

Nörogenez Belirteci Olan Doublecortin Proteininin Elektron Mikroskopik Düzeyde Gösterilmesi

Demonstration of Doublecortin Protein, a Neurogenesis Marker, at the Electron Microscopic Level

Özlem Tuğçe Çilingir Kaya¹, Cynthia Moore², Charles Meshul³, Serap Şirvancı¹

¹Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Veterans Affairs Medical Center, Research Services, Portland - Oregon, USA

³Department of Behavioral Neuroscience, Oregon Health and Science University, Portland-Oregon, USA

Öz

Amaç: Yetişkin beyinde yeni oluşan nöronların gösterilmesi nörogenez sürecinin aydınlatılması açısından önem taşımaktadır. Çalışmamızda hipokampusun dentat girus (DG) bölgesinde, yeni oluşan nöron belirteci olan doublecortin (DCX) proteini için uygun gömme öncesi mikrodalga işaretleme metodu oluşturmayı amaçladık.

Yöntemler: 10 haftalık C57BJ/6J erkek farelerden perfüzyon fiksasyonu ile beyin dokuları elde edildi. Vibratom ile beyin dokularından alınan kesitler, gömme öncesi mikrodalga yöntemi ile anti-DCX antikoru ile işaretlendi. 3,3'-diaminobenzidin (DAB) ile boyanan dokular, mikrodalga yardımı ile elektron mikroskopik analizler için hazırlandı. Epon bloklar üzerindeki dokulardan ince kesitler alınarak elektron mikroskobunda incelendi ve morfolojik analiz için fotoğraflandı.

Bulgular: Mikrodalga yöntemi kullanılarak yapılan gömme öncesi DCX işaretlemesi hem ışık hem de elektron mikroskopik (EM) düzeyde spesifik olarak gösterildi. DCX pozitif hücrelerin subgranüler zon (SGZ) ve granüler tabakada yerleşim gösterdikleri izlendi. Elektron mikroskopik incelemelerde DCX immünreaktivitesinin aksyon, dendrit ve hücre gövdeleri üzerinde pozitif olduğu gözlemlendi.

Sonuç: Çalışmamızda, mikrodalga kullanılarak yapılan gömme öncesi immün-elektron yöntemi ile DG bölgesinde DCX varlığının belirlenebildiğini gösterdik. Çalışmamız DCX immünreaktif hücreleri, gömme öncesi DAB işaretlemesi ile elektron mikroskopik düzeyde göstererek, nörogenez sürecinin araştırılacağı ileri çalışmalar için temel oluşturmaktadır.

Anahtar Kelimeler: Nörogenez, doublecortin, gömme öncesi mikrodalga tekniği, immün-elektron mikroskopi

Abstract

Objective: Demonstration of newly born neurons in adult brains is an important issue in terms of elucidating neurogenesis. In our study, we aimed to develop an appropriate pre-embedding microwave labeling method for the newly born neuronal marker doublecortin (DCX) protein in the hippocampal dentate gyrus (DG) region.

Methods: Brains were obtained from 10-week-old C57BJ/6J male mice by perfusion fixation. Vibratome sections from brain tissues were labeled with an anti-DCX antibody using a pre-embedding microwave method. Sections stained with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) were prepared for electron microscopic (EM) analyses using a microwave. After embedding in Epon, thin sections were obtained, observed under an electron microscope, and photographed for morphological assessments.

Results: DCX labeling performed using the pre-embedding microwave method was specifically demonstrated at both light and electron microscopic levels. DCX-positive cells were localized at the subgranular zone and granular layer. Electron microscopic observations showed that DCX immunoreactivity was positive at the axons, dendrites, and somata.

Conclusion: We demonstrated that the existence of DCX can be determined using the pre-embedding microwave labeling as an immunoelectron method in the DG region. Our study provides a basis for further studies on neurogenesis aiming to show DCX-immunoreactive cells using the pre-embedding DAB labeling method at the electron microscopic level.

Keywords: Neurogenesis, doublecortin, pre-embedding microwave technique, immunoelectron microscopy

GİRİŞ

Nörogenez Nedir?

Nörogenez, öncül hücrelerden fonksiyonel nöronların oluşma süreci olarak tanımlanmaktadır. Geleneksel olarak sadece embriyonik ve perinatal dönemlerde olduğu bilinen bu olgu, Altman ve arkadaşlarının öncül çalışması ile postnatal (PN) sıçan hipokampus dentat granül hücrelerinde (DGH) de gösterilmiştir (1,2). Devam eden çalışmalar ile yeni oluşan bu nöronların yetişkin merkezi sinir sistemine (MSS) entegrasyonu belirlenmiş ve multipotent nöral kök hücreler (NKH) yetişkin memeli beyinden izole edilmiştir (3, 4). Metodolojik alanlarda yaşanan gelişmeler ile birlikte, neredeyse tüm memelilerde yaşam boyu devam eden nörogenez belirlenmiştir (5).

Yetişkin beyinde olfaktör bölge ve hipokampus, nörogenezin devam ettiği iki bölge olarak kabul edilmektedir. Öncül hücreler hipokampusu dentat girusun (DG) subgranüler tabakasında bulunmakta ve buradan granüler tabakaya göç etmektedir (6).

Nörojenез sürecinin Parkinson, Huntington ve Alzheimer gibi birçok nörodejeneratif hastalıkla ilişkili olduğu belirtilmektedir (7). Normal ve patolojik koşullarda nörojenез sürecini araştıran çalışmalar hem birçok temel soruyu yanıtlayabilmek, hem de kök hücre prensipleri, nöral gelişim, yapısal plastisite ve hastalık mekanizmalarını belirleyebilmek ve modelleyebilmek açısından önem taşımaktadır (8).

Doublecortin (DCX) Nedir?

Doublecortin, mikrotübül bağımlı bir fosfoproteindir. Bu proteinin, gelişen ve yetişkin memeli beyinde, gelişimlerinin sınırlı bir süresince göç eden nöroblastlar tarafından eksprese edildiği belirlenmiştir (9, 10). DCX nöronal morfogenez süresince mikrotübül stabilizasyonunu sağlamada, nöronal göç boyunca nükleer translokasyon sürecinde ve aynı zamanda da büyüme konisi dinamikleri için kritik öneme sahiptir (9-13). DCX, nöronal yapısal plastisite ve göç, aksonal rehberlik ve dendrit dallanması ile ilgili morfolojik değişimlerle de bağlantılıdır. Kemirgen sinir sisteminde, DCX ekspresyonu hızlı bölünen öncül hücrelerce indüklenmekte ve yaklaşık 30 gün boyunca salınmaya devam ederek nöronal olgunlaşma sonrasında sonlanmaktadır. Olgun nöronal belirteçlerin, yeni oluşan hücreler tarafından üretilmeye başlamasıyla ise DCX ekspresyonu keskin bir biçimde düşüş göstermektedir (10).

DCX yetişkin DG'de, proliferatif öncül hücre evresinden (tip 2b ve tip 3) postmitotik evreye kadar (olgunlaşmamış nöron) eksprese edilirken, olgun granül hücresinde DCX ekspresyonu bulunmaz (10). DCX immünreaktivitesi hücre gövdesi ve DG moleküler tabakasına uzanan granül hücre dendritik uzantılarında görülür (14).

Sinirbilimde İmmünsitokimyasal Tekniklerin Kullanımı

Elli yıldan daha uzun bir süre önce elektron mikroskopunun keşfi ile MSS yapısının anlaşılması radikal olarak değişim göstermiştir. Aynı zamanda immünsitokimya tekniklerinin gelişmesi ile de doku kesitlerinde protein yerleşimleri ışık mikroskopik seviyede gösterilmeye başlanmıştır. Günümüzde ise gömme öncesi ve sonrası immün-elektron mikroskopi yöntemleri ile elektron mikroskopunun büyüme gücü birlikte kullanılabilir. Elektron-yoğun işaretleyicilerin (ferritin, uranyum vb) veya altın partiküllerinin kullanılması ile proteinlerin lokalizasyonu belirlenebilmekte, miktarı sayısal olarak tespit edilebilmekte ve mikroçevre ile ilişkisi incelenebilmektedir (15).

İmmünsitokimyasal tekniklerin temel prensibi, hedef proteinin antikor ile direkt veya indirekt olarak işaretlenerek ışık veya elektron mikroskopunda görünür hale gelmesini sağlamaktır (16, 17). 1941 yılındaki öncü çalışma ile doku kesitlerindeki antijenler, floresan boya ile işaretli antikorlar ile tespit edilmiştir (18). Bu noktadan sonra çalışmalar birkaç farklı yönde ilerlemeye başlamıştır (16, 17). Farklı fiksasyon ve gömme yöntemleri geliştirilmiş, antikora bağlı işaretleme tekniklerinde ilerleme kaydedilmiştir (15, 19).

Gömme öncesi işaretleme metodu, dokulara fiksasyondan sonra uygulanır ve moleküllerin antijenitesi ile birlikte morfolojisi de iyi derecede korunur. Bu yöntemin önemli avantajlarından birisi, örnekleri dokulardaki hedef proteinleri maskeleyebilen tehlikeli kimyasallardan korumasıdır. Buna ek olarak, immün-ışaretlemenin ardından örneklerle elektron mikroskopik takip uygulanarak hücresel ince yapının ileri düzeyde korunması sağlanır (20).

3,3'-diaminobenzidin (DAB), immünohistokimya ve immün-blotlama yöntemlerinde sıklıkla kullanılan bir kromojendir. DAB'nin oksidas-

yonu, elektron mikroskopunda yüksek kontrast veren ozmiyofilik bir polimer oluşturur. Organik çözücülerde çözünmeyen bu sitokimyasal ürün, uzun yıllar boyunca kalıcıdır ve farklı enzim aktivitelerinin lokalizasyonlarını belirlemede kullanışlıdır. Ozmiyum tetraoksit postfiksasyonu ile enzim reaksiyon ürünü yoğunlaştırılabilir (21). Bu özelliklerinden dolayı DAB, ışık ve elektron mikroskopik çalışmalarda tercih edilir.

Son yıllarda Jimenez ve arkadaşları tarafından kullanılan mikrodalga yöntemi ise hem işlem süresini kısaltmış hem de boyanma kalitesini arttırmıştır (22). Beyin dokusunda mikrodalga tekniği kullanılarak yapılan gömme öncesi DAB işaretlemesi, hem ışık hem de elektron mikroskopunda görüntü elde edebilmeyi sağlamaktadır. Bu yöntemde hem ince-yapı iyi şekilde korunabilmekte, hem de immün-ışaretleme güçlendirilmektedir. Gömme öncesi mikrodalga işaretlemesinde, klasik metodlar ile 2-3 gün süren işlem bir güne indirilmektedir. Bunun yanı sıra, ince-yapıyı olumsuz etkileyen deterjan kullanımı da azaltılmaktadır (23).

Biowave® Pro-Microwave sistemi gömme öncesi immünohistokimya, elektron mikroskopi ve ikili immün-ışaretleme için önemli bir basamak olmuştur. ColdSpot® vakum ve çeşitli elektriksel güç miktarlarının kullanılması, gömme öncesi işaretlemede ve elektron mikroskopik incelemede başarı elde edilmesini sağlamaktadır. Vakum kullanımı ile fiksasyon etkinliği geliştirilmiş, immün-ışaretleme ve rezin infiltrasyonu için gereken süre kısaltılmıştır (23).

Çalışmamızın amacına yönelik olarak, yeni oluşan nöronlarda geçici olarak sentezlenen bir hücre iskeleti proteini olan ve nöronal öncül belirteci olarak kullanılan DCX, mikrodalga kullanımı ile desteklenen gömme öncesi immün-elektron mikroskopik yöntem kullanılarak işaretlenmiştir (10).

YÖNTEMLER

Çalışmamızda C57BJ/6J erkek fareler kullanıldı. Hayvanlar ısı kontrolü odada (20±3°C) 12 saat aydınlık/karanlık döngüsünde tutuldu ve standart diyet ile beslendi. Çalışmamızın etik kurul onayı "Institutional Animal Care and Use Committee" (IACUC)'den #3471-15 numarası ile alındı.

Perfüzyon Fiksasyonu

Farelere ketamin (100 mg/kg; Alfasan International B.V., Woerden, Holland) ve ksilazin hidroklorid (10 mg/kg; Bayer, Barmen, Germany) ile derin anestezi uygulandıktan sonra göğüs kafesi açıldı ve aortadan perfüzyon pompası (ISM831C; Ismatek, Wertheim, Germany) yardımıyla intrakardiyak perfüzyon fiksasyon uygulandı. 5 ml heparin (1000 Ü/ml; 9041081; Philadelphia, USA) ve ardından aralıksız pH=7,4 fiksatif (0,1 M HEPES (7365-45-9; Calbochem, CA, USA) içinde %2,5 glutaraldehit (111-30-8; EMS, PA, USA), %0,5 paraformaldehit (30525-89-4; EMS, PA, USA) ve %0,1 pikrik asit (88-89-1; EMS, PA, USA) solüsyonu) verildi. Sakrifiye edilen hayvanların beyinlerine, aynı solüsyonda +4°C'de gece boyu bekletilerek postfiksasyon uygulandı.

Gömme Öncesi DAB İşaretleme ve Elektron Mikroskopik Takip

Beyin dokularından 70-80 µm kalınlığında vibratom kesitleri alındı (VT 1000S; Leica Nussloch, Germany). Kesitler %1 sodyum borohidrid (16940-66-2; Sigma, Missouri, USA) ile çalkalayıcıda 30 dakika inkübe edildikten sonra PBS (A4417; Sigma, Missouri, USA) ile yıkandı. Bu aşamadan sonraki işlemler mikrodalga (Biowave® Pro-Microwave

Tablo 1. Mikrodalga kullanılarak uygulanan gömme öncesi DAB işaretleme metodunun basamakları

Uygulanan İşlem	Süre	Vakum
Sitrat tampon, pH=9 (Antijen geri kazanımı)	5 dk	Açık
PBS ile yıkama	1 dk	Kapalı
%0,3 Hidrojen peroksit (H ₂ O ₂)	1 dk	Kapalı
PBS ile yıkama	1 dk	Kapalı
%0,5 Triton X-100	5 dk	Açık
Anti-DCX primer antikoru (1:400; ab18723, MA, USA)	37 dk	Açık
PBS ile yıkama	1 dk	Kapalı
Biyotinli sekonder antikoru	15 dk	Açık
PBS/imidazol ile yıkama	1 dk	Kapalı
Avidin/Biyotin Kompleks (ABC)	15 dk	Açık
İmidazol ile yıkama	1 dk	Kapalı
3,3'-diaminobenzidin (DAB)	10 dk	Açık
İmidazol ile yıkama	1 dk	Kapalı
PBS ile yıkama	1 dk	Kapalı
PBS: fosfat tamponlu tuz çözeltisi; DCX: doublecortin		

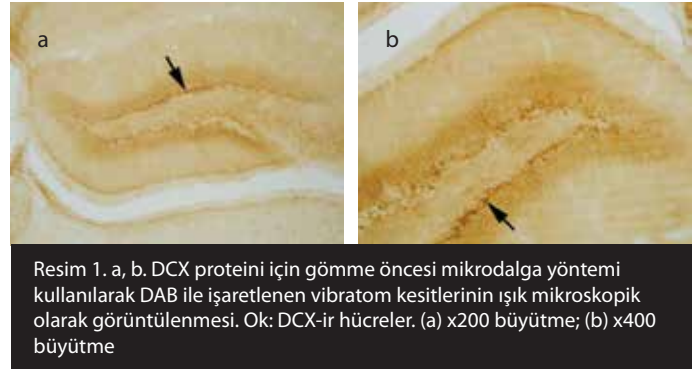
Tablo 2. DAB ile işaretlenen vibratom kesitlerine uygulanan mikrodalga ile elektron mikroskopik takip işlemi

Uygulanan İşlem	Süre	Vakum
Ozmiyum tetraoksit	13 dk	Açık
PBS ile yıkama	1,5 dk	Kapalı
Uranil asetat	6 dk	Açık
%50 etanol	40 sn	Kapalı
%75 etanol	40 sn	Kapalı
%95 etanol	40 sn	Kapalı
%100 etanol	40 sn	Kapalı
%100 etanol	40 sn	Kapalı
Propilen oksit	40 sn	Kapalı
1:1 propilen oksit/epon	3 dk	Açık
%100 epon	9 dk	Açık
PBS: fosfat tamponlu tuz çözeltisi		

System, TedPella Inc., CA, USA) kullanılarak Tablo1'de gösterilen basamaklar halinde gerçekleştirildi.

DAB (Sigma, Missouri, USA) ile işaretlenen kesitlerden bazıları ışık mikroskopik inceleme için lam üzerine alınarak entellan kullanılarak lamel ile kapatıldı. Diğer vibratom kesitlerine ise elektron mikroskopik inceleme için Tablo 2'de gösterilen işlem uygulandı.

Mikrodalga ile elektron mikroskopik takibi tamamlanan dokular, Aclar® (TedPella Inc., CA, USA) filmlerin arasına Epon 812 (45345; Sigma, Missouri, USA) içine gömüldü ve gece boyunca 60°C'de polimerize edildi. İstenilen bölgeler stereomikroskop altında ayrılarak önceden hazırlanan epon doku bloklarına yapıştırıldı. 60 nm kalınlığında ince



kesitler ultramikrotom (Ultracut EM UC7; Leica, Nussloch, Germany) cihazı ile formvar kaplı 100 mesh nikel gridler (FF100-Ni; EMS, PA, USA) üzerine alındı. Doku kesitlerini içeren gridler 30 dk. uranil asetat (6159-44-0; EMS, PA, USA) ile boyandı ve distile su ile yıkandıktan sonra yaklaşık 30 sn-1 dk. boyunca kurşun sitrat (512-26-5; EMS, PA, USA) ile kontrastlandı. Distile su ile yıkanan kesitler kurutulduktan sonra (JEM-1400; JEOL, Tokyo, Japan) geçirimli elektron mikroskopu ile incelendi ve fotoğraflandı (Advanced Microscopy Techniques Corporation, Danvers, MA, USA).

BULGULAR

Yapılan ışık mikroskopik değerlendirmelerde (BX-51; Olympus, Tokyo, Japan), DCX-ir hücrelerin beklendiği gibi subgranüler zonda (SGZ) veya granüler tabaka içerisine yerleşmiş şekilde buldukları görüldü (Resim 1). İşaretlenmenin nükleus ve sitoplazmada pozitif olduğu gözlemlendi.

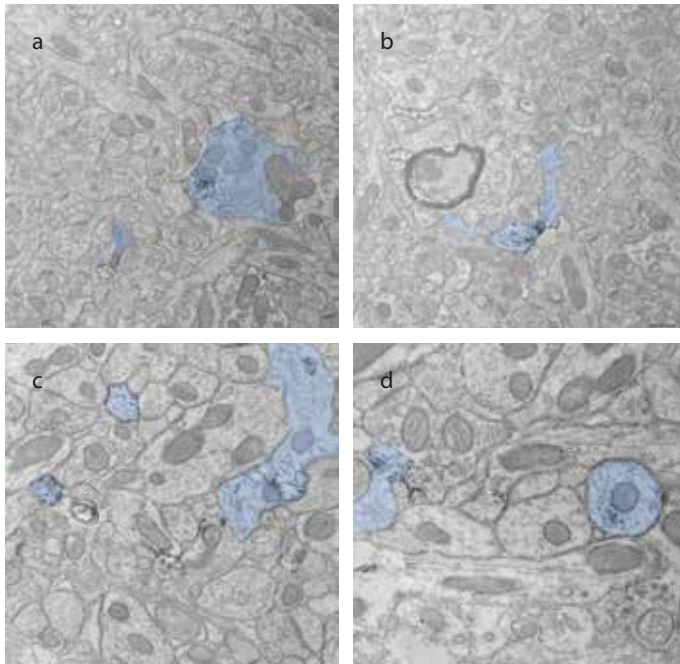
Elektron mikroskopik değerlendirmelerde, DG'nin granüler tabakasında ve SGZ'de görülen DCX (+) nöronların sitoplazma, akson ve dendritlerinde DAB işaretlenmesi görüldü. (Resim 2). SGZ'deki DCX-ir hücrelerin çoğunluğunun yuvarlak ve düzgün şekle sahip çekirdek içerdikleri görüldü.

TARTIŞMA

Çalışmamızda DCX proteininin, gömme öncesi DAB işaretlemesi ile gösterilebilmesi amacıyla mikrodalga kullanılarak spesifik bir metod oluşturuldu. Bu yöntemle 70-80 µm kalınlığındaki vibratom kesitleri, anti-DCX antikoru ile işaretlendi ve bu işaretleme DAB ile görünür hale getirildi. Kesitlerin bir bölümü lama yayılarak ışık mikroskopik olarak görüntülenirken, diğer vibratom kesitlerine ise mikrodalga kullanılarak elektron mikroskopik takip uygulandı. Bu yöntemde mikrodalga kullanılarak, klasik gömme öncesi işaretlemelere kıyasla hem ince yapının daha iyi korunması sağlandı hem de işlem süresi oldukça kısaltılmış oldu.

Çalışmamız ile, DCX-ir hücrelerin SGZ'de veya granüler tabaka içinde yerleşim gösterdiği ve işaretlenmenin nükleus ve sitoplazmada pozitif olduğu belirlenmiştir. DCX işaretlenmesi görülen bölgelerin önceki çalışmalar ile uyumluluk göstermesi, uyguladığımız yöntemin spesifikliğini desteklemektedir (24, 25).

Yaptığımız elektron mikroskopik incelemelerde, SGZ'deki DCX-ir hücrelerin büyük çoğunluğunun yuvarlak ve düzgün şekilli çekirdeğe sahip oldukları gözlemlendi. Bu bulgumuz önceki yıllarda yapılan çalışmalarla uyumluluk göstermektedir (26, 27).



Resim 2. a, d. DCX proteini için uygulanan gömme öncesi DAB işaretlemesinin elektron mikroskopik seviyede görüntülenmesi. Mavi işaretli bölgeler: DAB ile işaretlenen DCX-ir profiller. Barlar: 500 nm. (a) x200 büyütme; (b) x5000 büyütme; (c) x8000 büyütme; (d) x12000 büyütme

Nörogenез sürecinin görüntülenmesi için nöral öncül hücreleri hedefleyen yeni metodların geliştirilmesine ihtiyaç vardır. Çalışmamızda nöral öncül hücre belirteci olan DCX proteinini, C57BJ/6J farelerin hipokampusunda, hem ışık hem de elektron mikroskopik seviyede gösterebilmek için gömme öncesi mikrodalga yöntemi oluşturuldu.

Günümüze kadar uygulanan yöntemler, yeni oluşan hangi nöronun mevcut döngüye katıldığı konusunu açıklığa kavuşturmamaktadır. Yeni oluşan nöronların nasıl aktive olduğunun belirlenmesi için yeni nöronal ağ çalışmaları gerekmektedir (28).

İnce-yapısal düzeyde immün-ışaretlemenin başarısı birçok faktöre bağlıdır. İnce-yapının antijeniteyi bozmadan korunması proteinin lokalizasyonunu doğru olarak belirlemek için önemlidir. Bu nedenle antijenite ve iyi korunmuş ince-yapı arasındaki denge önemlidir. Ancak, her doku ve antijen için gerekli en iyi deney koşulları farklılık gösterebileceğinden, standart bir protokolün oluşturulması oldukça zordur. Bununla birlikte, araştırmacıların daha önce başarı ile uyguladıkları işlemler, daha sonra yapılacak çalışmalarda pozitif bir sonuca ulaşma ihtimalini artırmaktadır (20). Yaptığımız çalışmanın, klasik yöntemlere göre çok daha kısa ve etkin bir teknik ortaya koyarak, nörogenез sürecini inceleyecek araştırmacılar için yol gösterici olacağını düşünmekteyiz.

SONUÇ

Elektron mikroskobu ve optogenik araçlar kullanılarak yapılacak ileriki çalışmalar yeni doğan nöronların sinaptik input ve outputlarını ortaya koyabilmek için gereklidir (29). Işık ve elektron mikroskopik incelemelerin bir arada yapılabilmesi, işaretlenen proteinin hücresel özelliklerini daha ayrıntılı anlama imkanı sunmaktadır. Bizim çalışmamız ile, aynı doku üzerinde ışık ve elektron mikroskopik düzeyde DCX proteini ilk kez gösterilmiş, literatürdeki eksikliğe katkı sağlayacak çalışmalar için yöntem oluşturulmuştur.

Etik Komite Onayı: Bu çalışma için etik komite onayı Oregon Sağlık ve Bilim Üniversitesi, Kurumsal Hayvan Bakımı ve Kullanımı Komitesi'nden alınmıştır (IACUC) #3471-15.

Hasta Onamı: Bu çalışma için hasta onamına gerek yoktur.

Hakem Değerlendirmesi: Dış Bağımsız.

Yazar Katkıları: Fikir - Ö.T.Ç.K., S.Ş.; Tasarım - Ö.T.Ç.K., S.Ş., C.M.; Denetleme - C.M., C.Moore.; Kaynaklar - Ö.T.Ç.K., S.Ş.; Malzemeler - Ö.T.Ç.K., C.Moore.; Veri Toplanması ve/veya işleme - Ö.T.Ç.K., S.Ş., C.M.; Analiz ve/veya Yorum - Ö.T.Ç.K., S.Ş., C.M.; Literatür taraması - Ö.T.Ç.K.; Yazıyı Yazan - Ö.T.Ç.K., S.Ş.; Eleştirel İnceleme - S.Ş., C.M.

Teşekkür: Bu çalışma, Özlem Tuğçe Çilingir'in doktora tez çalışmalarının yurtdışı görevlendirmesi sırasında yapılan kısmından hazırlanmıştır. 2547 sayılı kanunun 39. maddesi uyarınca gerçekleşen yurtdışı görevlendirmesi, T.C. Yükseköğretim Kurulu tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması: Yazarlar çıkar çatışması bildirmemişlerdir.

Finansal Destek: Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından SAG-C-DRP-100413-0112 numaralı proje ile desteklenmiştir.

Ethics Committee Approval: Ethics committee approval was received for this study from the ethics committee of Oregon Health and Science University, Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) #3471-15.

Informed Consent: Not required in this study.

Peer-review: Externally peer-reviewed.

Author contributions: Concept - Ö.T.Ç.K., S.Ş.; Design - Ö.T.Ç.K., S.Ş., C.M.; Supervision - C.M., C.Moore.; Resource - Ö.T.Ç.K., S.Ş.; Materials - Ö.T.Ç.K., C.Moore.; Data Collection and/or Processing - Ö.T.Ç.K., S.Ş., C.M.; Analysis and/or Interpretation - Ö.T.Ç.K., S.Ş., C.M.; Literature Search - Ö.T.Ç.K.; Writing - Ö.T.Ç.K., S.Ş.; Critical Reviews - S.Ş., C.M.

Acknowledgements: This paper was prepared from the part of Özlem Tuğçe Çilingir's doctorate thesis research which was done during the overseas assignment. The overseas assignment as a part of doctorate thesis study was supported by Turkish Council of Higher Education according to the law number 2547/39.

Conflict of Interest: No conflict of interest was declared by the authors.

Financial Disclosure: This study was supported by Research Fund of the Marmara University with project number SAG-C-DRP-100413-0112.

KAYNAKLAR

- Ming GL, Song H. Adult neurogenesis in the mammalian central nervous system. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 223-50. [CrossRef]
- Altman J, Das GD. Autoradiographic and histological evidence of post-natal hippocampal neurogenesis in rats. *J Comp Neurol* 1965; 124: 319-35. [CrossRef]
- Paton JA, Nottebohm FN. Neurons generated in the adult brain are recruited into functional circuits. *Science* 1984; 225: 1046-8. [CrossRef]
- Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science* 1992; 255: 1707-10. [CrossRef]
- Eriksson PS, Perfilieva E, Björk-Eriksson T, Alborn AM, Nordborg C, Petersen DA, et al. Neurogenesis in the adult human hippocampus. *Nat Med* 1998; 4: 1313-7. [CrossRef]
- Taupin P. BrdU immunohistochemistry for studying adult neurogenesis: paradigms, pitfalls, limitations, and validation. *Brain Res Rev* 2007; 53: 198-214. [CrossRef]
- Winner B, Winkler J. Adult neurogenesis in neurodegenerative diseases. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2015; 7: a021287. [CrossRef]
- Deng W, Aimone JB, Gage FH. New neurons and new memories: how does adult hippocampal neurogenesis affect learning and memory? *Nat Rev Neurosci* 2010; 11: 339-50. [CrossRef]

9. Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA. Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* 1999; 23: 257-71. [\[CrossRef\]](#)
10. Brown JP, Couillard-Després S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG. Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* 2003; 467: 1-10. [\[CrossRef\]](#)
11. Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, et al. Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* 1999; 8: 1599-610. [\[CrossRef\]](#)
12. Koizumi H, Higginbotham H, Poon T, Tanaka T, Brinkman BC, Gleeson JG. Doublecortin maintains bipolar shape and nuclear translocation during migration in the adult forebrain. *Nat Neurosci* 2006; 9: 779-86. [\[CrossRef\]](#)
13. Burgess HA, Reiner O. Doublecortin-like kinase is associated with microtubules in neuronal growth cones. *Mol Cell Neurosci* 2000; 16: 529-41. [\[CrossRef\]](#)
14. Nacher J, Crespo C, McEwen BS. Doublecortin expression in the adult rat telencephalon. *Eur J Neurosci* 2001; 14: 629-44. [\[CrossRef\]](#)
15. Amiry-Moghaddam M, Ottersen OP. Immunogold cytochemistry in neuroscience. *Nat Neurosci* 2013; 16: 798-804. [\[CrossRef\]](#)
16. van den Pol AN. Neuronal imaging with colloidal gold. *J Microsc* 1989; 155: 27-59. [\[CrossRef\]](#)
17. Maunsbach AB, Afzelius BA. *Biomedical Electron Microscopy: Illustrated Methods and Interpretations*. 1st ed: Academic Press; 1999.
18. Coons AH, Creech, HJ, Jones RN. Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. *Proc Soc Exp Biol*. 1941; 47: 200-2. [\[CrossRef\]](#)
19. Boyde A. *Colloidal Gold. Principles, Methods and Application*. *J Anat* 1991; 176: 215-6.
20. De Paul AL, Mukdsi JH, Petit JP, Gutiérrez S, Quintar AA, Maldonado CA, et al. *Immunoelectron Microscopy: A Reliable Tool for the Analysis of Cellular Processes, Applications of Immunocytochemistry*. Dehghani H (Ed): InTech; 2012.
21. Pearse AGE. *Histochemistry. Theoretical and applied*. In: Underwood JCE, editor. *J Pathol* 147. 4 ed. Churchill Livingstone, Edinburgh: John Wiley & Sons, Ltd.; 1985.
22. Jimenez VA, Helms CM, Cornea A, Meshul CK, Grant KA. An ultrastructural analysis of the effects of ethanol self-administration on the hypothalamic paraventricular nucleus in rhesus macaques. *Front Cell Neurosci* 2015; 9: 260. [\[CrossRef\]](#)
23. Vecchiarelli LD, Moore C. *Developing Microwave Techniques for Ultrastructural Double Immunolabeling: Pre-Embed DAB and Post-Embed Conjugated Gold*. *Microsc Microanal*. 2010; 16: 1136-7. [\[CrossRef\]](#)
24. Herrick SP, Waters EM, Drake CT, McEwen BS, Milner TA. Extranuclear estrogen receptor beta immunoreactivity is on doublecortin-containing cells in the adult and neonatal rat dentate gyrus. *Brain Res* 2006; 1121: 46-58. [\[CrossRef\]](#)
25. Shapiro LA, Korn MJ, Shan Z, Ribak CE. GFAP-expressing radial glia-like cell bodies are involved in a one-to-one relationship with doublecortin-immunolabeled newborn neurons in the adult dentate gyrus. *Brain Res* 2005; 1040: 81-91. [\[CrossRef\]](#)
26. Wang C, Liu F, Liu YY, Zhao CH, You Y, Wang L, et al. Identification and characterization of neuroblasts in the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult human brain. *Cell Res* 2011; 21: 1534-50. [\[CrossRef\]](#)
27. Shapiro LA, Ribak CE. Newly born dentate granule neurons after pilocarpine-induced epilepsy have hilar basal dendrites with immature synapses. *Epilepsy Res* 2006; 69: 53-66. [\[CrossRef\]](#)
28. Vivar C, van Praag H. Functional circuits of new neurons in the dentate gyrus. *Front Neural Circuits* 2013; 7: 15. [\[CrossRef\]](#)
29. Duan X, Kang E, Liu CY, Ming GL, Song H. Development of neural stem cell in the adult brain. *Curr Opin Neurobiol* 2008; 18: 108-15. [\[CrossRef\]](#)