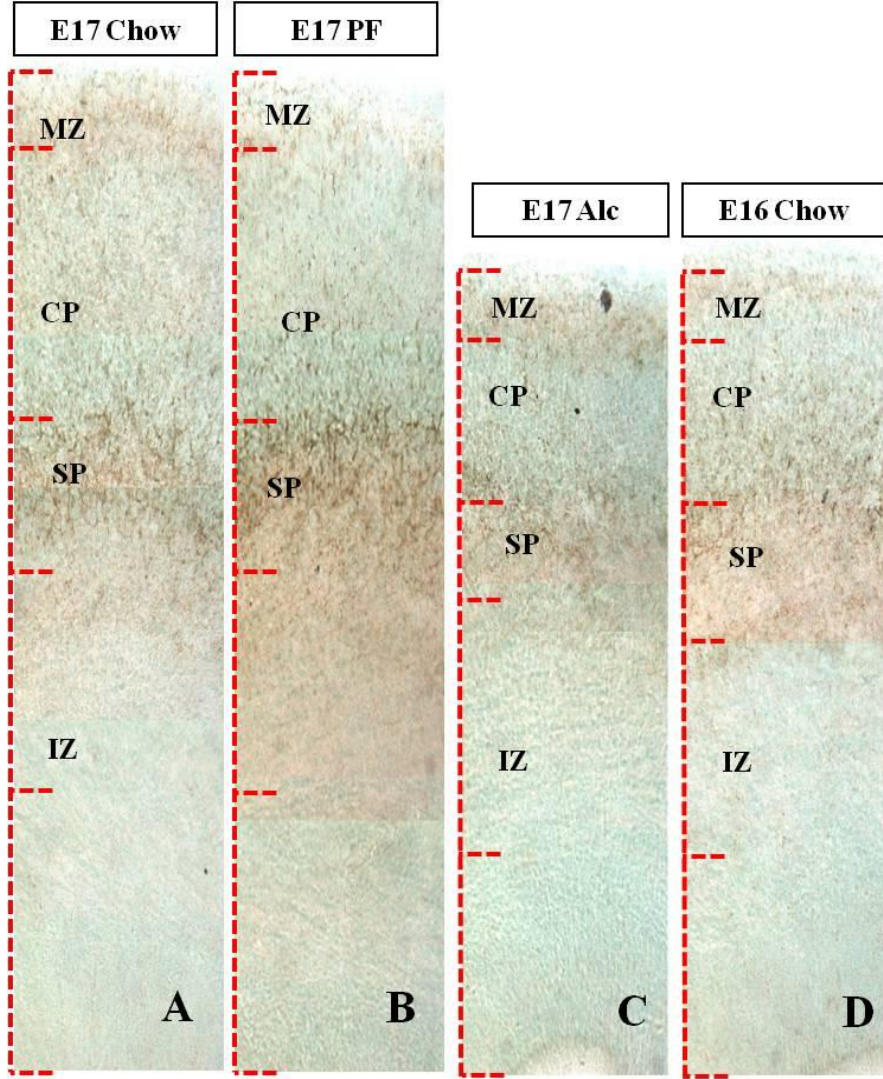
Şekil 4.4. Nükleer NeuN proteininin, Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral kortekslerinin radial ekseninde tüm uzunluğunu yansıtan X25'lik büyütmedeki kolonlarındaki ekspresyonu görülmektedir. (A-C). CP (Cortical Plate), IZ (Intermediate Zone), MZ (Marginal Zone), SP (Subplate), SVZ (Subventricular Zone), VZ (Ventricular Zone).



Çizelge 4.6. NeuN protein ekspresyonunun Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral kortekslerinin SP ve CP tabakalarındaki immunohistokimyasal H skoru biriminden densitometrik analizine ait değişim grafiği sunulmuştur. Non-parametrik Kruskal Wallis testiyle üç gruba ait SP ve CP embriyonik kortikal tabakalarının H skorları arasında anlamlı farklılıklar olduğu tespit edilmiştir ($P < 0,05$). İkili grupların Conover post-hoc testiyle karşılaştırılmasıyla Alc grubuna ait her iki kortikal tabakanın H skorlarının Chow ve PF gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0,05$) düşük olduğu ve Chow ve PF grupları arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0,05$) (* = $P < 0,005$).

4.4.2. P2Y1 Boyaması

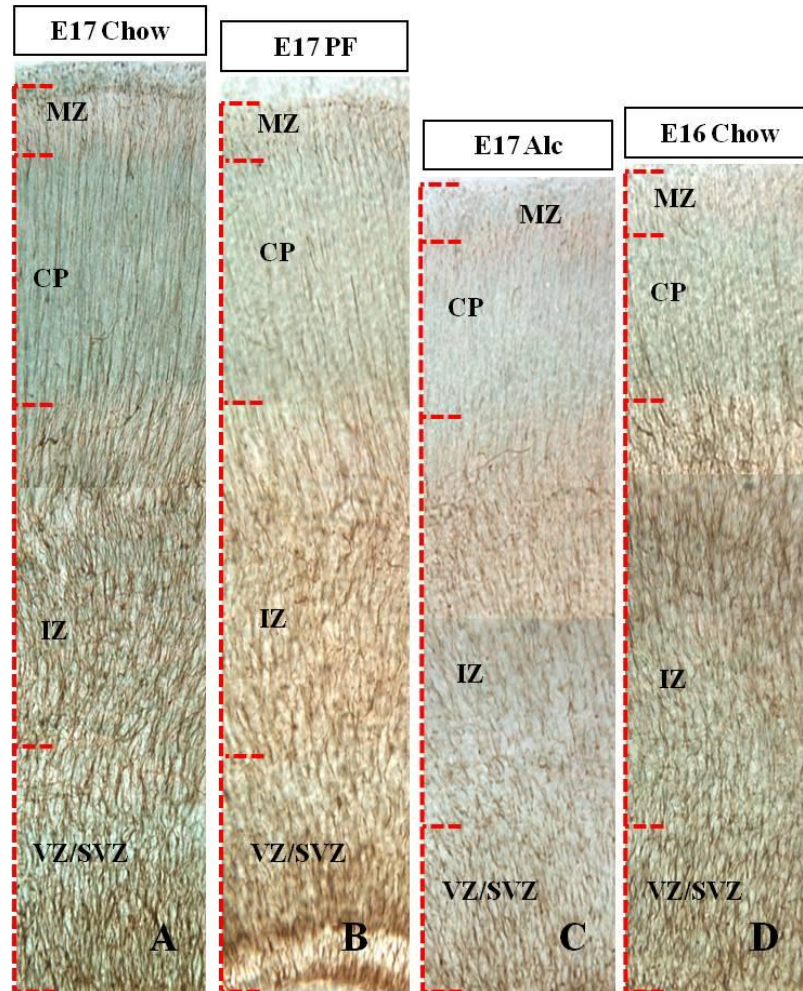
Chow, PF ve Alc grubu E17 ve ek olarak Alc grubuyla karşılaştırmak amacıyla embriyonik gelişimsel kontrol grubu olarak kullanılan E16 Chow frontal serebral kortekslerinde, göç eden ara nöronal progenitörlerine özel P2Y1 reseptör proteininin ekspresyonu kalitatif olarak belirlenmiştir.



Şekil 4.5. P2Y1 reseptör proteininin, Chow, PF ve Alc grubu E17 ve E16 Chow frontal serebral kortekslerinin radial ekseninde tüm uzunluğunu yansıtan X25’lik kolonlarındaki ekspresyonu görülmektedir (A-D). P2Y1 ekspresyonu tüm kortikal tabakalar içinde en çok SP tabakasında lokalize olduğu gözlenmiş olup, Alc grubu SP tabakasındaki ekspresyonunun E16 Chow’dakine benzer, E17 Chow ve PF gruplarına göre daha düşük olduğu kalitatif olarak görülmektedir. Bu fotoğrafla temsil edilen görünüm; E17 embriyonik yaş grubu için 5 ve E16 için 3 farklı sayıda serebral korteks’teki P2Y1 ekspresyonunun genel durumunu yansıtmaktadır. CP (Cortical Plate), IZ (Intermediate Zone), MZ (Marginal Zone), SP (Subplate), SVZ (Subventricular Zone), VZ (Ventricular Zone).

4.4.3. Tbr2 Boyaması

Chow, PF ve Alc grubu E17 ve ek olarak Alc grubuyla karşılaştırmak amacıyla embriyonik gelişimsel kontrol grubu olarak kullanılan E16 Chow frontal serebral korteks'lerinde, radial glia hücrelerine tutunmuş ara nöronal progenitörlerine özel Tbr2 reseptör proteininin ekspresyonu kalitatif olarak belirlenmiştir.



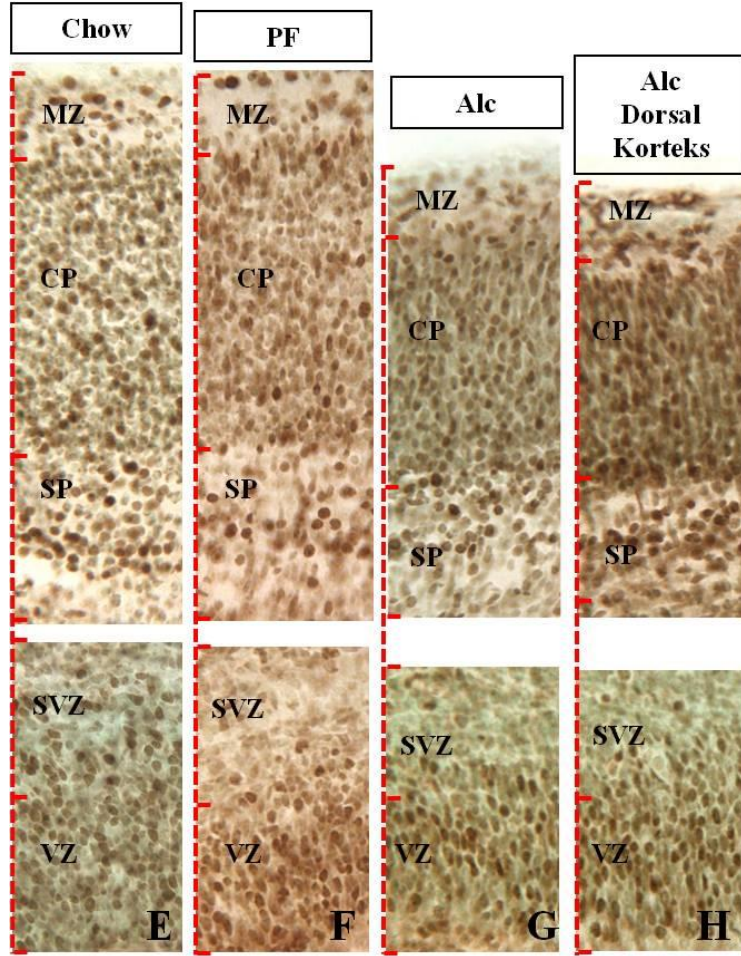
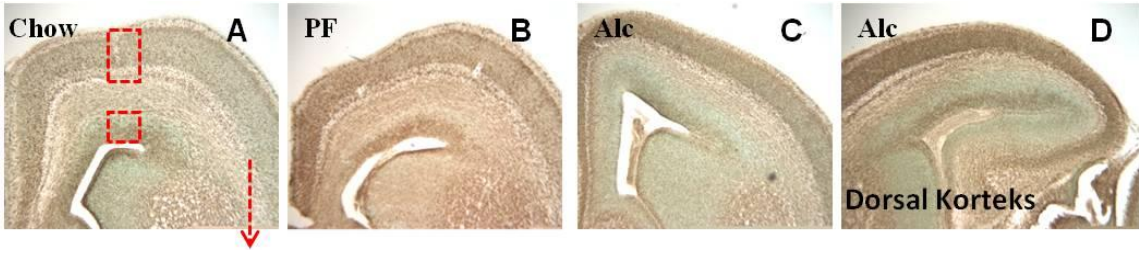
Şekil 4.6. Membran proteini olan Tbr2'nun, Chow, PF ve Alc grubu E17 ve E16 Chow frontal serebral korteks'lerinin radial ekseninde tüm uzunluğunu yansıtan X25'lik büyütmedeki kolonlarındaki ekspresyonu görülmektedir (A-D). Tbr2 protein ekspresyonu özellikle alt kortikal tabakalarda lokalize olduğu gözlenmiştir. Alc grubu Tbr2 ekspresyonununun E16 Chow, E17 Chow ve PF gruplarına göre daha düşük olduğu kalitatif olarak görülmektedir. Bu fotoğrafla temsil edilen görünüm; E17 embriyonik yaş grubu için 5 ve E16 için 3 farklı sayıda serebral korteks'teki P2Y1 ekspresyonunun genel durumunu yansıtmaktadır. CP (Cortical Plate), IZ (Intermediate Zone), MZ (Marginal Zone), SP (Subplate), SVZ (Subventricular Zone), VZ (Ventricular Zone).

4.5. DNA Metilasyon Markır Boyamaları

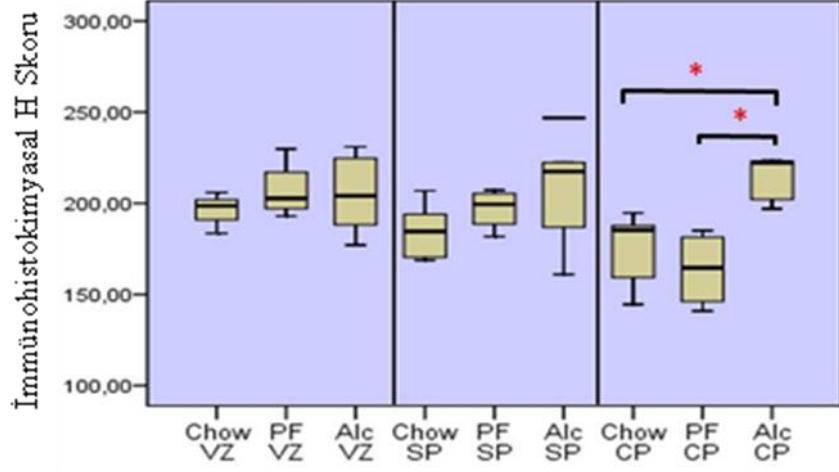
Serebral korteksteki DNA metilasyon dinamiklerinin kontrol ve deney grupları arasında farklı olup olmadığını anlamak için DNA metilasyonunun değişik aşamalarını temsil eden markır proteinlerinin semi-kantitatif ekspresyonları immunohistokimyasal ya da western blot yöntemleriyle belirlenmiştir.

4.5.1. 5mC Boyaması

Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral korteks'lerinde birincil DNA metilasyonun durumunu belirlemek amacıyla, bu embriyonik beyin kesitleri üzerinde 5mC nükleer proteininin semi kantitatif ekspresyonu immünohistokimyasal olarak belirlenmiştir.



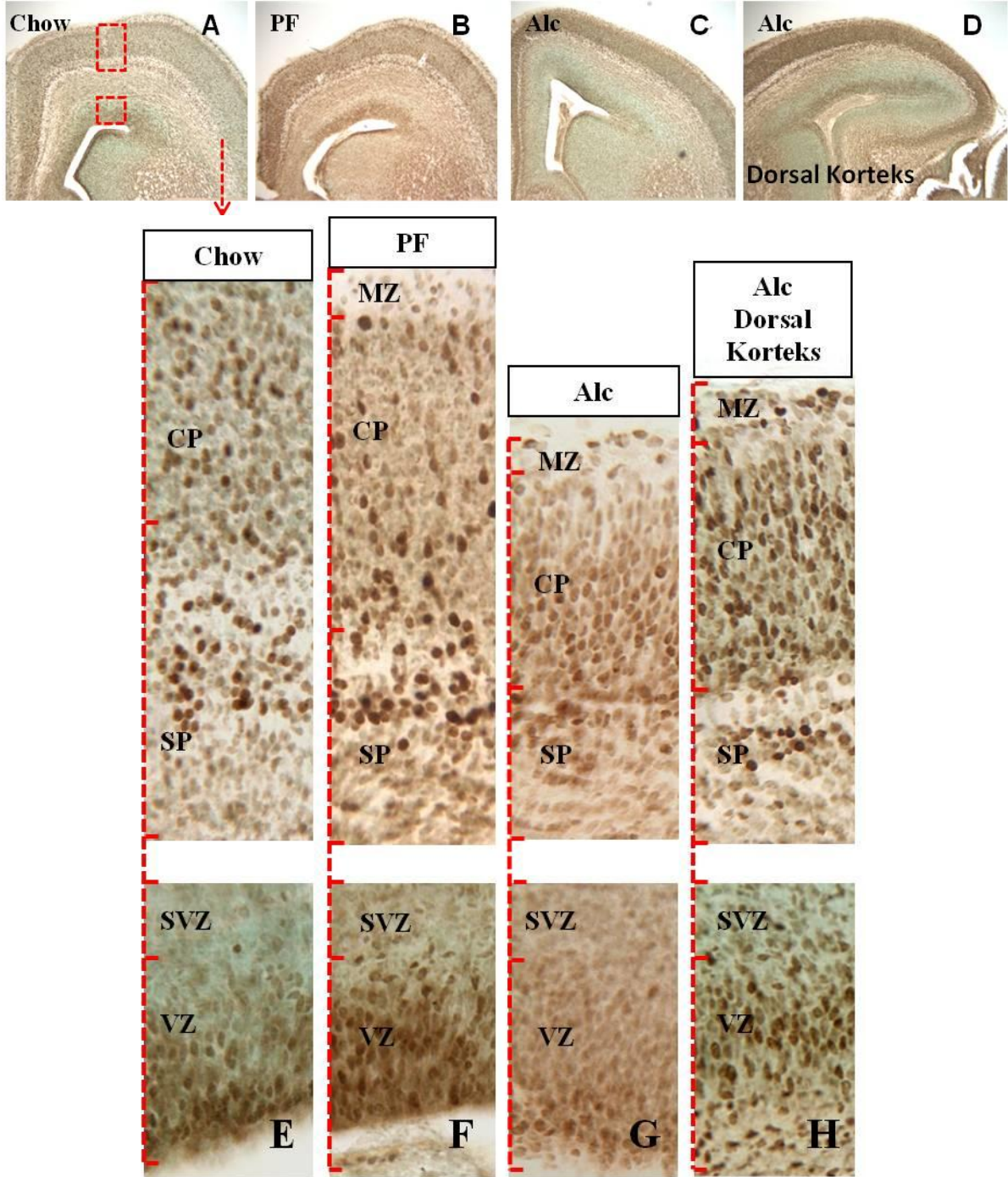
Şekil 4.7. 5mC protein ekspresyonu, Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral ve E17 Alc dorsal serebral korteks'lerinin tek bir hemisferinin X6'lık büyütmedeki koronal (A-D) ve bu hemisferlerin IZ tabakası hariç radial uzunluğunu boyunca diğer kortikal tabakaları içeren X25'lik büyütmedeki kolonlarındaki durumu görülmektedir (E-H). CP (Cortical Plate), IZ (Intermediate Zone), MZ (Marginal Zone), SP (Subplate), SVZ (Subventricular Zone), VZ (Ventricular Zone).



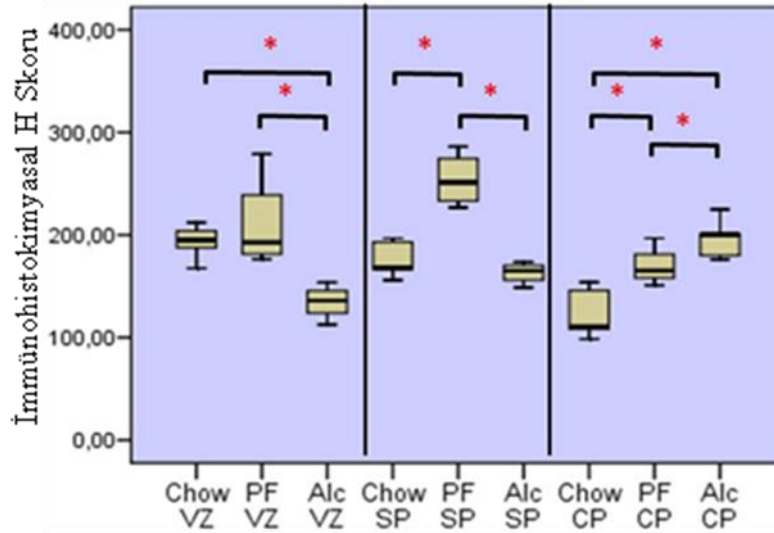
Çizelge 4.7. Görünümü Şekil 4.7.'de verilmiş olan 5mC protein ekspresyonunun Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral korteks'lerinin VZ, SP ve CP tabakalarındaki immunohistokimyasal H skoru biriminden densitometrik analizine ait değişim grafiği sunulmuştur. Non parametrik Kruskal Wallis testi, her bir guruptaki üç farklı embriyonik kortikal tabakaya ait H skorları açısından sadece CP'de anlamlı bir değişkenlik tespit etmiştir ($P < 0.05$). CP tabakasına ait H skorların ikili gruplar arasında Conover post-hoc testiyle karşılaştırılması, Alc grubunun Chow ve PF gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) şekilde daha yüksek olduğu ve Chow ve PF grupları arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0,05$) (*= $P < 0.05$).

4.5.2. 5hmC Boyaması

Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral korteks'lerinde ikincil DNA metilasyonun durumunu belirlemek amacıyla, bu embriyonik beyin kesitleri üzerinde 5hmC nükleer proteininin semi kantitatif ekspresyonu immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir.



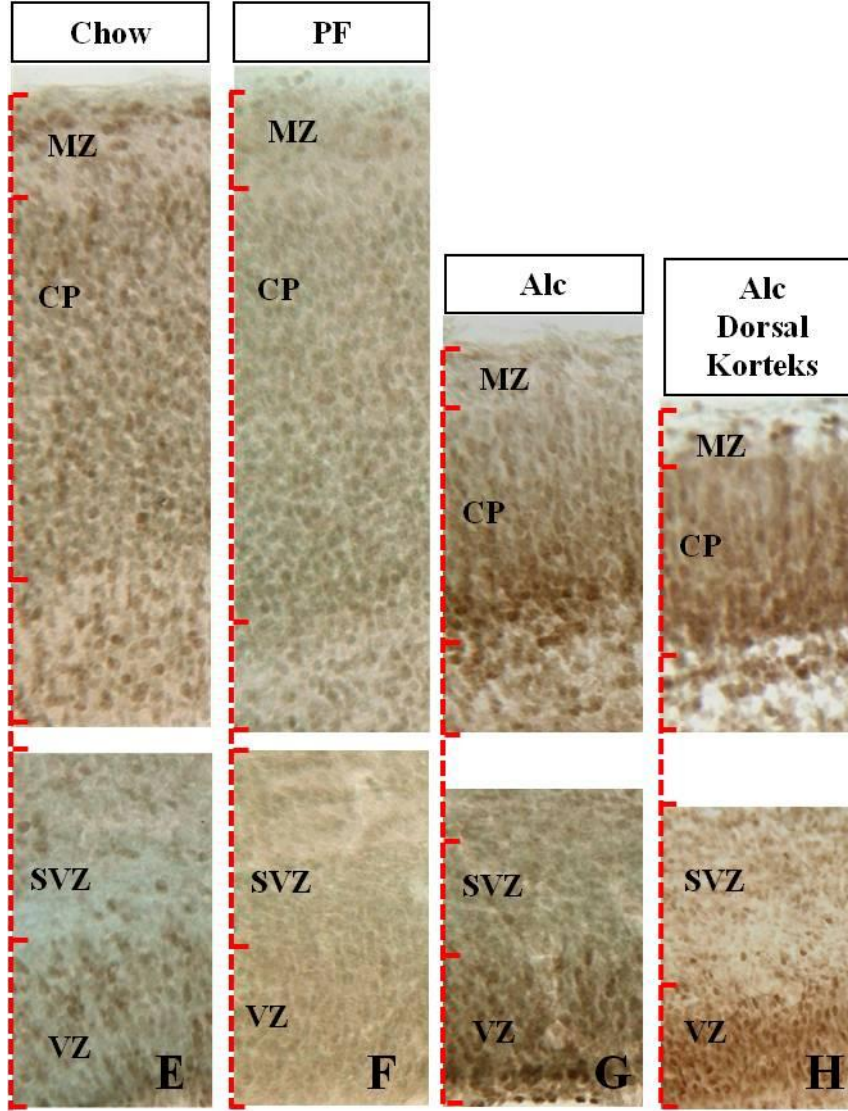
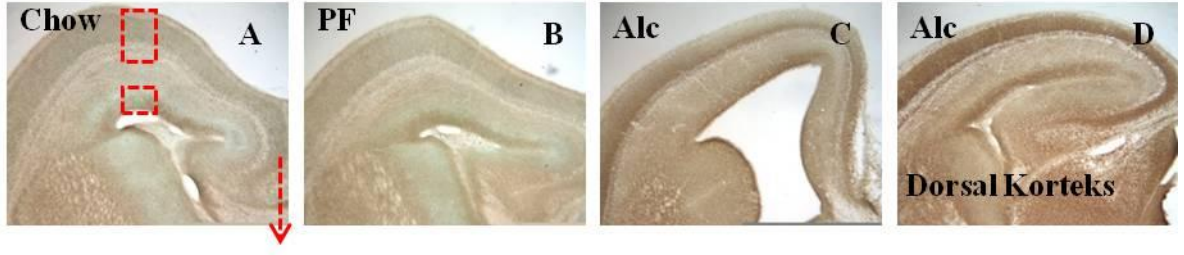
Şekil 4.8. Nükleer 5hmC proteinin ekspresyonu, Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral ve E17 Alc dorsal serebral kortekslerinin tek bir hemisferinin X6'lık büyütmedeki koronal (A-D) ve bu hemisferlerin intermediate zone tabakası hariç radial uzunluğunu boyunca diğer kortikal tabakaları içeren X25'lik büyütmedeki kolonlarındaki durumu görülmektedir (E-H). CP (Cortical Plate), IZ (Intermediate Zone), MZ (Marginal Zone), SP (Subplate), SVZ (Subventricular Zone), VZ (Ventricular Zone).



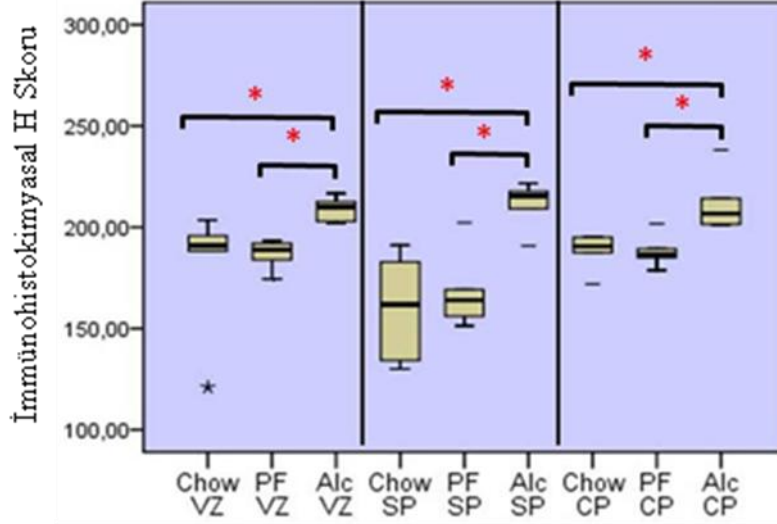
Çizelge 4.8. Görünümü Şekil 4.14.'de verilmiş olan 5hmC protein ekspresyonunun Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral korteks'lerinin VZ, SP ve CP tabakalarındaki immunohistokimyasal H skoru biriminden densitometrik analizine ait değişim grafiği sunulmuştur. Non parametrik Kruskal Wallis testi, gruplar arasında üç farklı embriyonik kortikal tabakaya ait H skorları açısından da anlamlı değişkenlikler tespit etmiştir ($P < 0.05$). **VZ** tabakasına ait H skorlarının ikili gruplar arasında Conover post-hoc testiyle karşılaştırılması, Alc grubunun Chow ve PF gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) şekilde daha düşük olduğunu ve Chow ve PF grupları arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0,05$). **SP** tabakasına ait H skorlarının ikili gruplar arasında Conover post-hoc testiyle karşılaştırılması, PF grubunun Chow ve Alc gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı ($P < 0.05$) şekilde daha yüksek olduğunu ve Chow ve Alc grupları arasında anlamlı farklılık olmadığı tespit edilmiştir ($P > 0,05$). **CP** tabakasına ait H skorlarının ikili gruplar arasında Conover post-hoc testiyle karşılaştırılması, üç grubunda birbirinden anlamlı düzeyde farklı olduğunu göstermiştir. Buna göre PF ve Alc grupları Chow grubuna göre anlamlı düzeyde daha yüksek ve PF grubu da Alc grubuna kıyasla daha düşük olarak tespit edilmiştir ($P < 0.05$) (*= $P < 0.05$).

4.5.3. MeCP2 Boyaması

Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral korteks'lerinde ikincil DNA metilasyonun durumunu belirlemek amacıyla, bu embriyonik beyin kesitleri üzerinde MeCP2 nükleer proteininin semi kantitatif ekspresyonu immunohistokimyasal olarak belirlenmiştir.



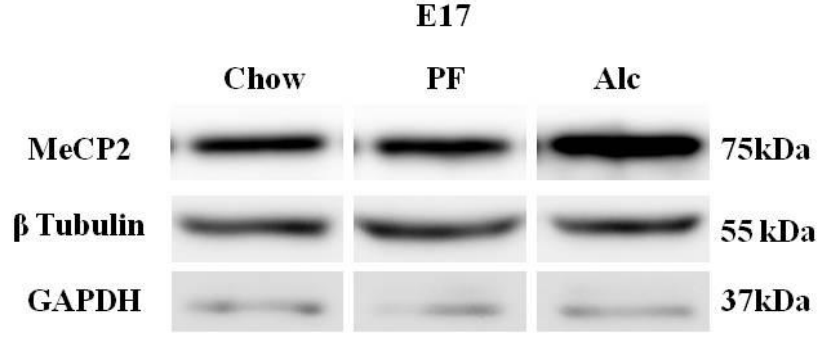
Şekil 4.9. MeCP2 proteinin ekspresyonu, Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral ve E17 Alc dorsal serebral kortekslerinin tek bir hemisferinin X6'lık büyütmedeki koronal (A-D) ve bu hemisferlerin intermediate zone tabakası hariç radial uzunluğunu boyunca diğer kortikal tabakaları içeren X25'lik büyütmedeki kolonlarındaki durumu görülmektedir (E-H). CP (Cortical Plate), IZ (Intermediate Zone), MZ (Marginal Zone), SP (Subplate), SVZ (Subventricular Zone), VZ (Ventricular Zone).



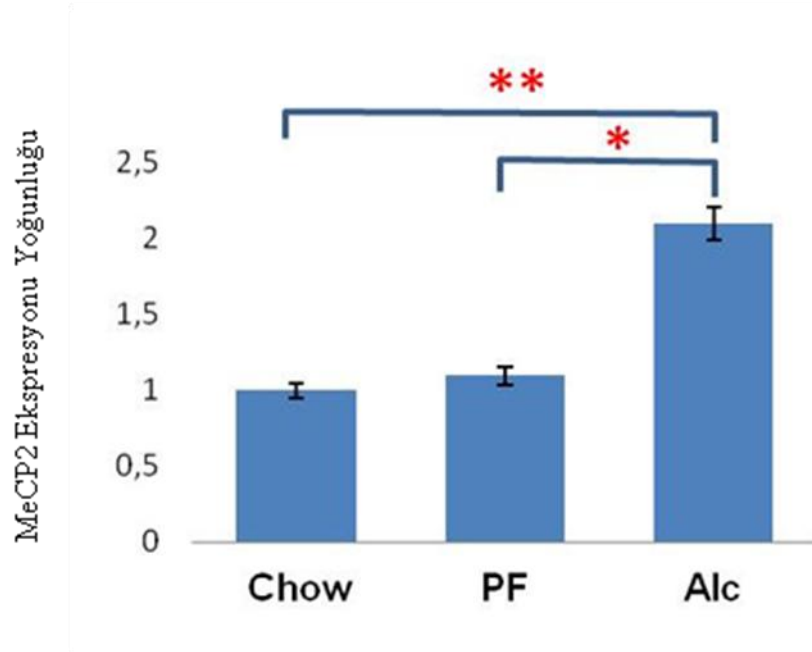
Çizelge 4.9. Görünümü Şekil 4.16.'de verilmiş olan MeCP2 protein ekspresyonunun Chow, PF ve Alc grubu E17 frontal serebral korteks'lerinin VZ, SP ve CP tabakalarındaki immunohistokimyasal H skoru biriminden densitometrik analizine ait değişim grafiği sunulmuştur. Non parametrik Kruskal Wallis testi, gruplar arasında üç farklı embriyonik kortikal tabakaya ait H skorları açısından da anlamlı değişkenlikler tespit etmiştir ($P < 0.05$). İkili gruplar arasında Conover post-hoc testi ile karşılaştırma, her üç kortikal tabaka için de Alc grubu H skorlarının Chow ve PF gruplarına kıyasla anlamlı düzeyde daha yüksek ($P < 0.05$) ve Chow ve PF grupları arasındaysa farklılık olmadığını göstermiştir ($P > 0,05$) (*= $P < 0.05$).

4.5.4. Western Blot Yöntemi ile MeCP2 Protein Ekspresyonu

Chow ve PF gruplarına kıyasla Alc grubu E17 kortikal tabakalarında immunohistokimya yöntemiyle gösterilmiş olan MeCP2 protein ekspresyondaki genel artış eğilimini teyit etmek amacıyla aynı grup tüm beyinlerdeki MeCP2 protein ekspresyonu western blot yöntemiyle de analiz edilmiştir.



Şekil 4.10. Chow, PF ve Alc grubu tüm beyinlerdeki MeCP2 ve internal kontrol (*housekeeping genes*) olarak kullanılan β -Tubulin ve GAPDH protein ekspresyonlarını temsil eden bantlar görülmektedir.



Çizelge 4.10. Görüntü analiz yazılımıyla elde edilen MeCP2 ekspresyon bantlarının yoğunluğu β -Tubulin ve GAPDH kontrol protein bantlarının yoğunluğuna göre normalize edilmiştir. One-way ANOVA testiyle, Chow, PF ve Alc grubu tüm beyinleri için elde edilen MeCP2 ekspresyon değerleri arasında anlamlı değişim tespit edilmiştir ($P < 0.05$). İkili grupların LSD post-hoc testiyle karşılaştırılması, Alc grubu MeCP2 ekspresyonunun Chow ($P < 0.005$) ve PF ($P < 0.05$) guruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha yüksek olduğunu göstermiştir. Chow ve PF gurupları arasında anlamlı farklılığa rastlanmamıştır ($P > 0,05$) (*= $P < 0.05$ ve **= $P < 0.05$).

5. TARTIŞMA

5.1. FASB Hayvan Modeli

Çalışmamızda insanlarda gözlenen FASB'nın ortaya çıkmasında etken olan, gebelik sırasında anne tarafından kronik olarak alkol kullanımının taklit edilmesi amaçlanmıştır. Literatürde çeşitli FASB deney hayvan modelleri bulunmakta ve kabul görmektedir (29,49,171). Bu modellerin bir kısmında gebe deney hayvanına alkolün akut veya kronik olarak belirlenen zaman, doz ve hacimde gastrik gavaj veya intra-peritoneal yöntemlerle direkt (*zorlamalı*) olarak verilmesi amaçlanmaktadır. Bu sayede gebeliğin hedeflenen döneminde tasarlanan fetal alkol hasarının oluşmasını sağlayan kan alkol seviyesine büyük oranda ulaşılabilir. Fakat yukarıda bahsedilen alkol uygulama yöntemleri gebe deney hayvanının her seferinde zorlamalı olarak elle tutulmasını gerektirmektedir. İnsanlarda da gözlemlendiği üzere deney hayvanları da gebelik süreçlerinde oldukça hassas olmakla birlikte çevresel faktörlerden de oldukça etkilenmektedirler. Bu nedenle söz konusu alkol verme yöntemleri deney hayvanında alkolün oluşturduğu etkinin dışında bir stres oluşturmakta ve bu stresin yarattığı etkiyi alkolünkinden ayırt etmek oldukça güçleşmektedir. Fakat direkt alkol uygulamasının yanı sıra deney hayvanının isteğine bağlı olarak alkol tükettiği (*volunteer liquid diet drinking paradigm*) bir deney modeli de bulunmaktadır (29). Bu deney paradigmasında deney hayvanının barındığı kafes içerisine alkol içeren solüsyonun bırakılması yoluyla hayvanın istediği zaman ve miktarda sıvıyı tüketmesi sağlanmaktadır. Böylece söz konusu alkol uygulama yöntemlerinin yukarıda bahsedilen gebe deney hayvanı üzerinde oluşturabileceği stres faktörü optimum laboratuvar koşullarında minimuma indirilebilmektedir. Üstelik bu tip bir metod, davranışsal açıdan insanların alkol kullanımının en etkin şekilde modellenmesini de sağlamaktadır. Bu nedenlerden dolayı çalışmamızda insanlarda görülen FASB'nın gerçeğe en uygun şekilde taklit edilmesini sağlamak amacıyla, yukarıda da bahsedilmiş olan farklı deney modelleri içerisinde geçmişteki tecrübelerimiz neticesinde en uygun olarak gördüğümüz sıvı deney modelini kullanmış bulunmaktayız.

5.2. Serebral Korteks Gelişimi ve DNA Metilasyon Dinamikleri

Gelişmekte olan E17 serebral korteksinin radyal migrasyon göç yolu üzerindeki tabakalarının normal nöronal gelişimi ve eş zamanlı olarak gerçekleşen epigenetiksel durumu fenotipik ve DNA metilasyon markırlarıyla immünohistokimyasal olarak ortaya konulmuştur (Şekil 4.3.). Embriyonik gelişim sürecindeki kortikal tabakalardaki hücresel çoğalma durumunu belirlemek için Ki67 (*proliferasyon markırı*) boyaması gerçekleştirilmiştir. Ki67 işaretlenmesi neticesinde, embriyonik korteksin en genç tabakası olarak bilinen VZ tabakasındaki hücrelerin büyük bir çoğunluğunun Ki67-immün pozitif (im+) olduğu gözlenmiştir. Böylece korteksteeki radyal göçü gerçekleştirecek olan hücrelerin üretimini sağladığı bilinen VZ tabakasındaki proliferasyon aktivitesi elimizdeki E17 kortekslerinde de doğrulanmıştır (138). Eş zamanlı olarak VZ tabakasında doğan ve korteksin bir üst kompartmanına, radyal hücre kolonlarına tutunarak göç etmekte olan INP'ler Tbr2 markırı ile işaretlenmiştir. Özellikle VZ ve SVZ arasındaki alanda oldukça kuvvetli yoğunlukta Tbr2 immünoaktivitesinin gözlenmesi, INP'lerin bu geçiş bölgesindeki göç aktivitelerini işaret etmektedir. SVZ'de de sayıca fazla Ki67-im+ hücre bulunmasına rağmen VZ'ye kıyasla daha az sayıda olduğu gözlenmiştir. Böylece literatürle uygunluk gösterir şekilde elimizdeki E17 fare beyinde, SVZ'nin VZ'den sonra korteksteeki ikincil proliferasyon kompartmanı olduğu gözlenmektedir (134). VZ'den SVZ'ye geçişteki Ki67-im+ hücre gradyanına benzer şekilde SVZ'deki Tbr2 immünoaktivitesinin de VZ'ye oranla daha zayıf olduğu gözlenmiştir. Bunlara paralel olarak, olgun nöronlara spesifik NeuN boyaması söz konusu iki tabakada da olgun nöron bulunmadığını göstermiştir. Gelişmekte olan E17 korteksinin en alt iki tabakasındaki yoğun proliferasyon ve INP'lerin varlığı ve aynı zamanda olgun nöron bulunmayışı, bu iki tabakanın radyal migrasyon yolundaki en alt iki tabaka olmalarının yanında E17 korteksinin en genç kompartmanları olduğunu da doğrulamaktadır. Radyal göç yolundaki bir üst tabaka olan IZ'de, SVZ'de de görüldüğü gibi proliferasyon ve INP hücre aktiviteleri yoğun bir şekilde gözlenmekle birlikte halen olgun nöron bulunmadığı tespit edilmiştir. Elimizdeki E17 korteksinde radyal hattaki ilk NeuN-im+ olgun nöronlar SP tabakasında gözlenmiştir. Bu nöronların nükleuslarının oval şeklinde bir morfolojiye sahip oldukları tespit edilmiştir. Daha alt ve henüz olgunlaşmamış tabakalardaki hücrelerin nükleus görünüşleri incelendiğinde hiçbirinin SP tabakasındaki olgun nöron nükleuslarının sahip olduğu oval şekle sahip olmadığı gözlenmiştir. Örneğin VZ ve SVZ tabakasında bölünmekte olan hücrelerin genellikle kübik veya mekik şeklinde ya da düzensiz bir nükleer morfolojiye

sahip oldukları gözlenmiştir. İleride olgun kortikal duvarın büyük bir çoğunluğunu oluşturacak olan CP tabakasına bakıldığı zaman artık proliferasyon aktivitesinin durduğu fakat halen INP'lerin en üst embriyonik kortikal tabaka olan MZ'ye doğru uzandıkları gözlenmektedir. INP'lerin radial migrasyon sonucunda CP'deki hedef katmanlara vardıklarında, buldukları alana göre değişik nöron gruplarına farklılaştıkları tahmin edilmektedir (138). CP'nin üst yarısında alt yarısına oranla daha fazla NeuN-im+ nöron tespit edilmiştir. Gelişimin bu evresinde CP'nin alt yarısında Tbr2 boyamasıyla gösterildiği üzere halen INP hücreleri gözlenmektedir. Muhtemelen bu hücrelerin CP'nin üst yarısında bulunan daha yukarı katmanlarına göç ettikleri düşünülmektedir. Bundan dolayı E17'de CP'nin üst yarısındaki nöronal olgunlaşmanın alt yarısına kıyasla daha fazla olduğu düşünülmektedir. Özetlemek gerekirse, embriyonik lateral ventrikül duvarında yoğun bir proliferasyon aktivitesiyle henüz hiçbir sinir hücresi grubuna farklılaşmamış olan nöroepitelyal hücreler bulunmaktadır. Bu hücrelerin sayılarını artırma aşamasında VZ'deyken daha önce bahsedildiği üzere düzensiz bir nükleer morfolojiye sahip, radyal glia ya da INP hücre gruplarına farklılaşıp korteksin daha üst tabakalarına ilerlemeye başladıkça morfolojileri ve ebatları adeta büyümekte olan bir çocuk gibi değişmekte ve en son hedef kortikal katmanlara ulaşıp göçlerini tamamlayarak muhtemelen değişik olgun nöron gruplarına farklılaşmak üzere oval şekle büründükleri gözlenmiştir. Fenotipik markırlar ile gerçekleştirdiğimiz boyamalar gerek değişik nöronal hücre gruplarını ve onların lokalizasyonlarını gerekse bu hücre gruplarının morfolojilerini tanımamızı kolaylaştırmıştır. Korteksin farklı tabakalarındaki hücre gruplarının nükleer morfolojilerini tanımak, epigenetik markırlarıyla yaptığımız tekli boyamalar neticesinde, değişik farklılaşma evresinde olan hücrelerdeki DNA metilasyon dinamikleri hakkında daha sağlıklı yorum yapmamızı kolaylaştırmaktadır.

Çalışmamızda E17 korteksinin radyal migrasyon yolundaki DNA metilasyon dinamikleri, her bir tabakanın nöronal farklılaşma durumları göz önünde bulundurularak değerlendirilmiştir. Yoğun hücre artışının ve nöronal farklılaşmanın henüz yeni başlamakta olduğu VZ'deki hücrelerin büyük çoğunluğunun kuvvetli yoğunlukta 5mC-im+ oldukları tespit edilmiştir. Bunun yanında kuvvetli yoğunlukta olmasına rağmen daha az sayıda hücrenin 5hmC-im+ ve bu hücrelerin 5mC-im+ olanlara göre birbirlerinden daha uzakta ve dağınık oldukları gözlenmiştir. Bu tabakadaki DNA metilasyon bağlanma proteini olan MeCP2 işaretlenmesinin ise birçok hücrede görülmekle birlikte diğer iki markıra oranla daha az yoğunlukta olduğu tespit edilmiştir. Belirgin proliferasyon aktivitesinin olduğu ve çoğunluğunu henüz diferansiye olmamış nöroepitelyal hücrelerin oluşturduğu VZ'deki

dominant 5mC ekspresyon görünümü, bölünmekte olan ya da bölünmüş ve nöronal farklılaşmaya girmekte olan hücrelerin primer DNA metilasyonuna olan gereksinimlerini göstermektedir. Bu tabakada daha az sayıda hücrenin 5hmC metilasyonuna gereksinim duyduğu görülmüştür. İkinci proliferatif tabaka olan SVZ'de her üç DNA metilasyon markırının da VZ'ye kıyasla belirgince daha az sayıda hücrede bulunmakla beraber, 5mC'nin yine de sayıca daha fazla hücrede eksprese olduğu görülmüştür.

Daha üst kortikal tabakalardaki DNA metilasyon dinamiklerini kortikal matürasyonla ilişkilendirmek için SP ve CP'nin olgunlaşma seviyeleri NeuN boyanma yoğunluklarına göre belirlenmiştir. Bu tabakalardaki NeuN boyanmasının densitometrik analizi sonucu elde edilen immünohistokimyasal H skorları karşılaştırılmıştır. Buna göre, her iki tabakada da NeuN-im+ olgun nöronlar bulunmasına rağmen densitometrik analiz sonucu SP tabakasındaki nöronların CP'ye göre daha yoğunca NeuN-im+ oldukları tespit edilmiştir. Böylece, elimizdeki E17 beyinlerinde birbirlerine komşu kortikal tabakaların olgunluk açısından farklı olduğunu göstermiş bulunmaktayız. Bununla birlikte, iki tabaka arasındaki immünohistokimyasal 5mC ve 5hmC densitometrik analiz karşılaştırması neticesinde; 5mC-im+ hücre nükleuslarının boyanma yoğunluğunun SP ve CP arasında farklılık göstermediği fakat 5hmC-im+'lerin SP'de CP'ye kıyasla anlamlı düzeyde daha yoğun şekilde boyandığı görülmüştür. Buna göre aynı beyin kesitleri içerisinde birbirinden farklı derecede olgunluktaki nöronların bulunduğu tabakalardaki hücre nükleuslarının aynı düzeyde 5mC metilasyonu buldururken, daha olgun nöronlar içeren tabakadaki hücrelerin daha fazla 5hmC metilasyonu içerdikleri tespit edilmiştir. Bu farklılık, aynı beyin dokusunda bulunmasına rağmen farklı olgunluk seviyesindeki nöronlarda gerçekleşen DNA metilasyonunun birbirinden farklı basamaklarda gerçekleştiğini göstermektedir. Buna göre, gelişmekte olan serebral kortekste nöronal farklılaşmanın daha olgun evresinde bulunan hücrelerin daha erken evredeki hücrelere kıyasla daha fazla yoğunlukta 5hmC gereksinimi olduğu gösterilmiştir. Bunun yanında, korteksin en genç tabakası olan VZ'deki diferansiye olmamış ya da yeni diferansiye olmaya başlamış hücrelerin 5hmC'den daha çok 5mC bulduklarını görülmüştür. Tüm bunlar, E17 kortikal gelişimi baz alındığında nöronal farklılaşmanın değişik evrelerindeki birçok hücrenin hem 5mC hem de 5hmC içermesine rağmen, 5hmC'nin daha çok olgunlaşma, 5mC'nin ise yeni farklılaşma geçiren hücrelerde daha aktif olduğunu işaret etmektedir.

5hmC'nin keşfedilmesinden beri, DNA metilasyonu ile ilişkili nöroepitelyal farklılaşmasının çözümlenmesi daha da iyi anlaşılmıştır. 5mC artışı nöronal hücre farklılaşması için bir gereklilik olmasına rağmen, farklılaşmanın başlaması, 5mC'nin

bulunduğu durumda, hali hazırda belirgin olarak gözlenmemektedir. 5mC'nin 5hmC'ye dönüşümü bu farklılaşmayı tetikleyebilmektedir. Bu 5hmC tarafından gen aktivasyonunun ilişkili geçiş göstermesiyle, promotör bölgelerdeki CpG adacıklarındaki 5mC'nin azalmasıyla ve transkripsiyonel olarak aktive edilmiş genlerin gen gövdelerindeki 5hmC artışı ile gayet uyumlu olduğu görülmektedir (172).

DNA metilasyon programının varlığının, gelişmekte olan beyinde de çok aşikar olduğu düşünülmektedir. 5hmC aynı zamanda gelişen hipokampus ve serebellumda da epigenomik değişiklikler olduğunu göstermiştir (172). DNA metilasyon programının, nöronların ve glianın tam olarak olgunlaştığı ana kadar, 5mC ve 5hmC'nin sürekli devam eden bir siklus içerisinde bulunuyor olabileceğini belirtmek gerekmektedir. Şöyle ki, yüksek miktarlarda DNA metilasyonuna sahip farklılaşmakta olan nöronlar beyindeki hedef bölgelerine ulaştıklarında veya sinaptogenez ve aktif bağlanması dönemine geçiş yaptıkları sırada 5mC ve 5hmC'lerini kaybedebileceği düşünülmektedir. Bu metilasyon ve demetilasyon sikluslerinin farklılaşmanın birçok evresi boyunca tekrarlanabileceğini öngörmekteyiz. Bu temporal değişiklikler, DNA metilasyon ve demetilasyonunun, nöronal gelişim süresince spesifik nöronların fenotipini belirleyen bir program gibi baskın çıktığını işaret edebileceğini düşündürmektedir.

5.3. Prenatal Alkol Maruziyeti Sonrası Fetal Alkol Fenotipi

Çalışmamızda, kullandığımız sıvı diyet paradigmasıyla FASB fare modeli oluşturmak için gerekli kan alkol seviyesine ulaşılmıştır. Birinci trimester sonlarında başlanarak 2. trimester boyunca devam eden (E7-17) kronik alkol maruziyeti E17 embriyo vücut ve tüm beyin ağırlıklarında Chow ve PF kontrol gruplarına kıyasla düşüşe yol açmıştır. Ayrıca alkol grubu E17 beyinlerinin kortikal kalınlığının kontrol gruplarına göre anlamlı düzeyde azaldığı tespit edilmiştir. Oluşturduğumuz FASB modeli sonucunda elde ettiğimiz fetal alkol fenotipinin özellikleri yukarıda genel olarak açıklanmıştır. Alkolün neden olduğu vücut ve beyindeki büyüme geriliklerinin gros morfolojik fenotip olarak tanımlanması uygun görülmektedir. Elimizdeki gros morfolojik fenotip FASB'li insanlarda gözlenen büyümede gecikme, neokortikal veya serebellar morfogenezde değişiklikler gibi bozukluklar ile uyum göstermektedir (14). Çalışmamızda alkolün etkilerini incelemek için kullandığımız hedef anatomik yapı olan serebral korteksi histolojik olarak incelediğimizde, beyin ağırlığının

azalmasının yanı sıra serebral korteksin gri cevherini oluşturan embriyonik kortikal tabakaların kalınlığının alkol uygulaması sonucu azaldığı görülmüştür (Şekil 4.2, Çizelge 4.4.) .

Korteksteki gri cevher kitlesinin azalmasının yanı sıra, bu tabakaları oluşturan hücre dağılımları ve morfolojileri de ayrıca incelenmiştir. Örneğin normal gelişimde birbirinden ayırık ve düzenli dizilimdeki CP tabakası hücre organizasyonunun, alkolün etkisi sonucu birbirlerine oldukça yakınlaşmış ve dizilim düzeni bozulmuş, adeta mozaik gibi bir görünüm aldığı tespit edilmiştir. Ayrıca, muhtemelen kortikal kalınlığın azalmasına paralel olarak geliştiği düşünülen, lateral ventrikül genişliklerinin belirgin bir şekilde arttığı gözlenmiştir. CP tabakasındaki hücrelerin nükleus morfolojileri de incelenmiştir. Normalde bir çoğu olgun veya olgunlaşma evresindeki nöron morfolojisini temsil eden yuvarlak veya ovalimsi görünümündeki hücre nükleuslarının alkolün etkisi sonucu küçülerek mekik şeklinde bir morfolojiye büründükleri tespit edilmiştir (Şekil 4.3). Daha küçük, mekik veya düzensiz şekildeki nükleer morfoloji korteksin henüz nöronal farklılaşmanın erken evrelerinde bulunan daha genç tabakalarındaki (*VZ ve SVZ*) nükleer görünümle benzerlik göstermektedir.

Alkol sonrası embriyonik beyin ağırlığının azaldığı elimizdeki gros morfolojik fenotipin, aslında kortikal hücre organizasyonunun değiştiği ve nöronal farklılaşmanın etkilendiğini gösteren anormal nükleer morfoloji gibi bozuklukların bir sonucu olarak ortaya çıktığı düşünülmektedir. Alkolün fetal gelişim üzerindeki teratojenik etkileri aşikar olmakla birlikte çalışmamızda tespit edilen alkole bağlı gelişimsel büyüme gerilikleri FASB'nin insanlarda gözlenen etkilerini özellikle beyin üzerinde modellemek açısından hedefimize ulaştığımızı göstermektedir.

5.4. Nöronal Fenotip Değişiklikleri

Çalışmamızda ortaya çıkan fetal alkol fenotipinin gros morfolojik ve histolojik özellikleri yukarıdaki bölümde ayrıntılı olarak tarif edilmiştir. Bu bölümde, alkol uygulamasıyla ortaya çıkan söz konusu fenotipteki serebral korteksin farklı kortikal tabakalarının ve nöronal diferansiasyonun farklı evrelerini temsil eden ayrı tipteki nöronal hücreleri nasıl etkilediği tartışılacaktır.

Daha öncede bahsedildiği üzere kortikal kalınlığın azalması gri cevher miktarının azalmasıyla ilişkilendirilmiştir. Buna göre E17 frontal korteksinde olgun nöron markırı NeuN

immünohistokimyasal boyaması sonuçları değerlendirilmiştir. Çalışmamızda da teyit edildiği üzere normal gelişimdeki E17 fare korteksinde olgun nöronlar yalnızca SP ve CP tabakalarında bulunmaktadır. Alkolün etkisi sonucu, bu tabakalardaki NeuN ekspresyonu halen gözlenmekle birlikte, nükleer NeuN boyanma yoğunluğunun Chow ve PF kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu saptanmıştır (Şekil 4.4., Çizelge 4.6.). Bu tablo fetal alkol fenotipindeki serebral korteksteki nöronların dolayısıyla söz konusu kortikal tabakaların kontrollere göre daha az olgunlaşmış olduğunu göstermektedir. Olgun nöron tespitine paralel olarak korteksteki diğer bir tip nöronal hücre grubu olan INP'lerin durumu da incelenmiştir. Korteksin en genç tabakası olan VZ'de doğan nöroepitelyal hücreler ve farklılaşma sürecine girerek radyal glia kolonlarını adeta merdiven gibi kullanarak daha yukarıdaki kortikal hedef noktalarına doğru göç etmektedirler. Bu süreçte hücrelerel farklılaşma da devam etmektedir. Özellikle VZ'den SVZ'ye doğru göç etmekte olan nöroepitelyal hücrelerden farklılaşmış INP hücreleri Tbr2 adı verilen transkripsiyon faktörünü yoğunca eksprese etmektedirler. Elimizdeki E17 frontal serebral korteksindeki Tbr2 boyaması incelendiğinde, INP hücrelerinin VZ ve SVZ tabakalarında oldukça yoğun ve yukarı kortikal tabakalara (*MZ'ye kadar*) gittikçe azalan yoğunlukta immünoreaktivitede, neredeyse bir kortikal katmanın uzunluğu (*VZ veya SVZ*) boyunca devamlı lifler görünümünde bir ekspresyon paterni gösterdiği tespit edilmiştir. Prenatal alkol maruziyeti sonucunda, özellikle VZ ve SVZ tabakalarında gözlenen Tbr2 immünoreaktivitesi belirgince azalmakla birlikte devamlılık gösteren saçaklı lif görünümünün yerini daha kısa ve zayıf lifler görünümü almıştır (Şekil 4.6.). Kontrol gruplarında alt kortikal tabakalarına kıyasla daha zayıf olan SP ve CP tabakalarındaki Tbr2 paterninin, alkolün etkisiyle neredeyse gözden kaybolduğunu göstermektedir. Bu bulgu daha yukarı tabakalara göç etmekte olan INP hücrelerinin kontrol gruplarına göre azalmış ve düzensizleşmiş olması olarak açıklanabilmektedir. E17 Alc ile Chow ve PF kontrol gruplarının karşılaştırmasının yanı sıra embriyonik yaş kontrol grubu olan E16 Chow serebral korteksi de Tbr2 boyaması açısından incelenmiştir. Öncelikle E16 Chow grubu ve E17 Alc grubu beyinlerindeki frontal korteks kalınlıklarının hemen hemen aynı olduğu gözlenmiştir (Şekil 4.6.). Bu durum söz konusu alkol uygulamasının korteks gelişiminde farede bir embriyonik güne yakın bir gecikmeye neden olmuş olabileceğinin bir göstergesidir. Fakat çalışmamızda sadece 3 farklı gebe anneden elde edilen E16 fare embriyosuna ait beyin örnekleri kullanılmıştır. Bu nedenle çalışmamızın esas yaş grubunu oluşturmayan, sadece ihtiyacen kullanılan E16 Chow

gruplarıyla yaptığımız karşılaştırmalar istatistiksel olarak anlamlı sayıda olmayıp yalnızca basit göreceli karşılaştırmalarımıza katkı sağlamıştır.

Gelişmekte olan neokortekste glutamerjik ve piramidal projeksiyon nöronlarını oluşturan iki tip progenitör hücre popülasyonu bulunduğu bilinmektedir. Bunlardan biri radyal gliadır ki ileride nöron ve glial yapılarını oluşturur ve VZ tabakasında Pax6 adı verilen “*homeodomain*” ailesinden bir transkripsiyon faktörüyle karakterizedir. İkinci tip progenitör grup ise, INP’lerdir. VZ’de bölünmeye başlarlar ve ileride yalnızca nöronlara farklılaşırlar. Radyal gliaların INP’lere dönüşümünü inceleyen bir çalışmada, bu işlem gerçekleşirken, radyal glia hücrelerde Pax6 ekspresyonu dramatik düzeyde azalırken Tbr2 ekspresyonunun tam tersi arttığı gözlenmiştir. Daha sonra radyal gliadan farklılaşan INP’lerin yoğunca Tbr2’yi eksprese etmeye devam ettiğini göstermişlerdir. Tbr2 ekspresyonunun CP tabakasının nörogenezi için bir hazırlık olduğu gösterilmiştir. Ventriküler kompartmanlarda radyal gliadan farklılaşan INP’ler CP’deki hedef noktalarına ulaştıktan sonra postmitotik nöronlara farklılaştıkları gösterilmiştir. Bu farklılaşmayla beraber Tbr2 ekspresyonu bu hücrelerde ya oldukça minimum düzeyde kalmakta olduğu ya da tamamen kaybolduğu gösterilmiştir. İşte INP’lerden farklılaşmış bu postmitotik nöronlar Tbr2 ekspresyonunu kaybetmekle birlikte aynı transkripsiyon ailesinden Tbr1’i yoğunca eksprese etmeye başladıkları bilinmektedir. Kortekste postmitotik nöronlara farklılaşma sürecindeki transkripsiyon faktörü gradyanı özetle, radyal glia’dan-ara INP’lere dönüşümde Pax6 azalırken Tbr2 artışı, INP’ler CP’de postmitotik nöronlara dönüşene kadar yoğun Tbr2 ekspresyonu devam ederken, postmitotik nöronlara dönüşümle beraber Tbr2 ekspresyonu azalırken Tbr1 artması yönünde gerçekleştiği gösterilmiştir (173). Tbr2’nin kondisyonel olarak çıkarılmasının kortekste INP hücre kaybına yol açtığı bilinmektedir (138). INP hücreleri daha alt tabakalardaki non-diferansiye hücrelerin farklılaşarak üst kortikal tabakalara olan trafiğini ve bu iki kısmın birbirine olan iletişimini sağlayarak serebral korteksin radyal ekseninde genişlemesine ve nöronal farklılaşmasına indirek olarak önemli katkı sağladığı bilinmektedir (135). Tbr2’den yoksun beyinlerde INP hücrelerin kaybının yanı sıra radyal eksenindeki kortikal genişlemenin yeteri kadar gerçekleşmediği görülmüştür (135).

Yukarıda anlatıldığı üzere CP nörogenezini indirekt olarak yönlendiren ve kortikal genişlemede önemli rol oynayan INP hücreleri ve bu hücrelerle karakterize Tbr2 transkripsiyon faktörünün beyin gelişimindeki rolü aşikârdır. Fetal alkol fenotipimizdeki E17 beyindeki tüm kortikal kalınlığın azalmış olmasıyla beraber, her bir kortikal kompartmanın ayrı ayrı incelenmesiyle, ilginç bir şekilde VZ+SVZ kalınlıklarının kontrol gruplarına kıyasla

daha uzun, SP ve CP tabakalarının dramatik olarak daha kısa olduğu görülmüştür. Daha genç olan, yukarı kortikal bölgelere göç ederek olgun nöronlar oluşana kadar nöronal değişim geçirecek olan hücrelerin üretildiği katmanlar daha uzun, bununla ilerideki olgun serebral korteksin 6 katmanlı duvarını oluşturacak olan embriyonik CP tabakası dramatik şekilde daha kısa görülmektedir. Tbr2 transkripsiyon faktörünün ekspresyonunun azalması ve yukarı tırmanan INP'leri ya da kısmen radyal gliaları temsil eden lifli paterninin neredeyse ortadan kaybolması, VZ ve SVZ'deki radyal glianın INP'ye dönüşümünün önemli ölçüde etkilendiğini işaret etmektedir.

Tbr2'den yoksun transgenik farelerde INP'lerin ortadan kalkması ve eş zamanlı kortikal kalınlıkta azalma görülmesi, elimizdeki fetal alkol fenotipinde kortikal kalınlığın özellikle CP'nin azalması ve VZ+SVZ başta olmak üzere diğer tüm kortikal bölgelerdeki Tbr2 ekspresyonunun azalmış olmasıyla uygunluk göstermektedir. Sonuç olarak çalışmamızda prenatal alkol maruziyetinin kortikal nörogenezi nasıl olumsuz etkilediğinin moleküler kanıtlarından biri olarak alkolün Tbr2 transkripsiyon faktörünün işleyişini bozarak INP formasyonunu dolayısıyla kortikal genişlemeyi etkilemiş olabileceği ilk defa gösterilmiştir.

Alkole bağlı kortikal büyüme geriliği tablosu üzerinde Tbr2 işleyişinin bozulması sadece bir sonuçtur. Alkol pis bir uyuşturucu madde "dirty drug" olarak nitelenebilir. Organizmada birçok moleküler yolağı bağımsız şekilde ya da tek bir tanesini etkileyerek domino taşı etkisi gibi birbiri ardına gelişen biyolojik olayların bozulmasına yol açıyor olabileceği düşünülmektedir. Örneğin bizim çalışmamızda, belki de kortikal gelişimin daha erken bir aşamasında ventrikül duvarlarına yapışık olarak doğan nöroepitelyal hücre proliferasyonu/üremesi veya gelişmesini ya da bu hücrelerin çevre dokuyla moleküler etkileşimlerini değiştirmiş olabileceği de düşünülmektedir. Ya da daha önce üzerinde durulmuş olan diğer transkripsiyon faktörlerini de etkilemiş olabilir. Örneğin radyal glia hücrelerinin INP'lere dönüşümü için gerekli olan Pax6'in regülasyonunun azalması ve bununla beraber Tbr2 ekspresyonunun artmasıyla devam eden transkripsiyon faktörü gradyantının bozulmuş olabileceği düşünülmektedir. Daha sonra yapılacak çalışmalarda Tbr2 ile beraber Pax6 ve Tbr1 faktörlerinin kortikal organizasyondaki durumlarının incelenmesiyle, alkolün yarattığı kortikal teratojenitenin daha net anlaşılacağı düşünülmektedir.

Kortekste alkole bağlı gelişen anormal kortikal gelişimin altında yatan nedenleri daha iyi anlamak için Tbr2 davranışının gözlenmesine ek olarak, INP'lerin migrasyonunda büyük öneme sahip olduğu yakın zaman önce gösterilmiş olan P2Y1 reseptörünün de ekspresyon

davranışları incelenmiştir (138). P2Y1 bir purinerjik reseptör olmakla birlikte hücrede enerji yolağında rol alan bir ATP reseptörü olarak bilinmektedir (138). P2Y1 reseptörünün, VZ ve SVZ'deki Ca^{+2} yolağı ve ATP sinyalizasyonu etkileşimleri ve bunun migrasyondaki rolü genel bilgiler bölümünde ayrıntılı olarak açıklanmıştır. Özetle, yukarı kortikal tabakalara göç etmekte olan INP'lerin sürekli olarak ATP cevabı oluşturduğu ve bunun bir göstergesi olarak P2Y1 ATP reseptörünü eksprese etmekte olduğu ve INP'lerin postmitotik nöronlara farklılaştıktan sonra hücreler statik duruma geçerek yani migrasyona son vererek ATP cevabını ve P2Y1 ekspresyonunu kaybettikleri görülmüştür (138). Tüm bunlar göç etmekte olan INP'lerin yakıt olarak yoğun miktarlarda ATP kullandığını ve bunun P2Y1 reseptörü ile kolayca belirlenebileceğini işaret etmektedir. Fetal alkol fenotipinde ve kontrol beyinlerinde gerçekleştirdiğimiz P2Y1 boyaması, P2Y1 ekspresyonunun kontrol guruplarında çoğunlukla SP tabakası ve CP'nin en alt tabakalarında lokalize olduğunu, alkol fenotipimizde ise bu bölgelerdeki P2Y1 ekspresyonunun gözle görülür şekilde azaldığı tespit edilmiştir (Şekil 4.5.). Bu durum, E17'deki normal gelişim sırasında bu iki neokortikal katmanda açığa çıkan yoğun ATP cevabını temsil etmektedir. Bu cevabın oluşması da muhtemelen göç etmekte olan INP hücreleri tarafından oluşturulmaktadır. İlginç olarak, P2Y1'nin kortikal migrasyondaki rolünün ortaya çıkarılması için gerçekleştirilen çalışmada E14 ve E15 fare korteksleri kullanılmış ve bu beyinlerde hemen hemen her neokortikal tabakada gözlenmesine rağmen P2Y1'nin yoğun olarak VZ ve SVZ ara bölgesinde eksprese olduğu gösterilmiştir (138). Çalışmamızda ise hem E16 hem de E17 beyinleri kullanılmış ve yukarıda bahsedilen çalışmadan farklı olarak, VZ ve SVZ kompartmanlarında P2Y1 ekspresyonunun hiç bulunmadığı gözlenmiştir. Daha ziyade bu reseptörün aktivitesinin daha üst kortikal tabakalara kaydığı gözlenmiştir. Elde ettiğimiz bu farklılığın, tamamen E14-15 ile E16-17 gelişim süreçleri arasındaki kısa dönemde INP'lerin muhtemelen hızlıca daha üst kompartmanlara göç etmiş olabileceğini göstermektedir. Fakat alkol fenotipindeki kortekslerde kontrol gruplarına kıyasla bu bölgelerdeki gözle görülür P2Y1 ekspresyon azalması, bu alanlarda göç eden çok az INP bulunduğunu işaret etmektedir. Ayrıca, spekülasyon olarak bu alanların P2Y1 reseptöründen yoksun olması bu alanlarda belki INP'lerin bulunmasına rağmen ATP cevabı oluşturamayıp hücre mobilizasyonlarını kaybettikleri ya da o tabakadaki INP sayısındaki azalma olarak yorumlanabilir. Destekleyici olarak bu bölgelerdeki Tbr2 ekspresyonunun azalmış olması INP'lerin miktar olarak da azalmış olabileceğinin bir göstergesidir. Fakat konunun daha iyi anlaşılabilmesi için P2Y1

reseptörünün etkileşim halinde bulunduğu Ca^{+2} yolağının da takibe alınmasının oldukça yararlı olabileceği düşünülmektedir.

Tüm bunlara ek olarak, ilginç olarak Ki67 proliferasyon markırı ile aynı kortikal kesitler üzerinde yaptığımız boyamalar neticesinde alkolün VZ ve SVZ tabakalarında gerçekleşen hücresel çoğalma aktivitesinde bir değişikliğe neden olmadığı gösterilmiştir. Korteksin hücre amplifikatörü görevi gören VZ ve SVZ'deki proliferatif tabakalardaki çoğalma işlemleri etkilenmezken, Tbr2 ile gösterilen muhtemel radyal glia ve INP aktivasyonunun, P2Y1 ile SP ve CP'deki INP migrasyon aktivitesinin bozulması ve ayrıca NeuN ile gösterilen olgun nöron aktivitesinin azalmış olması durumları; alkolün tek tek SP ve CP kalınlığındaki azalmaya neden olurken, VZ ve SVZ'nin kontrol gruplarına kıyasla daha geniş olmasıyla uygunluk göstermektedir. Buna göre muhtemelen alt tabakalarda yoğun proliferasyon aktivitesiyle hücreler bu kompartmanlarda birikmekte fakat radyal glia ve sonrasında INP nöronal farklılaşma dönüşümüne yeterli seviyede giremedikleri için kortikal gelişimin ilerlemesine rağmen bu kompartmanlarda hapis kalmış oldukları düşünülmektedir. Daha üst tabakalardaki INP ve nöronal azalmada ortaya atılan bu fikri desteklemektedir.

5.5. Prenatal Alkol Maruziyeti Sonrası DNA Metilasyon Dinamikleri

Çalışmamızda oluşturduğumuz FASB modelinde ortaya çıkan fetal alkol fenotip E17 serebral korteksinin kompartmanlarındaki morfolojik ve hücresel değişiklikler, fenotipik nöronal markırlar yardımıyla moleküler düzeyde basitçe açıklanmıştır. Çalışmamızın epigenetik perspektifindeki ilk amacı, erişkinde serebral korteksin 6 katmanlı fonksiyonel yapısını oluşturacak olan ve gelişim sırasında birçok karmaşık moleküler mekanizmanın bir arada işleyişiyle oluşmakta olan fetal beyin üzerindeki DNA metilasyon dinamiklerinin ortaya konması olmuştur.

Bu bölümde ise prenatal alkol maruziyetinin neokortikal kompartmanlardaki DNA metilasyon işleyişinin doğasını nasıl etkilediğine ait sonuçlar verilerek bunların ne anlama geldiği tartışılacaktır.

Primer DNA metilasyon markırı olan 5mC ekspresyonu Chow, PF ve Alc grupları arasındaki E17 frontal kortekslerinin VZ, SP ve CP tabakaları açısından karşılaştırılmıştır. Chow ve PF kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı hiçbir farklılığa rastlanmazken, Alc grubu CP tabakasındaki 5mC ekspresyonunun kontrol gruplarına kıyasla

arttığı tespit edilmiştir (Şekil 4.7., Çizelge 4.7.). Bunun yanı sıra ikincil DNA metilasyon markırı olan 5hmC ekspresyonun PF izokalorik kontrol ve Alc gruplarında Chow kontrol grubuna kıyasla artmış olduğu görülmüştür. Ayrıca Alc ve PF grupları arasındaki ikili karşılaştırma Alc gurubundaki ekspresyonun PF'dekine göre anlamlı düzeyde daha fazla olduğunu da göstermiştir. Neokorteksteki 5hmC ekspresyonu VZ ve SP tabakalarında da farklılıklar göstermiştir. Örneğin Alc grubunda VZ'deki 5hmC ekspresyonunun kontrol gruplarına göre azalmış olduğu görülmüştür. SP tabakasında ise Chow ve Alc gruplarına kıyasla, PF grubunda 5hmC ekspresyonunda artış tespit edilmiştir (Şekil 4.8., Çizelge 4.8.). Çalışmamızda gerek gros morfolojik ve hücresele ya da fenotipik nöronal markırlar gerekse tüm epigenetik markırların karşılaştırılması açısından izokalorik kontrol grubu olan PF'de asıl kontrol olan Chow gurubuna kıyasla bir tek değişiklik 5hmC ekspresyonu açısından gerçekleşmiştir. 5hmC ekspresyonu açısından PF gurubunda gözlenen bu değişimlerin doğru olup olmadığının anlaşılması için immünohistokimyasal densitometrik analiz tekrarlanmış ve aynı sonuçlara tekrar ulaşılmıştır.

Çalışmamızdaki en çarpıcı epigenetik bulgu ise DNA metilasyon bağlama proteini MeCP2 ekspresyonuna aittir. Alc gurubunda her üç kortikal kompartmanda da kontrol guruplarına kıyasla ekspresyon artışı görülmüştür (Şekil 4.9., Çizelge 4.9.). Bu ekspresyon artışı ayrıca E17 beyinleri üzerinde gerçekleştirilen Western blot yöntemiyle de teyit edilmiştir (Şekil 4.10., Çizelge 4.10.).

Gerek epigenetik gerekse fenotipik nöronal markırların E17 VZ, SP ve CP kompartmanlarında analiz edilmesinin amacı, bu alanların gelişmekte olan beyindeki nöronal farklılaşmayı çok hızlı ve net değişkenlikte temsil etmesinden kaynaklanmaktadır. Önemli bir çevresel etken olarak alkolün fetal beyin gelişimine yapmış olduğu etki, bu tabakalardaki nöronal ve epigenetik değişimler ile net bir şekilde izlenmiştir. En temel epigenetik mekanizmalardan biri sayılan DNA metilasyonunu temsil eden çeşitli markırların doğal düzenlerinin alkolle birlikte, nöronal olgunlaşmanın sekteye uğramış olduğu E17 beyinlerinde bozulduğu gözlenmiştir. Alkolün DNA metilasyon mekanizmasını serebral korteks gelişiminindeki gecikmeyle korele bir şekilde etkilediğini göstermiş olmamıza rağmen, bu gecikmenin hatalı DNA metilasyon programından kaynaklanıp kaynaklanmadığı çelişkili bir konudur.

DNA metilasyonu organizmada çevre ve gen ekspresyonu arasında iletişim kuran bir köprü vazifesi görmektedir. Bunu gen transkripsiyonunu aktive veya inhibe edici şekilde gerçekleştirmektedir. DNA metilasyonunun, kromatinin ökromatin ve heterokromatin

bölgelerinde gerçekleştiği görülmüştür. Örneğin, ökromatin bölgeler az yoğunlukta transkripsiyonel olarak aktifken, heterokromatinin genellikle kondens ve sessiz olduğu gözlenmiştir (64). İki asıl kromatin tipinin de belirgin epigenetik modifikasyonlar ile ilgili olmaya eğilimli olduğu görülmüştür. 5hmC'nin embriyonik kök ve zigotik hücrelerde süregelen bir DNA metilasyon formu olarak bulunduğu bilinmektedir (89,90). Global analizler, 5hmC'nin transkripsiyonel olarak aktif veya embriyonik kök hücrelerde ve gelişmekte olan beyinde aktivasyona doğru dönüştüğü genlerle ilişkili olduğunu göstermektedir (91,92). Diğer çalışmalarda, susturulmuş genlerdeki eksprese edilmiş şekle dönüşmekte olan 5hmC'nin, embriyonik kök hücrelerdeki aktive edici ve baskılayıcı histon 3 modifikasyonları ile iki değerlikli bir şekilde bağlı olduğu bulunmuştur (93,94). 5hmC'nin fonksiyonel sonuçları, gen gövdesi ve gelişimsel düzenleyici genlerin promötör bölgeleri ile ilişkili olarak ve aktive edici histon kodları ile ilişkili bölgelerde zenginleştirilmiş olarak genomik dağılımı ile daha da desteklenmiştir (91,95). Sonuç olarak, 5hmC ve 5mC bağımsız bir şekilde özgün metil bağlama proteinlerine (*transkripsiyonel düzenleyiciler*) bağımsız bir şekilde bağlı ve sırasıyla heterokromatin ve ökromatine farklı bir şekilde kolokalize olduğu gösterilmiştir (96). Çalışmamızda E17 beyinlerindeki 5mC, 5hmC ve MeCP2 protein ekspresyonlarının E17 beyinlerindeki nükleus kromatinlerindeki lokalizasyonlarını ele alacak olursak, 5mC ve MeCP2'nun birbirine uygunluk gösterircesine hücre nükleuslarındaki daha açık yani ökromatin bölgelerde kümelenildiğini, 5hmC'nin ise tersine daha koyu heterokromatin bölgelerde yoğunlaştığı görülmüştür. Buna uygunluk göstererek 5mC ve MeCP2 aktivitelerinin transkripsiyon aktivitesini inhibe edici, 5hmC'nin ise aktifleştirici etkileri olduğu bilinmektedir. Bu epigenetik faktörlerin bir arada ahenk içinde çalışmasıyla organizmadaki transkripsiyonel işleyişin normal seyirde sürmesinin sağlandığı düşünülmektedir.

Çalışmamızda fetal alkol uygulamasının etkisiyle, 5mC, 5hmC ve MeCP2 ekspresyonlarının büyük çoğunluğunu oluşturduğu DNA metilasyon dinamiklerinin, E17 beyinde, nöronal farklılaşmanın eşsiz örneklerinden birinin temsil edildiği neokortikal tabakalarda bariz biçimde bozulduğu gösterilmiştir. DNA metilasyon döngüsünün gerçekleşmesini sağlayan bu proteinlerin organizmadaki transkripsiyonel aktivite üzerindeki etkileri göz önünde bulundurulduğunda, gerek gros morfolojik ve gerekse fenotipik nöronal markırlarıyla etkin şekilde tarif ettiğimiz fetal alkol fenotipik E17 neokortikal tabakalarındaki bozulmuş DNA metilasyonu neticesinde bu tabakalardaki hücrelerin transkripsiyon aktivitelerinin de benzer şekilde bozulmuş olabileceği tahmin edilmektedir.

DNA metilasyon dinamiğinin düzgün işleyişinin embriyonik gelişim için yaşamsal önemi bulunabilmektedir. Farklı çalışmalarda DNMT veya TDG proteinleri gibi metilasyon mekaniğinin kondisyonel olarak silinmesi veya fazla ekspresyonunun embriyoda ölüme yol açtığı gösterilmiştir (174-176). Metil bağlayıcı proteinleri kodlayan genlerdeki mutasyonların, Rett sendromu, Angelman sendromu ve Prader-Willi sendromu gibi gelişimsel defisitlerin ortaya çıkmasına neden olduğu bildirilmiştir (177-179). Bir başka çalışmada kültürde uygulanan DNA metilasyonu için bir DNMT inhibitörü olan AZA, nörolasyonda embriyonik büyümeyi geciktirmiştir (100). Benzer bir şekilde kolin eksikliği (*metil donor olmaması*) global olarak fare hipokampusundaki nöroepitelde DNA metilasyonunu ve gen-spesifik metilasyonunu azaltmış ve hafıza performansını bozmuştur (180). Diğer taraftan, diyetle kolin eklenmesinin hipokampustaki nöronal sistemlerdeki gelişimsel defisitleri azalttığı gösterilmiştir (181-183). Literatürdeki bu bulgular ışığında, DNA metilasyonunun tekrar düzenlenmesinin FASB modellerinde alkol teratojenitesini yürüttüğünün mantıklı olduğu düşünülmektedir. Fakat, hangi grup genlerin metilasyon değişikliklerinde hedef olduğu konusu halen açık değildir.

Epigenetik perspektifli yakın zaman önce gerçekleştirilmiş bir FASB çalışmasında, DNA metilasyon programı dahilinde 5mC'nin aksiyel ve dorsoventral planda zaman-uzamsal olarak nöral tüp matürasyonu ile ilişkili olduğunu ve nöral tüp matürasyonundan da önce mevcut olduğunu göstermişlerdir (100). Çalışmamızda karmaşık beyin gelişimi sürecinde, DNA metilasyon programını 5mC, 5hmC ve MeCP2'yi de işin içine katarak serebral korteks oluşumunda nöronal farklılaşmayı ve olgunlaşmayı adım adım incelemiş bulunmaktayız.

Bu çalışma, DNA metilasyon programının serebral korteks farklılaşması ve matürasyonu sırasında gayet iyi düzenlendiğini ve alkolün bu dengeyi bozarak normal gelişimi geciktirdiğini ilk kez gösteren bir çalışma niteliğindedir.

Gebe anneler tarafından veya gebelik öncesi anne ve baba tarafından alkol kullanımının embriyonik gelişim ve sonrasında doğan çocuklarda yaşam boyu çok olumsuz teratojenik etkileri bulunmaktadır. İlgili teratojenik etkiler, giriş kısmında üzerinde durulduğu üzere; beyin hasarı, prenatal ve devamında postnatal büyüme gerilikleri ve özellikle yüz bölgesinde morfolojik defektleri de kapsayacak şekilde çok geniş spektrumda fenotipe yansıyabilen gelişimsel kusurlara yol açabilmektedir. Ülkemizde, ulusal literatür bilgisi dahilinde gebelik süresince alkol kullanımının yaygın olduğuna dair hiçbir bilimsel rapor bulunmamaktadır. Öte yandan, ülkemizde de diğer her toplumda olduğu gibi kökeni tam olarak bilinmeyen mental retardasyon, hiperaktivite, öğrenme bozuklukları ve postnatal

büyüme gerilikleri dahil birçok gelişimsel merkezi sinir sistemi hasarına bağlı beyin fonksiyon anomalileri gözlenen çocuk, genç ve yetişkin birey bulunduğu. Fakat gözlenen bu fenotiplerin altında yatan çevresel ve genetik etmenlerin, bu hastaların ve ailelerinin tıbbi geçmişleri yeterince sorgulanmadığı için anlaşılamadığı düşünülmektedir. Verilen örneklerle benzer anormalliklerin, batılı ülkelerde özellikle pediatri kliniklerinde prekonsepsiyonel ve prenatal alkol kullanımı tespit edildiği durumlarda FASB bozuklukları sınıfına dahil edildiği bilinmektedir. Ülkemizde de gözlenen buna benzer fenotiplerin bir kısmının alkol veya diğer uyuşturucu maddelerin teratojenik etkileri sonucunda ortaya çıktığı düşünülmektedir.

Gerek ulusal gerekse küresel ölçekte düşünüldüğünde, çağımızda hızlı nüfus artışına bağlı gelişen çarpık sosyoekonomik gelişmelerin, insanları hızla uyuşturucu madde kullanımına yönlendirdiği ve sonucunda da madde bağımlılığına yol açtığı gözlenmektedir. Maalesef, alkol başta olmak üzere uyuşturucu madde bağımlılığının toplumumuz üzerine de oldukça olumsuz etkileri görülmektedir. Ayrıca, gelecek 10-20 yıllık süre içerisinde toplumumuzda alkol kullanımının olumsuz etkilerinin daha da şiddetli biçimde kendini göstereceği öngörülmektedir.

Çalışmamızda, alkol teratojenitesinin olumsuz sonuçlarının, embriyonik gelişimi kontrol eden epigenetiksel moleküler mekanizmaların işleyişi üzerindeki etkileri anlaşılmalı çalışılmıştır. Sonuç olarak; bu çalışmayla elde edilen bilgiler kazandırılması amaçlanmış olan epigenetiksel bakış açısının gelecekte sadece alkole bağlı değil, ayrıca toplumda diğer uyuşturucu madde bağımlılıklarıyla ortaya çıkabilecek teratojenik kusurların da daha iyi anlaşılabilmesi ve bu olumsuz etkilerin önlenmesi için geliştirilecek temel ve klinik terapötik çalışmalara model olabileceği öngörülmektedir.

6. SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Epigenetik kalıtımsal olmakla birlikte, tabiatı gereği evrimleşebilir ve modifiye olabilir özellikte olduğu anlaşılmıştır. Epigenetik olayların hangi çevresel faktörler tarafından ve nasıl etkilendiği fetal hayatta alkol ile indüklenmiş FASB ile gösterilebileceği düşünülmektedir:

- 5hmC 5mC'ye göre fazlaca çeşitlilik göstermektedir ve sinir sistemi gelişimi sırasında oldukça etkin ve yaygındır.
- Gelişim sırasındaki DNA metilasyonu rasgele değildir, aksine dinamik ve spesifik bir şekilde gelişimsel olayları değiştirmek üzere evrimleşmiştir.
- Alkol, DNA ve histon metilasyonunu, asetilasyonu ve/veya kodlanmayan RNA'lar üzerinde etkili olmak için, metabolik olarak metil donörlerin varlığını değiştirebilir.
- Gebelikteki alkol alımı, fetal dönemde biyolojik olarak birçok ilgili genin DNA metilasyonu ve histon kodifikasyonunu değiştirebilir, bu gibi değişiklikler yaşamın geç dönemlerine kadar devam edebilir ve gen transkripsiyonunu etkileyebilir.
- FASB'daki terapötik gelişmeler alkolün metil donörleri gibi epigenetik öncü bileşenlere ulaşabilmesini düzenlemeye odaklanmalıdır.
- DNA metilasyonu ve histon modifikasyonu hücre veya doku spesifik olduğundan, epigenetik ile ilgili gelecekteki analizler hücre ve genomik yaklaşımları içermelidir.
- FASB'da altta yatan epigenetik sebepler, epigenetik üzerindeki çevresel etkilere en mükemmel örneği teşkil etmektedir.

Epigenetiğin gelecekteki tıbbın merkezinde yer alacağı öngörülmektedir. Epigenetiğin tıptaki yeri, hastalık ve tedavilere geleneksel genetik bakışın sınırlarını fazlasıyla aşacak nitelikte gözükmektedir. Kanseri araştırmaları daha çok tıbbi epigenetiğe doğru kaymaya başlamıştır. Bir sonraki epigenetik dalganın gelişimsel tıpta olması beklenmektedir. Bunlar, açık bir şekilde genetik hatası olmayan gelişimsel sendromlardan (örneğin; otizm spektrum hastalıkları), kişiye özel gelişimsel sendromlara, geç başlangıçlı jenerasyonlar arası hastalıklara ve yaşlanmaya kadar çeşitlilik göstermektedir. Gelişimsel epigenetik normal "sağlıklı" popülasyondaki farklılıkları anlamada da önemli katkıları sağlayabilir. Gelişimsel tıptaki çevresel girdileri ve onların uzun dönem etkilerini vurgulamak için hiç vakit kaybetmeden bu konuda çalışmalara başlanması oldukça yararlı olacaktır. Erken dönem

çocuk bakımı, stres, madde bağımlılığı, çevresel toksinler vb. epigenetik aracılığı ile gen transkripsiyonunu ve gelişim sırasında fenotip ekspresyonunu etkileyebileceği ve bunun hayat boyu devam edebileceği düşünülmektedir. Genetik problemlere veya polimorfizme dayandırılmayacak birçok geç başlangıçlı hastalığın tohumları gelişim döneminde atılmış olabileceği düşünülmektedir. Bunların oluşumu, bir yaşam boyu daha ileri çevresel uyaranlarla uyumlu bir şekilde de gerçekleşebileceği veya bunlar tarafından tetiklenebilir olabileceği varsayılmaktadır. Epigenetik tıbbın daha iyi anlaşılabilmesi gerekli bir durumken ve de sürekli gelişirken, insanoğlunun hastalıklarını epigenetik perspektiften açıklayabilmenin yakın gelecekte gerçekleşeceği öngörülmektedir.

KAYNAKLAR

- 1- **Hoyme HE, May PA, Kalberg WO, Kodituwakku P, Gossage JP, Trujillo PM, Buckley DG, Miller JH, Aragon AS, Khaole N, Viljoen DL, Jones KL, Robinson LK.** A practical clinical approach to diagnosis of fetal alcohol spectrum disorders: Clarification of the 1996 institute of medicine criteria. *Pediatric*, **2005**; 115 (6):39-47.
- 2- **Manning MA, Eugene Hoyme H.** Fetal alcohol spectrum disorders: A practical clinical approach to diagnosis. *Neurosci Biobehav Rev*, **2007**; 31(2):230-238.
- 3- **Stoler JM, Holmes LB:** Recognition of facial features of fetal alcohol syndrome in the newborn. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **2004**; 127(1):21-27.
- 4- **May PA, Gossage JP:** Estimating the prevalence of fetal alcohol syndrome. A summary. *Alcohol Res Health*, **2001**; 25(3):159-167.
- 5- **Viljoen DL, Gossage JP, Brooke L, Adnams CM, Jones KL, Robinson LK, Hoyme HE, Snell C, Khaole NC, Kodituwakku P, Asante KO, Findlay R, Quinton B, Marais AS, Kalberg WO, May PA.** Fetal alcohol syndrome epidemiology in a South African community: A second study of a very high prevalence area. *J Stud Alcohol*, **2005**; 66(5):593-604.
- 6- **Urban M, Chersich MF, Fourie LA, Chetty C, Olivier L, Viljoen D:** Fetal alcohol syndrome among grade 1 schoolchildren in Northern Cape Province: Prevalence and risk factors. *S Afr Med J*, **2008**; 98(11):877-882. WHO: Global Status Report on Alcohol 2004 Erişim: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562722.pdf>
- 7- WHO: Global Status Report on Alcohol 2004 Erişim: <http://whqlibdoc.who.int/publications/2004/9241562722.pdf> Erişim tarihi: 02.08.2011
- 8- **Abel EL.** An update on incidence of FAS: FAS is not an equal opportunity birth defect. *Neurotoxicol Teratol*, **1995**; 17(4):437-443.
- 9- **Stoler JM, Holmes LB.** Under-recognition of prenatal alcohol effects in infants of known alcohol abusing women. *J Pediat*, **1999**; 135(4):430-436.
- 10- **Wattendorf DJ, Muenke M.** Fetal alcohol spectrum disorders. *Am Fam Physicia*, **2005**; 72(2): 279-282.
- 11- **Lupton C, Burd L, Harwood R.** Cost of fetal alcohol spectrum disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, **2004**; 127(1): 42-50.

- 12- **Sampson PD, Streissguth AP, Bookstein FL, Little RE, Clarren SK, Dehaene P, Hanson JW, Graham JM Jr.** Incidence of fetal alcohol syndrome and prevalence of alcohol-related neurodevelopmental disorder. *Teratology*, **1997**; 56(5): 317-326.
- 13- **Olson HC, Streissguth AP, Sampson PD, Barr HM, Bookstein FL, Thiede K.** Association of prenatal alcohol exposure with behavioral and learning problems in early adolescence. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, **1997**, 36(9): 1187-1194.
- 14- **Kumada T, Komuro Y, Li Y.** Inhibition of cerebellar granule cell turning by alcohol. *Neuroscience*, **2010**;170(4): 1328-1344.
- 15- **Norman AL, Crocker N, Mattson SN, Riley EP.** Neuroimaging and fetal alcohol spectrum disorders. *Dev Disabil Res Rev*, **2009**;15(3): 209-217.
- 16- **Sowell ER, Mattson SN, Kan E, Thompson PM, Riley EP, Toga AW.** Abnormal cortical thickness and brain-behavior correlation patterns in individuals with heavy prenatal alcohol exposure. *Cereb Cortex*, **2008**;18(1):136-144.
- 17- **Fernández-Mayoralas DM, Fernández-Jaén A.** Fetopatía alcohólica: Puesta aldía. *Rev Neurol*, **2011**;52(2): 53-57.
- 18- **Swayze VW II, Johnson VP, Hanson JW.** Magnetic resonance imaging of brain anomalies in fetal alcohol syndrome. *Pediatrics*, **1997**; 99(2):232-240
- 19- **Archibald SL, Fennema-Notestine C, Gamst A, Riley EP, Mattson SN, Jernigan TL.** Brain dysmorphology in individuals with severe prenatal alcohol exposure. *Dev Med Child Neurol*, **2001**;43(3): 148-154.
- 20- **Shaw P, Rabin C.** New insights into attention-deficit/hyperactivity disorder using structural neuroimaging. *Curr Psychiatry Rep* 2009;11(5): 393-398.
- 21- **Mooney SM, Miller MW.** Prenatal exposure to ethanol affects postnatal neurogenesis in thalamus. *Exp Neurol*, **2010**; 223(2): 566-573.
- 22- **Cui ZJ, Zhao KB, Zhao HJ.** Prenatal alcohol exposure induces long-term changes in dendritic spines and synapses in the mouse visual cortex. *Alcohol Alcohol* **2010**; 45(4): 312-319.
- 23- **Fukui Y, Sakata-Haga H.** Intrauterine environment-genome interaction and children's development (1): Ethanol: A teratogen in developing brain. *J Toxicol Sci*, **2009**;34(2): 273-278.
- 24- **Bell SH, Stade B, Reynolds JN.** The remarkably high prevalence of epilepsy and seizure history in fetal alcohol spectrum disorders. *Alcohol Clin Exp Res*, **2010**; 34(2): 1084-1089.
- 25- **Sowell ER, Thompson PM, Mattson SN.** Regional brain shape abnormalities persist into adolescence after heavy prenatal alcohol exposure. *Cereb Cortex*, **2002**;12(8): 856-865.
- 26- **Coles CD, Goldstein FC, Lynch ME.** Memory and brain volume in adults prenatally exposed to alcohol. *Brain Cogn*, **2011**; 75(1): 67-77.

- 27- **Warner RH, Rosett HL.** The effects of drinking on offspring: an historical survey of the American and British literature. *J Stud Alcohol*, **1975**; 36(11): 1395-1420.
- 28- **Jones KL, Smith DW.** Recognition of the fetal alcohol syndrome in early infancy. *Lancet*, **1973**; 7836 999-1001.
- 29- **Sulik KK, Johnston MC, Daft PA, Russell WE, Dehart DB.** Fetal alcohol syndrome and digeorge anomaly: critical ethanol exposure periods for craniofacial malformations as illustrated in an animal model. *Am J Med Genet Suppl*, **1986**; 2:97-112.
- 30- **Daft PA, Johnston MC, Sulik KK.** Abnormal heart and great vessel development following acute ethanol exposure in mice. *Teratology*, **1986**; 33(1):93-104.
- 31- **Downing C, Balderrama-Durbin C, Broncucia H, Gilliam D, Johnson TE.** Ethanol teratogenesis in five inbred strains of mice. *Alcohol Clin Exp Re*, **2009**, 33(7):1238-1245.
- 32- **Chernoff GF.** The fetal alcohol syndrome in mice: maternal variables. *Teratology*, **1980**; 22(1):71-75.
- 33- **Gilliam DM, Stilman A, Dudek BC, Riley EP.** Fetal alcohol effects in long- and short-sleep mice: activity, passive avoidance, and *in utero* ethanol levels. *Neurotoxicol Teratol*, **1987**; 9(5):349-357.
- 34- **Goodlett CR, Gilliam DM, Nichols JM, West JR:** Genetic influences on brain growth restriction induced by development exposure to alcohol. *Neurotoxicology*, **1989**; 10(3):321-334.
- 35- **Gilliam DM, Kotch LE, Dudek BC, Riley EP.** Ethanol teratogenesis in selectivity bred long-sleep and short-sleep mice: a comparison to inbred C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res*, **1989**; 13(5):667-672.
- 36- **Gilliam DM, Irtenkauf KT.** Maternal genetic effects on ethanol teratogenesis and dominance of relative embryonic resistance to malformations. *Alcohol Clin Exp Re*, **1990**; 14(4):539-545.
- 37- **Abel EL.** Fetal alcohol syndrome in families. *Neurotoxicol Terato*, **1988**; 10(1):1-2.
- 38- **Streissguth AP, Dehaene P.** Fetal alcohol syndrome in twins of alcoholic mothers: Concordance of diagnosis and IQ. *Am J Med Genet*, **1993**; 47(6):857-861.
- 39- **Warren KR, Li TK.** Genetic polymorphisms: Impact on the risk of fetal alcohol spectrum disorders. *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol*, **2005**; 73(4):195-203.
- 40- **Gemma S, Vichi S, Testai E.** Metabolic and genetic factors contributing to alcohol induced effects and fetal alcohol syndrome. *Neurosci Biobehav Rev*, **2007**; 31(2):221-229.
- 41- **Jacobson SW, Carr LG, Croxford J, Sokol RJ, Li TK, Jacobson JL.** Protective effects of the alcohol dehydrogenase-ADH1B allele in children exposed to alcohol during pregnancy. *J Pediatr*, **2006**; 148(1):30-37.

- 42- **Arfsten DP, Silbergeld EK, Loffredo CA.** Fetal ADH2*3, maternal alcohol consumption, and fetal growth. *Int J Toxicol*, **2004**; 23(1):47-54.
- 43- **Viljoen DL, Carr LG, Foroud TM, Brooke L, Ramsay M, Li TK.** Alcohol dehydrogenase-2*2 allele is associated with decreased prevalence of fetal alcohol syndrome in the mixed-ancestry population of the Western Cape province, South Africa. *Alcohol Clin Exp Res*, **2001**; 25(12):1719-1722.
- 44- **Zuccolo L, Fitz-Simon N, Gray R, Ring SM, Sayal K, Smith GD, Lewis SJ.** A non-synonymous variant in *ADH1B* is strongly associated with prenatal alcohol use in a European sample of pregnant women. *Hum Mol Genet*, **2009**; 18(22):4457-4466.
- 45- **Shukla SD, Velazquez J, French SW, Lu SC, Ticku MK, Zakhari S.** Emerging role of epigenetics in the actions of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, **2008**; 32(9):1525-1534.
- 46- **Guerra C, Bazinet A, Riley EP.** Foetal alcohol spectrum disorders and alterations in brain and behaviour. *Alcohol Alcohol*, **2009**; 44(2):108-114.
- 47- **Moonat S, Starkman BG, Sakharkar A, Pandey SC.** Neuroscience of alcoholism: molecular and cellular mechanisms. *Cell Mol Life Sci*, **2010**; 67(1):73-88.
- 48- **Sulik KK.** Genesis of alcohol-induced craniofacial dysmorphism. *Exp Biol Med*, **2005**; 230(6):366-375.
- 49- **Hard ML, Abdolell M, Robinson BH, Koren G.** Gene-expression analysis after alcohol exposure in the developing mouse. *J Lab Clin Med*, **2005**; 145(1):47-54.
- 50- **Liu Y, Balaraman Y, Wang G, Nephew KP, Zhou FC.** Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation. *Epigenetics*, **2009**; 4(7):500-511.
- 51- **Kaminen-Ahola N, Ahola A, Maga M, Mallitt KA, Fahey P, Cox TC, Whitelaw E, Chong S.** Maternal ethanol consumption alters the epigenotype and the phenotype of offspring in a mouse model. *PLoS Genet*, **2010**; 6(1):e1000811.
- 52- **Green ML, Singh AV, Zhang Y, Nemeth KA, Sulik KK, Knudsen TB.** Reprogramming of genetic networks during initiation of the fetal alcohol syndrome. *Dev Dyn* **2007**; 236(2):613-631.
- 53- **Wang G, Wang X, Wang Y, Yang JY, Li L, Nephew KP, Edenberg HJ, Zhou FC, Liu Y.** Identification of transcription factor and microRNA binding sites in responsible to fetal alcohol syndrome. *BMC Genomics*, **2008**; 9(1):1471-2164.
- 54- **Yamada Y, Nagase T, Nagase M, Koshima I.** Gene expression changes of sonic hedgehog signaling cascade in a mouse embryonic model of fetal alcohol syndrome. *J Craniofac Surg*, **2005**; 16(6):1055-1061.
- 55- **Iqbal U, Brien JF, Banjanin S, Andrews MH, Matthews SG, Reynolds JN.** Chronic prenatal ethanol exposure alters glucocorticoid signalling in the hippocampus of the postnatal guinea pig. *J Neuroendocrinol*, **2005**; 17(9):600-608.

- 56- **Chen L, Zhang T, Nyomba BL.** Insulin resistance of gluconeogenic pathways in neonatal rats after prenatal ethanol exposure. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, **2004**; 286(3):554-559.
- 57- **Bird A.** Perceptions of epigenetic. *Nature*, **2007**; 447(7143): 396–398.
- 58- **Philip H.** Special report: 'What genes remember' by Philip Hunter |Prospect Magazine May 2008 issue 146". *Web.archive.org*, **2008**.
- 59- **Ledford H.** Disputed definitions. *Nature*, **2007**; 455(7216): 1023-1028.
- 60- **Bird AP.** CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*, **1986**;321(6067):209–213.
- 61- **Wilson GG, Murray NE.** Restriction and modification systems. *Annu Rev Genet*, **1991**; 25:585–627
- 62- **Bird A.** DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*, **2002**; 16(1):6–21
- 63- **Shukla SD, Velazquez J, French SW, Lu SC, Ticku MK, Zakhari S.** Emerging role of epigenetics in the actions of alcohol. *Alcohol Clin Exp Res*, **2008**; 32(9):1525–1534.
- 64- **Arney KL, Fisher AG.** Epigenetic aspects of differentiation. *J Cell Sci*, **2004**; 117(19):4355–4363.
- 65- **Hsieh J, Gage FH.** Epigenetic control of neural stem cell fate. *Curr Opin Genet Dev*, **2004**; 14(5):461–469.
- 66- **Cheung P, Lau P.** Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. *Mol Endocrinol*, **2005**; 19(3):563–573.
- 67- **Reik W, Dean W, Walter J.** Epigenetic reprogramming in mammalian development. *Science*, **2001**; 293(5532):1089–1093.
- 68- **Kurukuti S, Tiwari VK, Tavoosidana G, Pugacheva E, Murrell A, Zhao Z, Lobanenko V, Reik W, Ohlsson R.** CTCF binding at the H19 imprinting control region mediates maternally inherited higher-order chromatin conformation to restrict enhancer access to *Igf2*. *Proc Natl Acad Sci*, **2006**; 103(28):10684–10689.
- 69- **Guy J, Hendrich B, Holmes M, Martin JE, Bird A.** A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat Genet*, **2001**; 27(3): 322–326.
- 70- **Li E.** Chromatin modification and epigenetic reprogramming in mammalian development. *Nat Rev Genet*, **2002**; 3(9): 662–673.
- 71- **Hendrich B, Guy J, Ramsahoye B, Wilson VA, Bird A.** Closely related proteins MBD2 and MBD3 play distinctive but interacting roles in Mouse development. *Genes Dev*, **2001**; 15(6): 710–723.

- 72- **Moazed D.** Small RNAs in transcriptional gene silencing and genome defence. *Nature*, **2009**; 457(7228): 413–420.
- 73- **Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC.** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **1998**;19(391): 806–811.
- 74- **Cooney CA, Dave AA, Wolff GL.** Maternal methyl supplements in mice affect epigenetic variation and DNA methylation of offspring. *J Nutr*, **2002**; 132(8):2393–2400.
- 75- **Waterland RA, Jirtle RL.** Transposable elements: targets for early nutritional effects on epigenetic gene regulation. *Mol Cell Biol*, **2003**; 23(15): 5293–5300.
- 76- **Garro AJ, McBeth DL, Lima V, Lieber CS.** Ethanol consumption inhibits fetal DNA methylation in mice: implications for the fetal alcohol syndrome. *Alcohol Clin Exp Res*, **1991**; 15(3):395–398.
- 77- **Anway MD, Cupp AS, Uzumcu M, Skinner MK.** Epigenetic transgenerational actions of endocrine disruptors and male fertility. *Science*, **2005**; 308(5727):1466–1469.
- 78- **Newbold RR, Padilla-Banks E, Jefferson WN.** Adverse effects of the model environmental estrogen diethylstilbestrol are transmitted to subsequent generations. *Endocrinology*, **2006**; 147(6):11–17.
- 79- **Thompson SL, Konfortova G, Gregory RI, Reik W, Dean W, Feil R.** Environmental effects on genomic imprinting in mammals. *Toxicol Lett*, **2001**; 120(1):143–150.
- 80- **Wu Q, Ohsako S, Ishimura R, Suzuki JS, Tohyama C.** Exposure of mouse preimplantation embryos to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) alters the methylation status of imprinted genes H19 and Igf2. *Biol Reprod*, **2004**; 70(6):1790–1797.
- 81- **Weaver IC, Cervoni N, Champagne FA, D’Alessio AC, Sharma S, Seckl JR, Dymov S, Szyf M, Meaney MJ.** Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat Neurosci*, **2004**; 7(8):847–854.
- 82- **Hajkova P, Erhardt S, Lane N, Haaf T, El-Maarri O, Reik W, Walter J, Surani MA.** Epigenetic reprogramming in mouse primordial germ cells. *Mech Dev*, **2002**; 117(1):15–23.
- 83- **Bai S, Ghoshal K, Datta J, Majumder S, Yoon SO, Jacob ST.** DNA methyltransferase 3b regulates nerve growth factor-induced differentiation of PC12 cells by recruiting histone deacetylase 2. *Mol Cell Biol*; **2005**; 25(2):751–766.
- 84- **Fan G, Martinowich K, Chin MH, He F, Fouse SD, Hutnick L, Hattori D, Ge W, Shen Y, Wu H, ten Hoeve J, Shuai K.** DNA methylation controls the timing of astroglialogenesis through regulation of JAK-STAT signaling. *Development*, **2005**; 132(15):3345–3356.
- 85- **Eckhardt F, Lewin J, Cortese R, Rakyan VK, Attwood J, Burger M, Burton J, Cox TV, Davies R, Down TA, Haefliger C, Horton R.** DNA methylation profiling of human chromosomes 6, 20 and 22. *Nat Genet*, **2006**; 38(12):1378–1385.

- 86- **Jones PA, Takai D.** The Role of DNA Methylation in Mammalian Epigenetics. *Science*, **2001**; 293(5532): 1068-1070 .
- 87- **Bhutani N, Burns D, Blau M:** DNA Demethylation Dynamics. *Cell*, **2011**; 146(6): 866-872.
- 88- **Wu SC, Zhang Y.** Active DNA demethylation: many roads lead to Rome. *Nature reviews. Molecular cell biology*, **2010**; 11(9): 607-620.
- 89- Inoue A, Zhang Y. Replication-dependent loss of 5-hydroxymethylcytosine in mouse preimplantation embryos. *Science*, **2011**; 334(6053):194.
- 90- **Iqbal K, Jin SG, Pfeifer GP, Szabo PE.** Reprogramming of the paternal genome upon fertilization involves genome-wide oxidation of 5-methylcytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **2011**; 108(9), 3642-3647.
- 91- **Wu H, D'alessio AC, Ito S.** Genome-wide analysis of 5-hydroxymethylcytosine distribution reveals its dual function in transcriptional regulation in mouse embryonic stem cells. *Genes Dev*, **2011**; 25(7), 679-684.
- 92- **Szulwach KE, Li X, Li Y.** 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature neuroscience*, 2011; 14(12):1607-1616.
- 93- **Pastor WA, Pape UJ, Huang Y.** Genome-wide mapping of 5-hydroxymethylcytosine in embryonic stem cells. *Nature*, **2011**;473(7347): 394-397.
- 94- **Williams K, Christensen J, Pedersen MT.** TET1 and hydroxymethylcytosine in transcription and DNA methylation fidelity. *Nature*, **2011**; 473(7347):343-348.
- 95- **Stroud H, Feng S, Morey Kinney S, Pradhan S, Jacobsen SE.** 5-Hydroxymethylcytosine is associated with enhancers and gene bodies in human embryonic stem cells. *Genome biology*, **2011**; 12(6): 54.
- 96- **Yildirim O, Li R, Hung JH.** Mbd3/NURD complex regulates expression of 5-hydroxymethylcytosine marked genes in embryonic stem cells. *Cell*, **2011**; 147(7): 1498-1510.
- 97- **Morgan HD, Santos F, Green K, Dean W, Reik W.** Epigenetic reprogramming in mammals. *Human molecular genetics*, **2005**;14(1): 47-58.
- 98- **Lister R, Pelizzola M, Downen RH.** Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature*, **2009**; 462(7271), 315-322.
- 99- **Salvaing J, Aguirre-Lavin T, Boulesteix C, Lehmann G, Debey P, Beaujean N.** 5-Methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine spatiotemporal profiles in the mouse zygote. *PloS one*, **2012**, 7(5) e38156.
- 100- **Zhou FC, Chen Y, Love A.** Cellular DNA methylation program during neurulation and its alteration by alcohol exposure. *Birth Defects Res A Clin Mol Terato*, **2011**;91(8), 703-715.

- 101- **Liu Y, Balaraman Y, Wang G, Nephew KP, Zhou FC:** Alcohol exposure alters DNA methylation profiles in mouse embryos at early neurulation. *Epigenetic*, **2009**; 4(7): 500-511.
- 102- **Zhou FC, Balaraman Y, Teng M, Liu Y, Singh RP, Nephew KP.** Alcohol Alters DNA Methylation Patterns and Inhibits Neural Stem Cell Differentiation. *Alcohol Clin Exp Re*, **2011**;35(4): 735-746.
- 103- **Khare T, Pai S, Koncevicius K.** 5-hmC in the brain is abundant in synaptic genes and shows differences at the exon-intron boundary. *Nature structural & molecular biology*, **2012**; 19(10):1037-1043.
- 104- **Halsted CH, Villanueva JA, Devlin AM, Niemela O, Parkkila S, Garrow TA, Wallock LM, Shigenaga MK, Melnyk S, James SJ.** Folate deficiency disturbs hepatic methionine metabolism and promotes liver injury in the ethanol-fed micropig. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2002**; 99(15):10072–10077.
- 105- **Bielawski DM, Zaher FM, Svinarich DM, Abel EL.** Paternal alcohol exposure affects sperm cytosine methyltransferase messenger RNA levels. *Alcohol Clin Exp Res*, **2002**; 26(13):347–351.
- 106- **Pietrzykowski AZ, Friesen RM, Martin GE, Puig SI, Nowak CL, Wynne PM, Siegelmann HT, Treisman SN.** Posttranscriptional regulation of BK channel splice variant stability by miR-9 underlies neuroadaptation to alcohol. *Neuron*, **2008**; 59(2):274–287.
- 107- **Cravo ML, Gloria LM, Selhub J, Nadeau MR, Camilo ME, Resende MP, Cardoso JN, Leitao CN, Mira FC.** Hyperhomocysteinemia in chronic alcoholism: correlation with folate, vitamin B-12, and vitamin B-6 status. *Am J Clin Nutr*, **1996**; 63(2):220–224.
- 108- **Molnár Z, Métin C, Stoykova A, Tarabykin V, Price DJ, Francis F, Meyer G, Dehay C, Kennedy H.**Comparative aspects of cerebral cortical development. *Eur J Neurosci*, **2006**; 23(4):921–934.
- 109- **Krubitzer L.** The magnificent compromise: cortical field evolution in mammals. *Neuron* 2007;56(2):201–208.
- 110- **Bystron I, Blakemore C, Rakic P.** Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. *Nat Rev Neurosci*, **2008**; 9(2):110–122.
- 111- **Monuki ES, Walsh CA.** Mechanisms of cerebral cortical patterning in mice and humans. *Nat Neurosci*, **2001**; 4:1199–1206.
- 112- **Rakic P.** A century of progress in corticogenesis: from silver impregnation to genetic engineering. *Cereb Cortex*, **2006**; 16(1):3–17.
- 113- **Kriegstein A, Noctor S, Martínez-Cerdeño V.** Patterns of neural stem and progenitor cell division may underlie evolutionary cortical expansion. *Nat Rev Neurosci*, **2006**; 7(11):883–890.
- 114- **Kriegstein AR, Götz M.** Radial glia diversity: a matter of cell fate. *Glia*, **2003**; 43(1):37–43.

- 115- **Rakic P.** Developmental and evolutionary adaptations of cortical radial glia. *Cereb Cortex* **2000**;13(6):541–549.
- 116- **Götz M, Huttner WB.** The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **2005**; 6(10):777–788.
- 117- **Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Ivic L, Kriegstein AR.** Cortical neurons arise in symmetric and asymmetric division zones and migrate through specific phases. *Nat Neurosci*, **2004**; 7(2):136–144.
- 118- **Haubensak W, Attardo A, Denk W, Huttner WB.** Neurons arise in the basal neuroepithelium of the early mammalian telencephalon: a major site of neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**; 101(9):3196–3201.
- 119- **Miyata T, Kawaguchi A, Saito K, Kawano M, Muto T, Ogawa M.** Asymmetric production of surfacedividing and non-surface-dividing cortical progenitor cells. *Development*, **2004**; 131(13):3133–3145.
- 120- **Hatakeyama J, Bessho Y, Katoh K, Ookawara S, Fujioka M, Guillemot F, Kageyama R.** Hes genes regulate size, shape and histogenesis of the nervous system by control of the timing of neural stem cell differentiation. *Development*, **2004**; 131(22):5539–5550.
- 121- **Cappello S, Attardo A, Wu X, Iwasato T, Itohara S, Wilsch-Bräuninger M, Eilken HM, Rieger MA, Schroeder TT, Huttner WB.** The Rho-GTPase cdc42 regulates neural progenitor fate at the apical surface. *Nat Neurosci*, **2006**; 9(9):1099–1107.
- 122- **Lien WH, Klezovitch O, Fernandez TE, Delrow J, Vasioukhin V.** AlphaE-catenin controls cerebral cortical size by regulating the hedgehog signaling pathway. *Science*, **2006a**; 311(5767):1609–1612.
- 123- **Chenn A, McConnell SK.** Cleavage orientation and the asymmetric inheritance of Notch1 immunoreactivity in mammalian neurogenesis. *Cell*, **1995**; 82(4):631–641.
- 124- **Buchman JJ, Tsai LH.** Spindle regulation in neural precursors of flies and mammals. *Nat Rev Neurosci*, 2007; 8(2):89–100.
- 125- **Attardo A, Calegari F, Haubensak W, Wilsch-Bräuninger M, Huttner WB.** Live imaging at the onset of cortical neurogenesis reveals differential appearance of the neuronal phenotype in apical versus basal progenitor progeny. *PLoS ONE*, **2008**; 3(6):e2388.
- 126- **Noctor SC, Martínez-Cerdeño V, Kriegstein AR.** Distinct behaviors of neural stem and progenitor cells underlie cortical neurogenesis. *J Comp Neurol*, **2008**; 508(1):28–44.
- 127- **Martínez-Cerdeño V, Noctor SC, Kriegstein AR.** The role of intermediate progenitor cells in the evolutionary expansion of the cerebral cortex. *Cereb Cortex*, **2006**; 16(1):152–161.
- 128- **Tarabykin V, Stoykova A, Usman N, Gruss P.** Cortical upper layer neurons derive from the subventricular zone as indicated by Svet1 gene expression. *Development*, **2001**; 128(11):1983–1993.

- 129- **Cubelos B, Sebastián-Serrano A, Kim S, Moreno-Ortiz C, Redondo JM, Walsh CA, Nieto M.** Cux-2 controls the proliferation of neuronal intermediate precursors of the cortical subventricular zone. *Cereb Cortex*, **2007**; 18(8):1758–1770.
- 130- **Englund C, Fink a, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone a, Kowalczyk T, Hevner RF.** Pax6, Tbr2, and Tbr1 are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci*, **2005**; 25(1):247–251.
- 131- **Britz O, Mattar P, Nguyen L, Langevin LM, Zimmer C, Alam S, Guillemot F, Schuurmans C.** A role for proneural genes in the maturation of cortical progenitor cells. *Cereb Cortex* **2006**; 16(1):138–151.
- 132- **Russ AP, Wattler S, Colledge WH, Aparicio SA, Carlton MB, Pearce JJ, Barton SC, Surani MA, Ryan K, Nehls MC.** Eomesodermin is required for mouse trophoblast development and mesoderm formation. *Nature*, **2000**; 404(6773):95–99.
- 133- **Strumpf D, Mao CA, Yamanaka Y, Ralston A, Chawengsaksophak K, Beck F, Rossant J.** Cdx2 is required for correct cell fate specification and differentiation of trophectoderm in the mouse blastocyst. *Development*, **2005**; 132(9):2093–2102.
- 134- **Sessa A, Mao CA, Hadjantonakis AK, Klein WH, Broccoli V.** Tbr2 directs conversion of radial glia into basal precursors and guides neuronal amplification by indirect neurogenesis in the developing neocortex. *Neuron*, **2008**; Oct 9; 60(1):56–69.
- 135- **Zecevic N, Chen Y, Filipovic R.** Contributions of cortical subventricular zone to the development of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol*, **2001**; 491(2):109–122.
- 136- **Letinic K, Zoncu R, Rakic P.** Origin of GABAergic neurons in the human neocortex. *Nature*, **2002**; 417(6889):645–649.
- 137- **Rakic P.** Specification of Cerebral Cortical Areas. *Science*, **1988**; 241(4862):170–176.
- 138- **Liu X, Hashimoto-Torii K, Torii M, Haydar TF, Rakic P.** The role of ATP signaling the migration of intermediate neuronal progenitors to the neocortical subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2008**; 105(33):11802–11807.
- 139- **Pearson RA.** Gap junctions modulate interkinetic nuclear movement in retinal progenitor cells. *J Neurosci*, **2005**; 25(46):10803–10814.
- 140- **Kumada T, Komuro H.** Completion of neuronal migration regulated by loss of Ca²⁺ transients. *Proc Natl Acad Sci USA*, **2004**; 101(22):8479–8484.
- 141- **Komuro H, Rakic P.** Intracellular Ca²⁺ fluctuations modulate the rate of neuronal migration. *Neuron*, **1996**; 17(2):275–285.
- 142- **Komuro H, Rakic P.** Modulation of neuronal migration by NMDA Receptors. *Science*, **1993**; 260(5104):95–97.

- 143- **Striedinger K, Meda P, Scemes E.** Exocytosis of ATP from astrocyte progenitors modulates spontaneous Ca₂₊ oscillations and cell migration. *Glia*, **2007**; 55(6):652–662.
- 144- **Behar TN.** GABA stimulates chemotaxis and chemokinesis of embryonic cortical neurons via calcium-dependent mechanisms. *J Neurosci*, **1996**; 16(5):1808–1818.
- 145- **Owens DF, Kriegstein AR.** Patterns of intracellular calcium fluctuation in precursor cells of the neocortical ventricular zone. *J Neurosci*, **1998**; 18(14):5374–5388.
- 146- **Weissman TA.** Calcium waves propagate through radial glial cells and modulate proliferation in the developing neocortex. *Neuron*, **2004**; 43(5):647–661.
- 147- **Nadarajah B.** Differential expression of connexins during neocortical development and neuronal circuit formation. *J Neurosci*, **1997**; 17(9):3096–3111.
- 148- **Loturco JJ, Kriegstein AR.** Clusters of coupled neuroblasts in embryonic neocortex. *Science*, **1991**; 252(5005):563–566.
- 149- **Gal JS.** Molecular and morphological heterogeneity of neural precursors in the mouse neocortical proliferative zones. *J Neurosci*, **2006**; 26(3):1045-1056.
- 150- **Kostovic I, Rakic P.** Developmental history of the transient subplate zone in the visual and somatosensory cortex of the macaque monkey and human brain. *J Comp Neurol*, **1990**; 297(3):441-470.
- 151- **Allendoerfer KL, Shatz CJ.** The subplate, a transient neocortical structure: its role in the development of connections between thalamus and cortex. *Annu Rev Neurosci*, **1994**; 17:185-218.
- 152- **Kanold PO, Luhmann HJ.** The subplate and early cortical circuits. *Annu Rev Neurosci*, **2010**; 33:23-48.
- 153- **McConnell SK, Ghosh A, Shatz CJ.** Subplate neurons pioneer the first axon pathway from the cerebral cortex. *Science*, **1989**; 245(4921):978-982.
- 154- **Ghosh A, Antonini A, McConnell SK, Shatz CJ.** Requirement for subplate neurons in the formation of thalamocortical connections. *Nature*, **1990**; 347(6289):179-181.
- 155- **Dupont E, Hanganu IL, Kilb W, Hirsch S, Luhmann HJ.** Rapid developmental switch in the mechanisms driving early cortical columnar networks. *Nature*, **2006**; 439(7072):79-83.
- 156- **Yang J-W, Hanganu-Opatz IL, Sun J-J, Luhmann HJ.** Three patterns of oscillatory activity differentially synchronize developing neocortical networks in vivo. *J Neurosci*, . **2009**; 29(28):9011-9025.

- 157- **Kanold PO, Kara P, Reid RC, Shatz CJ.** Role of subplate neurons in functional maturation of visual cortical columns. *Science*, **2003**; 301(5632):521-525.
- 158- **Kanold PO, Shatz CJ.** Subplate neurons regulate maturation of cortical inhibition and outcome of ocular dominance plasticity. *Neuron*, **2006**; 51(5):627-638.
- 159- **Friedlander MJ, Torres-Reveron J.** The changing roles of neurons in the cortical subplate. *Front Neuroanat.* . **2009**; 29(3):193-205.
- 160- **García-Marín V, Blazquez-Llorca L, Rodríguez JR, Gonzalez-Soriano J, DeFelipe J.** Differential distribution of neurons in the gyral white matter of the human cerebral cortex. *J Comp Neurol*, **2010**; 518(23):4740-4759.
- 161- **Kostovic I, Judas M, Sedmak G.** Developmental history of the subplate zone, subplate neurons and interstitial white matter neurons: relevance for schizophrenia. *Int J Dev Neurosci*, **2011**;29(3):193-205.
- 162- **Volpe JJ.** Subplate neurons missing link in brain injury of the premature infant? *Pediatrics*, **1996**; 97(1):112-113.
- 163- **McQuillen PS, Ferriero DM.** Perinatal subplate neuron injury: implications for cortical development and plasticity. *Brain Pathol*, **2005**; 15(3):250-260.
- 164- **Anderson SA, Volk DW, Lewis DA.** Increased density of microtubule associated protein 2-immunoreactive neurons in the prefrontal white matter of schizophrenic subjects. *Schizophr Res*, **1996**; 19(2):111-119.
- 165- **Kirkpatrick B, Messias NC, Conley RR, Roberts RC.** Interstitial cells of the white matter in the dorsolateral prefrontal cortex in deficit and nondeficit schizophrenia. *J Nerv Ment Dis*, **2003**;191(19):563-567.
- 166- **Eastwood SL, Harrison PJ.** Interstitial white matter neuron density in the dorsolateral prefrontal cortex and parahippocampal gyrus in schizophrenia. *Schizophr Res*, **2005**; 79(2):181-188.
- 167- **Simms ML, Kemper TL, Timbie CM, Bauman ML, Blatt GJ.** The anterior cingulate cortex in autism: heterogeneity of qualitative and quantitative cytoarchitectonic features suggests possible subgroups. *Acta Neuropathol*, **2009**; 118(5):673-684.
- 168- **Kwan KY, Lam MMS, Krsnik Z, Kawasawa YI, Lefebvre V, Sestan N.** SOX5 postmitotically regulates migration, postmigratory differentiation, and projections of subplate and deep-layer neocortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **2008**; 105(41):16021-16026.
- 169- **Osheroff H, Hatten ME.** Gene expression profiling of preplate neurons destined for the subplate: genes involved in transcription, axon extension, neurotransmitter regulation, steroid hormone signaling, and neuronal survival. *Cereb Cortex*, **2009**; 19(1):126-134.
- 170- **Hoerder-Suabedissen A, Wang WZ, Lee S, Davies KE, Goffinet AM, Rakic S, Parnavelas J, Reim K, Nicolic M, Paulsen O.** Novel markers reveal subpopulations of subplate neurons in the murine cerebral cortex. *Cereb Cortex*, **2009**;19(8):1738-1750.

- 171- **Livy DJ, Elberger AJ.** Alcohol exposure during the first two trimesters-equivalent alters the development of corpus callosum projection neurons in the rat. *Alcohol*, 2008;42(4):285-293.
- 172- **Szulwach KE, Li X, Li Y.** 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nature neuroscience*, 2011; 14(12):1607-1616.
- 173- **Englund C, Fink A, Lau C, Pham D, Daza RA, Bulfone A, Kowalczyk T, Hevner RF.** *Pax6*, *Tbr2*, and *Tbr1* are expressed sequentially by radial glia, intermediate progenitor cells, and postmitotic neurons in developing neocortex. *J Neurosci*, 2005; 25(1):247-251.
- 174- **Li E, Bestor TH, Jaenisch R.** Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 1992; 69(6):915-926.
- 175- **Biniszkiewicz D, Gribnau J, Ramsahoye B, Gaudet F, Eggan K, Humpherys D.** Dnmt1 overexpression causes genomic hypermethylation, loss of imprinting, and embryonic lethality. *Mol Cell Biol*, 2002; 22(7):2124-2135.
- 176- **Cortazar D, Kunz C, Selfridge J, Lettieri T, Saito Y, MacDougall E.** Embryonic lethal phenotype reveals a function of TDG in maintaining epigenetic stability. *Nature*, 2011; 470(7334):419-423.
- 177- **Amir RE, Van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY.** Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet*, 1999; 23(2):185-188.
- 178- **Kishino T, Lalonde M, Wagstaff J.** UBE3A/E6-AP mutations cause Angelman syndrome. *Nat Genet*, 1997; 15(1):70-73.
- 179- **Ohta T, Gray TA, Rogan PK, Buiting K, Gabriel JM, Saitoh S.** Imprinting-mutation mechanisms in Prader-Willi syndrome. *Am J Hum Genet*, 1999; 64(2):397-413.
- 180- **Niculescu MD, Craciunescu CN, Zeisel SH.** Dietary choline deficiency alters global and gene-specific DNA methylation in the developing hippocampus of mouse fetal brains. *FASEB J*, 2006; 20(1):43-49.
- 181- **Ryan SH, Williams JK, Thomas JD.** Choline supplementation attenuates learning deficits associated with neonatal alcohol exposure in the rat: effects of varying the timing of choline administration. *Brain Res*, 2008; 1237:91-100
- 182- **Thomas JD, Idrus NM, Monk BR, Dominguez HD.** Prenatal choline supplementation mitigates behavioral alterations associated with prenatal alcohol exposure in rats. *Birth defects research Part A, Clinical and molecular teratology*, 2010; 88(10):827-837.
- 183- **Monk BR, Leslie FM, Thomas JD.** The effects of perinatal choline supplementation on hippocampal cholinergic development in rats exposed to alcohol during the brain growth spurt. *Hippocampus*, 2012; 22(8):1750-1757.

ÖZGEÇMİŞ

05.07.1983 tarihinde İzmir ilinde doğdu. Liseyi Mersin’de İçel Anadolu Lisesi’nde tamamladı. 2002 yılında İstanbul Üniversitesi Fen-Edebiyat Fakültesi Biyoloji bölümünde lisans eğitimine başladı ve 2006 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda yüksek lisans eğitimine başladı ve 2008 yılında mezun oldu. Aynı yıl Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda doktora eğitimine başladı. 2006 yılından beri Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda Araştırma Görevlisi olarak görev yapmaktadır. Halen Mersin Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Anatomi Anabilim Dalı’nda doktora öğrencisi olarak öğrenimine devam etmektedir.