

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERİTROPOETİN'İN SHSY-5Y HÜCRELERİNDE
GENOMİK DÜZEYDE GEN EKSPRESYONUNA
ETKİSİNİN İNCELENMESİ**

ZEYNEP FİLİZ ÖNKAL

SİNİRBİLİMLER DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2013

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970220

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERİTROPOETİN'İN SHSY-5Y HÜCRELERİNDE GENOMİK DÜZEYDE GEN EKSPRESYONUNA ETKİSİNİN İNCELENMESİ

SİNİRBİLİMLER DOKTORA PROGRAMI

ZEYNEP FİLİZ ÖNKAL

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin GENÇ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2009 KB SAG 078 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970220

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Doktora programı öğrencisi Zeynep Filiz Önkal **'Eritropoetin'in SHSY-5Y Hücrelerinde Genomik Düzeyde Gen Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi'** konulu Doktora 19.02.2013 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

Prof. Dr. Şermin GENÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı



Prof. Dr. Ayşegül ÖZERDEM

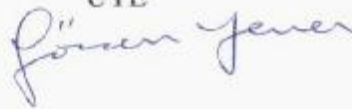
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sinir Bilimler Anabilim Dalı

ÜYE



Prof. Dr. Görsev YENER
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sinir Bilimler Anabilim Dalı

ÜYE



Yard. Doç. Dr. Bünyamin AKGÜL
İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı
ÜYE (Yedek)

Doç. Dr. Ahmet KOÇ

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÜYE



Doç. Dr. Pınar AKAN
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sinir Bilimler Anabilim Dalı

ÜYE



Doç. Dr. İbrahim ÖZTURA
Dokuz Eylül Üniversitesi
Sinir Bilimler Anabilim Dalı
ÜYE (Yedek)

İÇİNDEKİLER

Sayfa No

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Eritropoetin.....	4
2.1.1. Eritropoetin Reseptörü.....	4
2.1.2. Beta Common Reseptör (β c Reseptör)	6
2.2. Eritropoetin'in Nöroprotektif Etkileri.....	7
2.2.1. Eritropoetin Deriveleri.....	12
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	16
3.1. Araştırmanın tipi.....	16
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı.....	16
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme.....	16
3.4. Çalışma materyali.....	16
3.5. Araştırmanın değişkenleri.....	16
3.6. Veri toplama araçları.....	16
3.6.1. Hücre Kültürü.....	16
3.6.2. İn vitro Deney.....	17
3.6.3 RNA İzolasyonu.....	18
3.6.4. Mikroarray Analizi.....	18
3.6.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative PCR, qPCR) array analizi.....	19
3.6.6. mRNA'ların rol aldığı yollarının analizi.....	19
3.7. Araştırma planı ve Takvimi.....	19
3.8. Verilerin değerlendirilmesi.....	19
3.9. Araştırmanın sınırlılıkları	20

	Sayfa No
3.10. Etik Kurul Onayı.....	20
4. BULGULAR.....	21
4.1. Mikroarray Analizinde Eritropoetin Uygulaması ile Ekspresyonu Değişen mRNA'ların Belirlenmesi.....	21
4.2. Kantitatif PCR Analizinde Eritropoetin Uygulaması ile Ekspresyonu Değişen mRNA'ların Belirlenmesi	26
4.3. Anlamlı değişim gösteren mRNA'ların yer aldığı yolaklar.....	28
5. TARTIŞMA.....	33
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	40
7. KAYNAKLAR.....	41
8. EKLER	
EK-1 Etik Kurul Onayı.....	56

TABLÖLAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Eritropoetin'in invitro nöroprotektif etkilerini gösteren çalışmalar.....	8
Tablo 2: Eritropoetin'in invivo nöroprotektif etkilerini gösteren çalışmalar.....	9
Tablo 3: İnme dışındaki sinir sistemi hastalıklarında Eritropoetin'in etkilerini gösteren çalışmalar.....	12
Tablo 4: 48 saatlik EPO Uygulaması Sonrasında Mikroarray Analizinde Anlamlı Olarak Artan mRNA'lar	22
Tablo 5: 48 saatlik EPO Uygulaması Sonrasında Mikroarray Analizinde Anlamlı Olarak Azalan mRNA'lar.....	25
Tablo 6: 48 saatlik EPO Uygulaması Sonrasında qPCR'da Anlamlı Olarak Artan mRNA'lar.....	27
Tablo 7: 48 saatlik EPO Uygulaması Sonrasında qPCR'da Anlamlı Olarak Azalan mRNA'lar.....	28
Tablo 8: KEGG yazılımına göre mRNA'ların rol aldığı yollar.....	29
Tablo 9: 48 saat EPO uyarımı ile ekspresyonu değişen genlerin yer aldığı alt yollar.....	31
Tablo 10: Ekspresyon değişimi gözlenen genlerin % olarak yer aldığı yollar.....	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: Eritropoetin sinyal yolağı.....	5
Şekil 2: Ekspresyonu anlamlı değişen genlerin yer aldığı ana yollar.....	30

KISALTMALAR

EPO:	Eritropoetin
qPCR:	Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
HIFs:	Hipoksi ile indüklenabilir faktörler
FDA:	Food and Drug Administration)
EPOR:	Eritropoetin reseptörü
CRM:	Sitokin reseptör homoloji bölgesi
Jak-2:	Janus Tirozin Kinaz 2
MAPK:	Ras/ Mitojen Aktivated Protein Kinaz
STAT:	Signal Transducers and Activators of Transcription
PI3K:	Fosfiditilinositol 3 Kinaz
β c Reseptör:	Beta Common Reseptör
GM-CSF:	granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
IL-3:	İnterlökin 3
IL-5:	İnterlökin 5
NO:	Nitrik oksit
HIE:	Hipoksik iskemik ensefalopati
PVL:	periventriküler lökomalasi
Mpred:	Metilprednisolon
ROP:	Prematür retinopatisi
NEC:	Nekrotize edici enterokolit
SAH:	Subaraknoid hemoraji
AsialoEPO:	Asialo Eritropoetin
CEPO:	Karbamile Eritropoetin
Neuro-EPO:	Nöro Eritropoetin
rHu-EPO:	Rekombinant eritropoetin
SNAP25:	Synaptosome-associated protein 25
ERK	
NMDA:	N-metil-D- aspartat
MOG:	Miyelin oligodendrosit glikoprotein
FBS:	Fetal bovine serum
PBS:	Phosphate buffered saline

Ct: Threshold cycle- siklus eşik değeri

MEV4: Multi Experiment Viewer 4

TEŞEKKÜR

Doktora eğitimim boyunca, tez çalışmamın yürütülmesi ve yazım aşamalarında bilimsel görüşlerini ve desteğini esirgemeyen danışmanım Prof. Dr. Şermin GENÇ’e,

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimlerini paylaşarak destek olan Prof. Dr. Kemal Kürşad GENÇ’e,

Beni hiç yalnız bırakmayıp, desteklerini esirgemeyen sevgili arkadaşlarım Ufuk VURGUN ve Serpen DURNAOĞLU’na,

Her zaman destek vermeye hazır olan ekip arkadaşım Kemal Uğur Tüfekci’ye ve tüm Sınır Bilimler Anabilimdalı mensuplarına,

Bütün hayatım boyunca her zaman yanımda olan, bana inanan ve desteklerini hiçbir zaman esirgemeyen SEVGİLİ AİLEM’E, amcam Halil AY’a,

Hayatıma anlam katan, her koşulda beni gönülden destekleyen eşim Ali Bahadır ÖNKAL’a,

Teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

ZEYNEP FİLİZ ZADEOĞLULARI ÖNKAL

ÖZET

Eritropoetin'in SHSY-5Y Hücrelerinde Genomik Düzeyde Gen Ekspresyonuna Etkisinin İncelenmesi

Zeynep Filiz ÖNKAL, Dokuz Eylül Üniversitesi,

Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinir Bilimler Anabilim Dalı, 35340 Inciraltı, İzmir

Eritropoetin (EPO), eritropoezi uyaran hematopoietik büyüme faktörü ve sitokindir. Son yıllarda beyindeki nöronal ve glial hücrelerde kendisinin ve reseptörünün varlığı ortaya konmuştur. EPO, sinir sisteminin gelişiminde, nöronal canlılığın devamında nöronal hasarın tamirinde kritik roller üstlenir. EPO'nun nöroprotektif etkisinin olası bir mekanizması transkripsiyonel düzeyde gen regülasyonudur. Bu çalışmada amacımız EPO'nun SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında mRNA ekspresyonuna etkisinin incelenmesidir.

Projemizde mikroarray ile EPO'in transkripsiyonel düzeyde yaptığı değişiklikler incelendi. Bu amaçla nöronal bir hücre hattı olan SHSY-5Y hücre hattına EPO indüksiyonu uygulanıp bunun sonucunda ekspresyonu değişen mRNA'lar mikroarray ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemleriyle incelendi.

Araştırmamızın sonuçlarına göre eBayes hipotez testi ile 24 saatlik EPO indüksiyonu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı bir değişiklik saptanmadı. 48 saatlik EPO indüksiyonu ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı olarak 438 gen up-regüle, 482 gen down-regüle olarak belirlenmiştir. Kat Değişim (Fold change) sınır değeri olarak karşılaştırıldığında kat değişimi 0,5'den az olanlar azalmış gen ekspresyonu, 1,5'den fazla olanlar artmış gen ekspresyonu olarak kabul edilmiştir. Buna göre 52 genin kat değişim değerleri 1,5 üzeri, 23 genin kat değişim değerleri 0,5'den azdır. Literatür incelemesi yapılarak bu 75 gen içerisinde konumuz ile ilgili olan 26 gen için qPCR konfirmasyonu yapılmıştır. Mikroarray sonuçları ile qPCR sonuçları uyumludur. Seçilen 26 genden 18 tanesinin gen ekspresyonu anlamlı artmış, 8 tanesinin gen ekspresyonu anlamlı olarak azalmış bulunmuştur. Bu genlerin hangi yollarda rol aldığı KEGG yazılımı ve reactome programı ile belirlenmiştir. Bu analiz sonrası EPO'nun ekstrasellüler matriks organizasyon, akson, sinyal dönüştürülmesi, protein metabolizması, ile ilgili ana yolları etkilediği belirlenmiştir.

Anahtar Sözcükler: Eritropoetin, SHSY-5Y Hücre Hattı, Gen Ekspresyonu, Mikroarray

ABSTRACT

The Effect of Erythropoietin on mRNA Level in SHSY-5Y Cell Line by Microarray

Zeynep Filiz ÖNKAL, Dokuz Eylul University

The Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience, 35340 Inciraltı, Izmir

Erythropoietin (EPO) is a hematopoietic growth factor and cytokine which stimulates erythropoiesis. In recent years it's been shown that EPO and its receptor is expressed in the brain, neurons and the glial cells. EPO has a critical role in the development, maintenance, protection and repairment of the nervous system. A possible mechanism of EPO is gene regulation at the transcriptional level. In this study, our aim is to investigate the effects of EPO on mRNA expression levels in SHSY-5Y neuroblastoma cell line.

In our project, the transcriptional effects of EPO was examined by microarray. For this purpose neuronal cell line SHSY-5Y has been induced by EPO and any mRNA expression changes that occurred has been detected by microarray and Quantitative Polymerase Chain Reaction (qPCR) methods both.

According to our results, by eBayes hypothesis test, there is no significant changes in control versus 24 hour EPO induction group. Our results show that in comparison control group versus 48 hours EPO induction group, 438 gene upregulated and 482 genes down regulated. $<0,5$ fold change determined as decreased gene expression level and $> 1,5$ was determined as increased gene expression level. According to this, 52 gene fold change $>1,5$ and 23 genes fold changes $<0,5$. We choose 26 genes for qPCR confirmation depend on literature. The concordance between microarray and qPCR results was found. Our results show that 18 gene expression was significantly increase and 8 genes expression was significantly decrease after 48 hour EPO induction. Using KEGG and reactome applications, we investigated related pathways such as extracellular matrix organisation, axon guidance, signal transduction, protein metabolism.

Key Words: Erythropoietin, SHSY-5Y Cell line, Gene expression, Microarray

1. İRİŞ VE AMAÇ

Eritropoetin (EPO), primer fonksiyonu hematopoetik dokularda eritrosit öncüsü hücrelerin apoptotik ölümünü baskılayarak eritrosit üretimini (eritropoez) uyarmak olan glikoprotein yapıda bir hormon ve sitokindir.

Son yıllarda beyindeki nöronal ve glial hücrelerde kendisinin ve reseptörünün varlığı ortaya konmuştur. Hematopoetik dokular dışındaki dokularda da fonksiyonel EPO reseptörlerinin bulunması bu maddenin eritropoez dışında başka fonksiyonları da olabileceğini düşündürmüştür. EPO; sinir sisteminin gelişiminde, nöronal canlılığın devamında, nöronal hasarın tamirinde önemli roller üstlenir. Ayrıca EPO'nun iskemik, hipoksik, metabolik, nörotoksik ve eksitotoksik strese nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir. EPO'nun nöron koruyucu etkilerinin kesin mekanizması tam olarak bilinmese de hücre canlılığını arttırıcı yolları uyardığı, anti-apoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı, hücre içi kalsiyum metabolizmasını düzenlediği, nitrik oksid üretimini azalttığı, glutamat salınımını baskıladığı, anjiyogenez ve nörogenezi uyardığı, nörotrofik faktör sentezini arttırdığı, bu sayede anti-apoptotik, anti-oksidatif ve anti-inflammatuar etki gösterdiği bildirilmiştir.

Eritropoetin, anemi tedavisinde kullanılan bir ilaçtır. Yapılan serebral iskemi, multiple skleroz ve şizofreni klinik çalışmalarda EPO uygulaması ile klinik bulgularda düzelme gözlenmiştir. EPO'nun kullanımını sınırlandıran en önemli yan etki hematopoetik etkileridir. Bunların en önemlisi eritropoez artışıdır. Bu nedenle EPO'nun sinyalleme mekanizmasının çok iyi bilinmesi büyük önem taşır. Bu bize EPO'nun yan etkilerini azaltabilmemizi sağlayacaktır. Son yıllarda EPO'ya benzer, ancak hematopoetik yan etkileri olmayan bileşikler geliştirilmektedir.

Bu çalışmadaki amacımız, EPO'nun SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında transkripsiyonel düzeyde yaptığı değişikliklerin incelenmesidir. Bu amaçla nöronal bir hücre hattı olan SHSY-5Y hücre hattına EPO indüksiyonu uygulanıp bunun sonucunda ekspresyonu değişen mRNA'lar mikroyarray ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (qPCR) yöntemleriyle incelenmiştir.

H1: SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattına EPO uygulaması ile mRNA ekspresyon düzeylerinde değişiklik olur.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ERİTROPOETİN

Eritropoetin (EPO), 165 aminoasitten oluşan, 34 kDa'luk pleiotropik bir glikoproteindir. Eritropoez'in (Eritroid öncü hücrelerin olgun kırmızı kan hücrelerine gelişimi ve eritrosit diferansiyasyonu) uyarılması ve devam ettirilmesinde hormonal bir rol oynar. EPO molekülü 14 den fazla sialik asit rezidüsüne sahiptir (1, 2).

Eritropoetin, fetal dönemde karaciğerde hepatositler tarafından, erişkin dönem de ise böbrek korteksinin kapiller yatağının renal intestisyel fibroblast benzeri hücrelerinde ve karaciğerde perivenöz hepatositlerde sentezlenir. Karaciğer, EPO üretiminin %10-20'sinden sorumludur (1, 3).

Hipoksik koşullarda, kırmızı kan hücresi sentezini arttırabilmek için böbrek EPO üretir ve sentezler. Dolaşımdaki EPO, kemik iliğindeki eritroid prekürsör hücrelerdeki reseptörlerine bağlanır ve eritropoez uyarımına neden olur. Hematopoezdeki rolü, eritroid prekürsör hücrelerini apoptozunu engellemek, proliferasyonlarını arttırmak ve normoblastlara olan diferansiyasyonunu sağlamaktır. Eritropoez indüksiyonu doku oksijenlenmesinin artmasını sağlar. Doku oksijenlenmesi, oksijen bağımlı EPO üretiminin ve eritropoezin etkili ve kritik hormonal feedback mekanizmasıdır. EPO, transkripsiyon faktörleri hipoksi ile indüklenebilir faktörler (HIFs) oksijen varlığında hidroksillenir ve proteozomal olarak yıkılır (4-7).

Eritropoetin, ilk kez anaplastik anemili hasta idrarından izole edildi. 1985 yılında EPO geni ilk kez klonlandı ve 1989 yılında rekombinant EPO, FDA (Food and Drug Administration) onayı alarak hastalar için kullanılmaya başladı (8, 9).

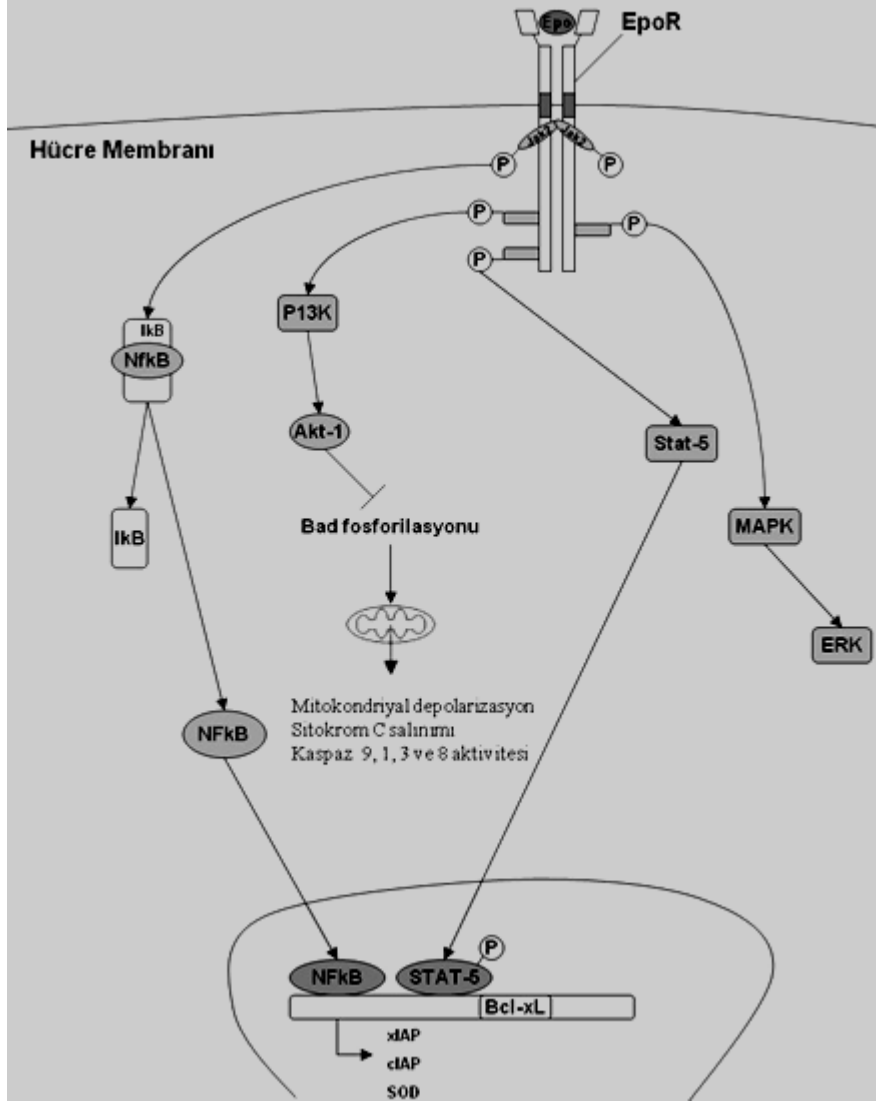
2.1.1. Eritropoetin Reseptörü

Eritropoetin, 66 kDa ağırlığında, 507 aminoasitten oluşmuş tip 1 transmembran protein grubuna ait, tip 1 sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesi olan Eritropoetin reseptörüne (EPOR) bağlanır (10, 11).

Eritropoetin reseptörü tek bir membran geçişine sahiptir. Bu reseptörler sitokin reseptör homoloji bölgesi (CRM) diye adlandırılan fonksiyonel bölgeleri ile karakterizedir. Sitokin reseptör homoloji bölgeleri silindirik gövde yapısında ve herbiri 7 β zincirinden

oluşturmuştur. Ekstrasellüler bölgede korunmuş 4 adet sistein rezidüsü ve WSXWS (W: Triptofan, S: Serin X:Herhangi bir aminoasit) aminoasit dizisi içerir (12-14).

İnaktive durumda homodimer olarak bulunurlar. EPOR'ün sitoplazmik kısmı birçok fosfotirozin içerir. Sitoplazmik bölgesini katalitik aktivitesi yoktur. EPO'nun reseptörüne bağlanması ile EPOR'leri homodimer haline geçerler. Bu konformasyonel değişiklik EPOR ile ilişkili olan Janus Tirozin Kinaz 2 (Jak-2)'nin otofosforilasyonuna neden olur. Bu fosforilenme sonucunda EPO/EPOR sinyali başlatılır ve arttırılarak ilişkili birçok alt yolağa iletilir (Şekil 1). Bu alt yollardan biri Jak-2 tarafından aktive edilen Ras/ Mitojen Aktivated Protein Kinaz (MAPK) yolağıdır. Diğer bir yolak "Signal Transducers and Activators of Transcription" (STAT) ailesi olan transkripsiyon faktörlerinin aktive olduğu yolaktır. Jak-2 aracılığı ile aktive olan diğer bir yol ise Fosfiditilinositol 3 Kinaz (PI3K) /Akt aracılı yolaktır. Bu sinyal yollarının aktifleşmesi ile eritroblastlar için EPO'nun net etkisi olan apoptozun inhibisyonu, proliferasyon ve diferansiyasyonda artış gözlenir (13-15).



Şekil 1: Eritropoetin sinyal yolağı

Eritropoetin reseptörünün, mezensefalik, hipokampal ve kortikal nöronlarda, astrositlerde, oligodendrositlerde ve beyin kapiller endotelial hücrelerinde eksprese edildiği çeşitli araştırmalarla gösterilmiştir (16-19).

Eritropoetin reseptörü gen ekspresyonu beyin gelişimi ve doku koruyucu etkiler için gereklidir. Yapılan incelemelerde EPOR'nun gelişmemiş olması embriyonik dönem 13. günden sonra tamamlanamamış eritropoez sonucunda öldürücü etkinin yanı sıra, kardiyak anomaliler ortaya çıkmasına neden olmaktadır. (20-23).

2.1.2. Beta Common Reseptör (bc Reseptör)

Son yıllarda yapılan çalışmalar ile EPO'nun nöroprotektif ve doku koruyucu etkilerini başka bir reseptör aracılığı ile gösteriyor olabileceği ortaya çıkmıştır. EPO ve beta common

reseptörün (β c Reseptör) etkileşmesi ile hematopoetik etkilerin ortaya çıkmaması, β c Reseptörün, EPO'ya düşük afinite göstermesi ve doku koruyucu etkilerde EPO deriveleri ile daha yüksek afiniteli reseptör/ligand kompleksi oluşturması bu teoriyi güçlendirmektedir (24, 25).

Beta common reseptör, diğer adı ile CD131, α reseptör alt grupları ile kompleks yaparak granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör (GM-CSF), İnterlökin 3 (IL-3) ve İnterlökin 5 (IL-5)'e spesifik reseptörünü oluşturur. Klasik Eritropoetin reseptörü gibi, β c reseptör de tip 1 sitokin reseptör süper ailesinin bir üyesidir. β c reseptör ekstrasellüler bölgesinde 2 CRM içerir. 1.ci ve 3.cü bölgelerinde bulunan korunmuş sistein rezidüleri α reseptör ile çapraz bağ oluşturmaya böylece ligandlarına yüksek afinite ile bağlanmasına neden olur (26, 27).

Hanazono Y. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (28) hematopoetik hücrelerde β c reseptörün fosforillenmesi EPO sinyalinin başlamasına neden olduğunu ileri sürdükleri çalışma sonucunda EPOR/ β c reseptör birlikteliğinin hematopoez için gerekli olduğu düşünülmeye başlanmıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda EPOR ile β c reseptör arasında fonksiyonel bir ilişki olduğu gösterilmiştir (29, 30). β c reseptör knockout farelerde normal eritrosit olgunlaşmasının olduğunun gösterilmesi ve β c reseptörün eritropoez için gerekli olmadığının belirlenmesi (31), EPOR/ β c reseptörün oluşturduğu heterodimer reseptörün EPO'nun doku koruyucu etkisinde rol oynadıkları hipotezini güçlendirmiştir.

Brines M. ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada (24), kardiyomiyosit ve spinal kord hasarlı modellerde EPO'nun, hem EPOR hem de β c reseptörün birlikte olduğu durumda doku koruyucu etkisini gösterirken, β c reseptör knockout farelerde hem EPO'nun hem de EPO'nun eritropoetik olmayan derivelerinden karbamile eritropoetinin aktif olmadıklarını göstermişlerdir. Bu durum EPO'un doku koruyucu etkisinde EPOR'nün ve β c reseptörün birlikte rol oynadıklarına kanıt oluşturmuştur.

Swartjes M. ve arkadaşları (32), periferik sinir hasarlı fare ve sıçanlarda yaptıkları çalışmada, siyatik sinir hasar sonrası, β c reseptör sağlam olan fare ve sıçanlarda gözlenen aksine, β c reseptör knockout fare ve sıçanlarda EPO'nun hematopoetik olmayan derivesi uygulandığında nöropatik ağrının gözlemlendiği, antiinflamatuvar sistemlerin aktive olmadığı gözlemlenmiştir.

Su KH. ve arkadaşları (33), β c reseptörün EPO ile indüklenen endotelial nitrik oksit (NO) sentezinde etkisini incelemişlerdir. β c reseptörü ve EPOR'nün birlikte lokalize

olduklarını, nötralize edici küçük moleküller ve siRNA teknolojisi ile β c reseptörü ve EPOR'nü inhibe ettiklerinde EPO ile indüklenen nitrik oksit (NO) sentezinin ortadan kalktığını gözlemlemişlerdir. Ayrıca, EPO ile indüklenen endotelial hücre proliferasyonu, migrasyonu, tüp formasyonunun β c reseptörü antikorumları kullanıldığında inhibe olduğunu bildirmişlerdir.

2.2. ERİTROPOETİN'İN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ

Eritropoetin ve reseptörünün beyinde eksprese edildiği ve bu ekspresyonun iskemi sonrasında arttığı gösterildikten sonra EPO/EPOR'nün nöroprotektif sistemde rol oynadıkları düşünüldü. Eritropoetin PC12 sıçan feokromasitoma ve SN6 septal kolonerjik hücre hatlarında ekspresyonunun varlığı gösterildikten sonra, kültüre edilen sıçan fetüs serebral hücrelerinde EPO ekspresyonunun varlığının gösterilmesi ve bu ekspresyonun oksijen bağımlı olduğunun belirlenmesi ile EPO üreten yeni bölgelerin olduğu kanıtlanmış oldu (34, 35).

Daha sonra yapılan çalışmalar ile EPO ve EPOR'nün iskemik hasar sonrasında beyin dokusunda ekspresyonlarının arttığı, normal insan beyinde EPO/EPOR reaksiyonu zayıf iken akut iskemik hasar sonrası EPOR'nün ekspresyonunun kan damarları, nöron ve astrositlerde artmış olduğu bildirilmiştir. Bu çalışmalar ile EPO/EPOR'nün nöroprotektif sistemde önemli rol oynadığı düşünülmüştür (36-38).

Eritropoetin nöroprotektif etkileri ilk olarak çeşitli hipoksik ve toksik hasar modellerinde in vitro olarak gösterilmiştir. Tablo 1'de in vitro çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 1: Eritropoetin'in in vitro nöroprotektif etkilerini gösteren çalışmalar

Nöron Tipi	Toksisite	EPO Etkisi	Referans
PC12 hücre hattı	Glutamat	Koruyucu	16
Kortikal nöron	Glutamat	Koruyucu	16
PC12 hücre hattı	Serum/ sinir büyüme faktör azlığı	Koruyucu	39
PC12 hücre hattı	MPP, oksidatif stres ve apoptoz	Koruyucu	40
Kortikal nöron	Glukoz/ oksijen deprivasyonu, AMPA	Koruyucu	41
Hipokampal nöron	Hipoksi	Apoptozu azaltma	42

Kortikal nöron	Glukoz deprivasyonu	Koruyucu	43
Kortikal nöron	NMDA, NO	Apoptozu azaltma	44
Motor nöron	Kainat	Koruyucu	38
Hipokampal nöron	Hipoksi	Koruyucu	38
Hipokampal nöron	Kimyasal hipoksi	Apoptozu azaltma	45
Hipokampal nöron	Anoksi	Apoptozu azaltma kaspaz aktivitesi	46
Mikroglial hücre hattı	Glukoz/ oksijen deprivasyonu	Koruyucu	47
Hipokampal nöron	NO	Koruyucu	48

Eritropoetinin nöroprotektif etkileri daha sonra iskemi reperfüzyon, spinal kord basısı, hipoksik iskemi, subaraknoid kanama gibi çeşitli sinir doku hasar modelinde koruyucu ve infarkt alanlarını küçültmek gibi iyileştirici etkileri in vivo olarak da gösterilmiştir. Tablo 2’de in vivo çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 2: Eritropoetin'in in vivo nöroprotektif etkilerini gösteren çalışmalar

Doku	Kaynak	Model	EPO Etkisi	Referans
Beyin	Gerbil	İskemi/ reperfüzyon	Hipokampal nöronlarda apoptozu azaltma, CA1 bölgesinde sinaps dejenerasyonunu azaltma Kognitif iyileşme	48
Beyin	Sıçan	İskemi/ reperfüzyon	İnme hacminde azalma	49
Beyin	Fare	Künt travma	İnme hacminde ve inflamasyonda azalma	49
Beyin	Sıçan	Deneysel otoimmün ensefalit	Klinik skorlamada ve inflamasyon sitokin seviyelerinde azalma	49
Beyin	Tavşan	Subaraknoid kanama	Koruyucu	50
Beyin	Fare	Parkinson	Nigral dopaminerjik nöronların sağ kalımı	51
Beyin	Gerbil	İskemi	Bcl-xl ile indüklenen apoptozda azalma	45
Beyin	Domuz	Hipotermi kaynaklı dolaşım durması	Apoptozu ve glutamat seviyesini azaltma	52
Retina	Sıçan	İskemi/ reperfüzyon	Koruyucu	53
Spinal kord	Tavşan	İskemi/ reperfüzyon	Motor nöron apoptozunda azalma	54
Spinal kord	Sıçan	Bası	Nörolojik iyileşme	55
Beyin	Sıçan	Deneysel otoimmün ensefalit	İnflamatuar belirteçlerde azalma, Glial aktivasyon ve proliferasyonda gerileme	56
Siyatik sinir	Sıçan	Bası	Hasarda azalma Fonksiyonlarda hızlı iyileşme	57

Doku	Kaynak	Model	EPO Etkisi	Referans
Periferik sinir	Sıçan	Bası	Ağrı ve apoptozda azalma	58
Beyin	Sıçan	Neonatal hipoksik iskemi	Hasarlı doku hacminde azalma, Apoptozu azaltma, Nöronlarda NFκB ve kaspaz 3 aktivitesinde azalma	59
Beyin	Sıçan	İskemi	İnflamasyonda azalma	60
Beyin	Fare	Neonatal hipoksik iskemi	Hasarlı doku hacminde azalma, Apoptozu azaltma, Nöronlarda NFκB ve kaspaz 3 aktivitesinde azalma	61
Beyin	Sıçan	MK801 Toksisitesi	Nöronal apoptozda azalma	62
Spinal kord	Fare	Deneysel otoimmün ensefalit	TNF-α, IL-1β ve interlökin-1Reseptör-α (IL1R α) düzeylerinde azalma	63
Siyatik sinir	Sıçan	Kronik siyatik sinir daralma hasarı	Proinflamatuvar sitokin seviyelerinde azalma Kesiye bağlı kronik ağrıya iyileşme	64
Beyin	Sıçan	Hasar sonrası gelişen serebral inflamasyon	İnflamatuvar belirteçlerde azalma	65
Beyin	Sıçan	İntraserebral kanama	Perihematomal inflamasyonda ve apoptozda azalma	66
Spinal kord	Sıçan	Deneysel omurilik hasarı	Lipid peroksidasyonunda azalma	67
Spinal kord	Sıçan	Deneysel omurilik hasarı	Mikroglial infiltrasyonda ve proinflamatuvar sitokin seviyelerinde azalma	68

Doku	Kaynak	Model	EPO Etkisi	Referans
Beyin	Fare	Deneyisel travmatik beyin hasarı	Motor kayıpta azalma, bilişsel fonksiyon kazanımında artış Apoptozda ve inflamasyonda azalma	69
Beyin	Sıçan	Neonatal hipoksik iskemi	Proinflamatuvar sitokin seviyelerinde Lökosit infiltrasyonunda azalma Apoptozda azalma	70
Beyin	Sıçan	Neonatal hipoksik iskemi	Glutasyon peroksidaz enzim aktivitesinde artış Lipid peroksidasyonunda azalma	71
Beyin	Sıçan	Neonatal hipoksik iskemi	Hasarlı doku hacminde azalma, Apoptozda azalma	72
Beyin	Sıçan	Periventriküler lökomalazi	Mikroglial aktivasyonda, oligodendrosit ve miyelin hasarında azalma	73

Yapılan klinik çalışmalar ile EPO'nun nörodejeneratif hastalıklardaki nöroprotektif etkileri değerlendirilmiştir. Tablo 3'de inme dışındaki sinir sistemi hastalıklarında Eritropoetin'in etkilerini gösteren çalışmalar özetlenmiştir.

Tablo 3: İnme dışındaki sinir sistemi hastalıklarında Eritropoetin'in etkilerini gösteren çalışmalar

Hastalık	Faz	Hasta sayısı	Sonuç	Referans
Neonatal hipoksik-iskemik ensefalopati	I/II	167	Sadece orta seviyede HIE'li infantlarda uzun vadeli sonuçlar iyileşti	74
IVH, PVL, ROP, septisemi, serebral inme, NEC bronkopulmoner displazili preterm infant	Ila/I Ib	45	Kısa vadeli sonuçlarda değişiklik yok Ciddi yan etkisi yok	75
Aşırı düşük doğum ağırlıklı infantlar	I/II	60	EPO iyi tolere edilir Morbidite ya da mortalitede değişim yok	76
Şizofreni	I Ib	39	Şizofreniyle ilişkili bilişsel performansta artış	77
Multipl skleroz	I Ia	8	Yan etki yok motor fonksiyon ve kognisyonda gelişme	78
Subaraknoid hemoraji	I Ib	80	SAH'ı takiben gecikmeli iskemik problemlerde azalma	79
	I Ib	73	EPO'yla klinik durumda iyileşme yok	80
Friedreich ataksisi	I Ia	8	Frataksin seviyelerinde artma	81
	I Ia	12	Oksidatif stres belirteçlerinde azalma	82

HIE: Hipoksik iskemik ensefalopati
Mpred: Metilprednisolon
NEC: Nekrotize edici enterokolit

PVL: Periventriküler lökomalasi
ROP: Prematür retinopatisi
SAH: Subaraknoid hemoraji

2.2.1. Eritropoetin Derivelere

Eritropoetin reseptörünün, beyinde astrosit ve nöronlarda kardiyovasküler sistemde kardiyomiyosit, endotelyum, vasküler düz kasda, spinal kord, iskelet kası, retina, gastrointestinal sistem ve akciğer gibi hematopoetik olmayan hücrelerde varlığının gösterilmesi ile EPO'nun hematopoetik olmayan dokulardaki fonksiyonu incelenmeye

başlanmıştır. Birçok klinik çalışmada iskemik hasar sonrasında EPO'nun hasarlı skar dokuyu küçülttüğü ve iyileşmeyi arttırdığı gözlenmiştir (83-89).

Eritropoetinin doku koruyucu mekanizmasında hematopoezdekinden daha yüksek miktar EPO'ya gereksinim duyulması, bu nedenle plazma yarılanma ömrünün artması, hematopoetik reseptörlerin sürekli uyarılması ile eritropoez artışı, tromboembolizm, hipertansiyon gibi EPO kullanımına bağlı sistemik yan etkiler EPO'nun doku koruyucu bir ajan olarak kullanımını kısıtlamaktadır (90). Bu yan etkileri azaltmak için EPO'nun hematopoetik olmayan deriveleri geliştirilmiştir. Bu deriveler; Asialo Eritropoetin (asialoEPO), Karbamile Eritropoetin (CEPO), Nöro Eritropoetin (Neuro-EPO)'dur (57, 91, 92).

Asialo Eritropoetin

Asialo Eritropoetin (asialoEPO), insan rekombinant eritropoetinden (rHu-EPO), enzimatik desializasyon ile oluşturulmuş bir moleküldür. EPOR'ne aynı düzeyde afiniteye sahiptir fakat plazma yarılanma ömrü EPO'dan daha düşüktür (57, 91, 92).

Erbayraktar S. ve arkadaşları (57), asialoEPO'nun serebral iskemi modelinde infarkt hacmini %50 oranında azalttığını belirlemişlerdir. Spinal kord basısı modelinde asialoEPO uygulanan grupta histolojik iyileşme ve motor skorlarda ilerlemenin kontrol grubuna göre artmış olduğunu belirtmişlerdir. Ayrıca siyatik sinir kesisi modelinde, kesi öncesi ve sonrası asialoEPO uygulaması ile daha az motor fonksiyon kaybı ve daha iyileşme etkilerini belirlemişlerdir.

Leist M. ve arkadaşları (93) yaptıkları çalışmada, PC-12 hücrelerinde EPO ve asialoEPO'nun EPOR'ne bağlanma afinitelerinin benzer olduğunu belirlemişlerdir.

Mennini T. ve arkadaşları (94) Wobblers farelerinde oluşturdukları Amiyotrafik lateral skleroz (ALS) modelinde, kronik asialoEPO uygulamasının motor davranışları geliştirdiği, servikal spinal kordda motor nöron kaybını, astrosit ve mikrogial aktivasyonu gerilettiğini gözlemlemişlerdir. Yaptıkları çalışmada, asialoEPO'nun primer motor nöron hücre kültüründe kainat ile indüklenen hücre ölümünde koruyucu etki gösterdiğini belirlemişlerdir.

Wang X. ve arkadaşlarının (91) yenidoğan hipoksik iskemi modelinde asialoEPO ve EPO uygulamasının, infarkt hacimlerini %50 oranında azalttığı, ERK fosforilasyonunun asialoEPO uygulaması sonrasında anlamlı olarak azaldığını belirtmişlerdir. Hipoksik iskemi modeli oluşturulmadan sadece asialoEPO uygulaması sonrasında yapılan proteomiks analiz sonucunda "synaptosome-associated protein 25" (SNAP25)'in upregüle olduğunu

belirtmişlerdir. AsialoEPO'nun nöroprotektif etki mekanizmasının ERK fosforilasyonunda azalma ve SNAP25 upregülasyonu ile ilişkili olabileceğini öne sürmüşlerdir.

Grasso G. ve arkadaşlarının (95) spinal kord hasarında EPO ve asialoEPO ile yaptıkları çalışmada, spinal kord hasarından 24 saat önce uygulanan EPO ve asialoEPO'nun hasar sonrası motor fonksiyonların gelişmesinde ve glial yanıtta belirteç olan glial fibriler asidik protein düzeyinde anlamlı artma gözlemlenmiştir.

Karbamile Eritropoetin

Karbamile Eritropoetin (CEPO), EPO molekülündeki lizinlerin karbamilasyon ile homositruline dönüştürülerek geliştirilmiştir. EPOR'ne afinitesi daha düşüktür. Nöroprotektif etkilerini EPOR ve βc reseptörün birlikte oluşturduğu alternatif EPO reseptörü aracılığı ile gerçekleştirir (92, 93).

Leist M. ve arkadaşlarının (93) CEPO ile yaptıkları çalışmada, invitro UT7 hücrelerinde hematopoez bioassayde CEPO'nun EPO'nun biyoaktivitesine benzerlik göstermediğini ve bu hücrelerde EPOR'a bağlanmadığını göstermişlerdir. Ayrıca, CEPO'nun P19 hücre hattını apoptozdan koruduğu ve hipokampal hücrelerde N-metil-D- aspartat (NMDA) ile indüklenen apoptozu engellediğini göstermişlerdir. Serebral infarkt modelinde CEPO' nun, EPO ile aynı derecede doku koruyucu etki gösterdiğini belirlemişlerdir Diğer yandan retinal iskemi ve siyatik sinir basısında da CEPO'nun doku kuruyucu etkileri EPO ile aynı düzeyde bulunmuştur.

Brines M. ve arkadaşlarının (49), miyelin oligodendrosit glikoprotein (MOG) ile indükledikleri deneysel otoimmün ensefalomyelit (EAE) fare modelinde, haftada 3 kez CEPO uygulamasının nörolojik fonksiyonlarda anlamlı düzelmeyi sağladığını gözlemlemiştir.

Leist M. ve arkadaşlarının (93) diyabetik periferik nöropatili sıçan modelinde, CEPO ile yaptıkları çalışmada daha önceki çalışmalarda EPO'nun olumlu etkilerine benzer etkiler gözlemlemiştir.

Nöro Eritropoetin

Nöro Eritropoetin (Neuro-EPO), rHu-EPO biyoteknolojik olarak geliştirilirken sialik asit içeriğinin 4-7 mol/molprotein'e düşürülmesi ile geliştirilmiş EPO derivativesidir. Sialik asit içeriği düşük olduğu için kısa sürede karaciğerde yıkıma uğrar. Molekülün bu özelliği Neuro-

EPO'nun sistemik yıkıma uğramadan uygulanabileceği intranasal uygulama gibi alternatif yöntemleri geliştirmiştir (92, 96).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. Araştırmanın Tipi:

Deneysel nitelikte bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışmamız Aralık 2010 ile Aralık 2012 arasında gerçekleştirilmiştir. Deneylerin tamamı Dokuz Eylül Üniversitesi Araştırma laboratuvarında (Arlab) gerçekleştirilmiştir.

3.3. Araştırmanın Evreni ve Örneklemi/ Çalışma Grupları

Araştırmamız insan üzerinde yapılan bir çalışma değildir.

Çalışmamızın grupları şu şekildedir:

- Kontrol grubu (n:3)
- 24 saat Eritropoetin uygulanan grup (n:3)
- 48 saat Eritropoetin uygulanan grup (n:3)

3.4. Çalışma Materyali

Çalışmamızda pasaj 17'deki SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Almanyada bulunan, kısa adı DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) olan "Biyolojik Materyal İçin Kaynak Merkezi"nden 2006 yılında alınmıştır. Alım süreci firmalar aracılığı ile olmuştur.

3.5. Araştırmanın Değişkenleri

Çalışmamızın değişkenleri:

- mRNA ekspresyon seviyeleri: (bağımlı değişken)
- Eritropoetin (bağımsız değişken)

3.6. Veri Toplama Araçları

3.6.1. Hücre Kültürü

Pasaj 15'deki SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri -80°C'deki dondurucudan alınarak 37°C'deki su banyosunda çözüldü. Ardından içindeki hücre süspansiyonu 6 ml, %89

DMEM/F12 (Sigma Aldrich, USA), %10 Fetal sığır serumu (FBS: fetal bovine serum, Biochrom AG, Almanya) ve %1 L-Glutamin (Biochrom AG, Almanya) besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarıldı. Tüp 1500 rpm'de 5 dk santrifüj (Hettich, Almanya) edildikten sonra üst sıvı atıldı ve pelete 2 ml kültür ortamı eklenerek süspansiyon hale getirildi. Hücreler, Thoma lamı (Marienfeld, Almanya) kullanılarak sayıldı ve canlılığı kontrol edildi. 75 cm²'lik hücre flasklarına 1 x10⁶ hücre gelecek şekilde ekildi ve üzerlerine 10 ml kültür ortamı eklendi. İnverted ışık mikroskopunda (Olympus, Japonya) kontrol edilerek hücreler inkübatöre kaldırıldı.

Hücrelerin sıklık durumu inverted ışık mikroskopunda kontrol edildi. %80 konfluent olan flasklar pasajlandı. Hücreler pasajlanırken flasklardaki hücre kültür ortamı çekilip atıldı. 10 ml Fosfat tamponlu fizyolojik solüsyon (Phosphate buffered saline; PBS) eklenerek yıkandıktan sonra PBS uzaklaştırıldı. Hücrelere 5 ml Tripsin/EDTA (%0,05/%0,02) solüsyonu eklenerek inkübatör içinde 2 dakika bekletildi. Hücrelerin flask yüzeyinden ayrılması sağlandı. Daha sonra flasklara 5 ml kültür ortamı eklendi, süspansiyon 15 ml'lik tüplere aktarıldı. Hücreler 1500 rpm hızda 5 dakika santrifüj edildikten sonra çöken hücrelerin üzerinde kalan ortam uzaklaştırıldı. Hücreler 1 ml kültür ortamı eklenerek süspansiyon hale getirildi. Hücreler, Thoma lamı (Marienfeld, Almanya) kullanılarak sayıldı. Flask başına, 1 x10⁶ hücre gelecek şekilde ekildi ve üzerlerine 10 ml kültür ortamı eklendi.

3.6.2. İn vitro Deney

Pasaj 15'deki SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri 75 cm²'lik hücre flasklarına (Greiner, USA) 3x10⁶ hücre/flask yoğunlukta olacak şekilde %89 DMEM/F12 (Sigma Aldrich, USA), %10 Fetal sığır serumu (Biochrom AG, Almanya) ve %1 L-Glutamin (Biochrom AG, Almanya) içeren hücre kültürü ortamı ile ekildi.

Flasklar 24 saat süreyle 37°C'de, %5 CO₂'li ve nemli hava içeren etüvde (Termo Scientific, ABD) inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kontrol grubu (n:3) Optimem (serumsuz ortam) (Gibco, ABD) ortamına geçildi. 24 saatlik EPO indüksiyonu uygulanacak grup (n:3), 48 saatlik EPO indüksiyonu uygulanacak grup (n:3) da Optimem ortamına geçildi. EPO (Neorecormon, 3000IU, Roche, Almanya) indüksiyonu 1 U/ml dozda, 24 ve 48 saat süreyle uygulandı.

3.6.3 RNA İzolasyonu

İn vitro deney sonrasında mikroarray için hücrelerden total RNA izolasyonu Qiagen'in miRNeasy mini kit'i ile izole edilmiştir. Tüm işlem üreticinin belirttiği biçimde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle hücreler flasklardan hücre kazıyıcı (Grenier, Almanya) ile toplandıktan sonra 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edilerek çöktürüldü ve ortam uzaklaştırıldı lizis için 700 µl QIAzol Lizis tamponu eklendi. Vortekslenip karıştırıldı. Oda ısısında 5 dakika bekletildi. Üzerine 140 µl kloroform eklendi ve her bir tüp 15 saniye karıştırıldı. Oda ısısında 2-3 dakika bekletildi. 12,000xg'de 15 dakika +4 C⁰'de santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında üst faz yeni toplama tüpüne aktarıldı. 525 µl %100 etanol eklendi, pipetleme yapıldı. 700 µl alınarak firmanın 2ml'lik toplama tüpündeki döndürme kolonuna eklenip 15 saniye 8,000xg'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında alt sıvı atıldı ve aynı işlem kalan örnek için tekrarlandı. 500 µl RPE tamponundan yıkama işlemi için eklendi ve 15 saniye 8,000xg'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında alt sıvı atıldı. Tekrar 500 µl RPE tamponundan yıkama işlemi için eklendi, membranı kurutmak için 2 dakika 8,000xg'de oda sıcaklığında santrifüj edildi. Döndürme kolonu yeni 1,5 ml'lik toplama tüplerine aktarıldı 50 µl Rnase free su eklendi, RNA'yı toplamak için 1 dakika 8000xg'de santrifüj edildi.

Örnekler 1:25 oranında seyreltilerek hazırlandı. UV – Spektrofotometrede (Agilent, ABD) A₂₈₀ / A₂₆₀ oranı ölçüldü.

3.6.4. Mikroarray Analizi

Mikroarray analizi için AROS (Danimarka) Firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Mikroarray analizi İllumina's BeadArray teknolojisi ile yapılmıştır. Bu teknolojiye göre, genom gen ekspresyonu analizi boncuk (bead) çipleri ile yapılmaktadır. Mikro kuyucukların içindeki bead (boncuk) lara oligonükleotidler sabitlenmiştir. Herbir array için birçok boncuk bulunmaktadır. Prob başına yaklaşık 30 boncuk kullanılır. Hibridizasyon için her bir boncuk için 29 –mer belirli diziler (address sequence) içeren proplar vardır. cRNA biotin ile işaretlenmiştir. Bead çip üzerinde toplam uzunluğu 50-mer olan propların hibridizasyonu ile cRNA'lar belirlenebilir. Yıkama ve boyama aşamalarından sonra BeadArray Reader (Okuyucu) ile belirlenmiştir.

3.6.5. Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu (Quantitative PCR, qPCR) array analizi

Kantitatif Polimeraz Zincir Reaksiyonu analizi seçtiğimiz 26 gen için yapılmıştır. AROS (Danimarka) firmasına mikroarray analizi için gönderdiğimiz total RNA örneklerinden qPCR analizi yapılmıştır. Seçtiğimiz 26 gen için uygun Taqman probalar kullanılmıştır. qPCR analizi Fluidigm platformunda yapılmıştır. Ekspresyon analizi için herbir örneğin Ct (Threshold cycle- siklus eşik değeri) kullanılmıştır.

3.6.6. mRNA'ların rol aldığı yollarının analizi

Mikroarray ve qPCR analizleri sonucunda belirlenen 26 genin yer aldığı hücre içi yolların belirlenmesi için KEGG (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) yazılımı ve Reactome programı kullanılmıştır (<http://www.reactome.org/>). Reactome programında “pathways analysis” (yol analiz) bölümünde ekspresyonu değişen genlerin hangi yolları etkilediği, hangi genlerin bu süreçte yer aldığı belirlenmiştir. “analyse expression data” (ekspresyon verilerinin analizi) bölümünde ise ekspresyon değişimi gözlenen genlerin ve kontrol grubunun 48 saatteki Ct değerleri girilerek yer aldıkları yolların haritalanması ve bu yolda proteinlerin ne kadarını (%) yer aldığı belirlenmiştir.

3.7. Araştırmanın Planı ve Takvimi

İnvitro Deneyler	Aralık 2010- Şubat 2011
Mikroarray Analizi	Mart 2011- Haziran 2011
Mikroarray Verilerin Analizi	Temmuz 2011- Ekim 2011
qPCR Analizi	Kasım 2011- Ocak 2012
qPCR Verilerin Analizleri	Şubat 2012- Mayıs 2012
Tez Yazım	Ağustos 2012- Aralık 2012

3.8. Verilerin Değerlendirilmesi

Mikroarray verileri hem AROS firması tarafından hem de ekibimiz tarafından değerlendirilmiştir. Mikroarray verileri için Multi Experiment Viewer 4 (MEV4) programı kullanılmıştır. qPCR verileri de hem firma hem de ekibimiz tarafından değerlendirilmiştir.

qPCR verilerinin değerlendirilmesinde deltadelta Ct ($\Delta\Delta Ct$) değeri kullanılmıştır. Her iki yöntemde de ekspresyon değişimlerinin anlamlı olup olmadığını belirlemek için parametrik t-testi uygulanmıştır. Tüm analitik değerlendirmelerde $p \leq 0.05$ anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları

Çalışmamızda nöron benzeri bir kanser hücre hattı olan SHSY-5Y hücre hattı kullanılmıştır. EPO'nun nöronlardaki mRNA ekspresyon değişimine etkisinin primer nöron kültürü ya da diferansiye hücre kültüründe incelenmesi daha ayrıntılı bilgi verebilir.

3.10. Etik Kurul Onayı

Dokuz Eyll Üniversitesi Girişimsel Olmayan Klinik Araştırmalar Değerlendirme Komisyonu 11 Ağustos 2010 tarih ve 2010/10-14 sayılı karar ile çalışmamız etik açıdan uygun görülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. Mikroarray Analizinde Eritropoetin Uygulaması ile Ekspresyonu Değişen mRNA'ların Belirlenmesi

Mikroarray analizi ile 24 saatlik Eritropoetin uygulamasından sonra kontrol grubu ile karşılaştırıldığında gen ekspresyonunda istatistiksel olarak anlamlı bir değişiklik bulunamamıştır. 48 saatlik Eritropoetin uygulamasında kontrol grubunda gen ekspresyonu anlamlı olarak değişmiştir.

Tablo 4'de 48 saatlik Eritropoetin uygulaması sonrasında mikroarrayde ekspresyonu istatistiksel açıdan anlamlı olarak en fazla artan mRNA'lar verilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 4: 48 saatlik EPO uygulaması sonrasında mikroarray analizinde anlamlı olarak artan mRNA'lar

mRNA Kısa Adı	mRNA Adı	Kat Değişim	p Değeri
DLK1	Delta, drosophila, homolog like 1	2,645	0,0017
GAL	Galanin	2,426	0,0003
CABP7	Calcium binding protein	2,364	4636036 222,2063 9
LOC440063	Cyclophilin A pseudogene	2,274	0,04
BHLHB2	Basic helix loop helix domain containing protein class B2	2,134	0,00025
IGF2	Insulin like growth factor 2	2,105	0,00057
GNAS	Guanine nucleotide binding protein	2,001	0,00031
TRK1	Transfer RNA Lysine 1	1,836	0,030
NELL2	NEL like 2	1,828	0,0031
C20ORF46	Transmebran protein	1,813	0,00024
IGSF21	Immunglobulin super family member 21	1,809	0,0032
RAB6B	Member RAS oncogene family	1,795	0,00022
GALNTL4	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4	1,788	0,00024
OLFM1	Olfactomedin 1- Neuroblastoma proteini	1,780	0,0020
C20ORF160	Chromosome 20 open reading frame 160	1,780	0,0036
SOBP	Sine Oculus binding protein homolog drosophila	1,766	0,0026
NR2F2	Nuclear reseptor subfamily 2	1,757	0,0036
SGPP2	Sphingosine 1 phosphate phosphatase 2	1,756	0,014
C3ORF32	Chromosome 3 open reading frame 32	1,749	0,00046
SUSD2	Sushi domain containing 2	1,728	0,0028

mRNA Kısa Adı	mRNA Adı	Kat Değişim	p Değeri
C2CD4B	C2 Calcium dependent domain containing protein 4B	1,727	0,011
TSPAN7	Tetraspanin 7	1,691	0,0008
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	1,690	0,0043
SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2	1,686	0,00091
CNTNAP4	Contactin associated protein 4	1,662	0,00014
LOC100132291	Ribozomal protein S27 Pseudogene 29	1,656	0,034
CDKN1C	Cyclin dependent kinase inhibitor 1C	1,651	0,007
LOC391019	Ribozomal protein L29 Pseudogene 6	1,643	0,023
LOC729086	Vesicular overexpressed in cancer, prosurvival protein 1 pseudogene	1,639	0,029
BOLA2	Bol A2 homolog (E.coli)	1,634	0,0027
SH2D3C	SH domain containing protein 3C	1,617	0,0017
FLJ43681	Ribozomal protein L23a Pseudogene	1,608	0,024
LOC653232	Ribozomal protein L15 Pseudogene 3	1,606	0,064
CYB5A	Cytochrome b5 type A (Microosomal)	1,606	0,002
LOC442232	Ribozomal protein L17 Pseudogene 25	1,600	0,017
TSPAN4	Tetraspanin 4	1,590	0,008
HES4	Hairy enhancer of split, drosophila homolog of 4	1,583	0,013
LOC728820	Ribozomal protein L29 Pseudogene 15	1,582	0,013
LOC92755	Tubulin beta pseudogene 1	1,580	0,0063
CXCR4	Chemokine CXC motif reseptor 4	1,579	0,00029
HBQ1	Hemoglobin theta 1	1,575	0,017
LOC100128060	Ribozomal protein S7 Pseudogene 10	1,562	0,029
LOC731640	Ribozomal protein L21 Pseudogene 97	1,553	0,016

mRNA Kısa Adı	mRNA Adı	Kat Değişim	p Değeri
AQP10	Aquaporin 10	1,549	0,0021
RPL14	Ribozomal protein L14	1,543	0,033
SYP	Synaptophysin	1,541	0,0009
LOC651453	Ribozomal protein L36 Pseudogene 14	1,530	0,017
MCM2	Minichromosome maintenance complex component 2	1,528	0,004
SLC7A14	Solute carrier family 7 member 14	1,516	0,028
INS-IGF2	INS-IGF2 readthrough	1,513	0,010
HCN3	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 3	1,512	0,0016
GALNTL1	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 1	1,512	0,008

Tablo 5’de, 48 saatlik Eritropoetin uygulaması sonrasında ekspresyonu anlamlı olarak en fazla azalan mRNA’lar gösterilmiştir. $p < 0,05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 5: 48 saatlik EPO uygulaması sonrasında mikroarray analizinde anlamlı olarak azalan mRNA'lar

mRNA Kısa Adı	mRNA Adı	Kat Değişim	p Değeri
S100A13	S100 calcium binding protein A13	0,495	0,075
MGP	Matrix Gla Protein	0,492	0,00041
IFITM2	Interferon induced transmembrane protein 2	0,491	0,00088
COL5A2	Collagen, type V, alpha	0,489	0,0045
HTRA1	HtrA serine peptidase 1	0,476	0,0017
MATN2	Matrilin 2	0,476	0,017
IFITM3	interferon induced transmembrane protein 3	0,468	0,00017
AHNAK	AHNAK nucleoprotein	0,467	0,00011
OLFML3	Olfactomedin-like 3	0,461	0,0028
COL3A1	Collagen, type III, alpha 1	0,457	0,0012
SPARC	Secreted protein, acidic, cysteine-rich	0,455	888650908, 35978
GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	0,448	0,0063
TP53I3	Tumor protein p53 inducible protein 3	0,446	0,00030
EGR1	Early growth response 1	0,443	0,052
TSPAN8	Tetraspanin 8	0,439	0,006
S100A10	S100 calcium binding protein A10	0,425	0,00029
LRRC17	Leucine rich repeat containing 17	0,410	0,0063
MME	Membrane metallo-endopeptidase	0,382	0,00055
PRSS23	Protease, serine, 23	0,362	0,0035
IL13RA2	Interleukin 13 receptor, alpha 2	0,344	0,0019
FOSB	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	0,344	0,072
TAGLN	Transgelin	0,227	0,00063
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	0,172	0,0076

4.2. Kantitatif PCR Analizinde Eritropoetin Uygulaması ile Ekspresyonu Değişen mRNA'ların Belirlenmesi

Mikroarray analizi sonucunda ekspresyonu anlamlı olarak değişen genlerden ekspresyonu artan 18 gen ve ekspresyonu azalan 8 gen için qPCR konfirmasyonu yapılmıştır. qPCR konfirmasyonu yapılacak genler literatür taraması yapılarak seçilmiştir. qPCR sonuçlarında da 24 saatlik Eritropoetin uygulaması sonrasında kontrol grubuna göre anlamlı bir değişiklik saptanamamıştır. 48 saatlik Eritropoetin uygulanan grup kontrol grubu ile karşılaştırıldığında qPCR sonuçları mikroarray sonuçları ile uyumludur.

Tablo 6'de 48 saatlik Eritropoetin uygulanması sonrasında qPCR ile ekspresyonları anlamlı olarak artan genler gösterilmiştir. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

Tablo 6: 48 saatlik EPO uygulaması sonrasında qPCR’da anlamlı olarak artan mRNA’lar

mRNA Kısa Adı	mRNA Adı	Kat Değişim	p Değeri
GAL	Galanin	3,023	3,49071E-05
BHLHB2	Basic helix loop helix domain containing protein class B 2	2,584	0,007
NELL2	NEL like 2	2,435	0,00021
IGF2	Insulin like growth factor 2	1,945	0,0049
TSPAN7	Tetraspanin 7	1,843	0,0013
SOBP	Sine Oculus binding protein homolog drosophila	1,781	0,00048
OLFM1	Olfactomedin 1- Neuroblastoma proteini	1,766	0,0019
RAB6B	Member RAS oncogene family	1,735	0,0015
CXCR4	Chemokine CXC motif reseptor 4	1,728	0,0018
HES4	Hairy enhancer of split, drosophila homolog of 4	1,721	0,025
SH2D3C	SH domain containing protein 3C	1,707	0,00015
IGSF21	Immunoglobulin super family member 21	1,680	0,00025
CNTNAP4	Contactin associated protein 4	1,655	0,0119
SYP	Synaptophysin	1,645	0,0021
HCN3	Hyperpolarization activated cyclic nucleotide gated potassium channel 3	1,563	0,0030
TSPAN4	Tetraspanin 4	1,558	0,00021
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	1,534	0,00071
GNAS	Guanine nucleotide binding protein	1,368	0,0026

48 saatlik EPO Uygulaması ile qPCR’da ekspresyonu anlamlı olarak azalmış genler Tablo 7’de gösterilmiştir.

Tablo 7: 48 saatlik EPO uygulaması sonrasında qPCR’da anlamlı olarak azalan mRNA’lar

mRNA Kısa Adı	mRNA Adı	Kat Değişim	p Değeri
EGR1	Early growth response 1	0,689	0,060
TSPAN8	Tetraspanin 8	0,451	0,00030
GPNMB	Glycoprotein (transmembrane) nmb	0,433	0,00011
IL13RA2	Interleukin 13 receptor, alpha 2	0,336	6,2647E-06
S100A10	S100 calcium binding protein A10	0,320	0,0083
MME	Membrane metallo-endopeptidase	0,279	0,00088
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	0,259	0,0040
TAGLN	Transgelin	0,186	4,0895E-05

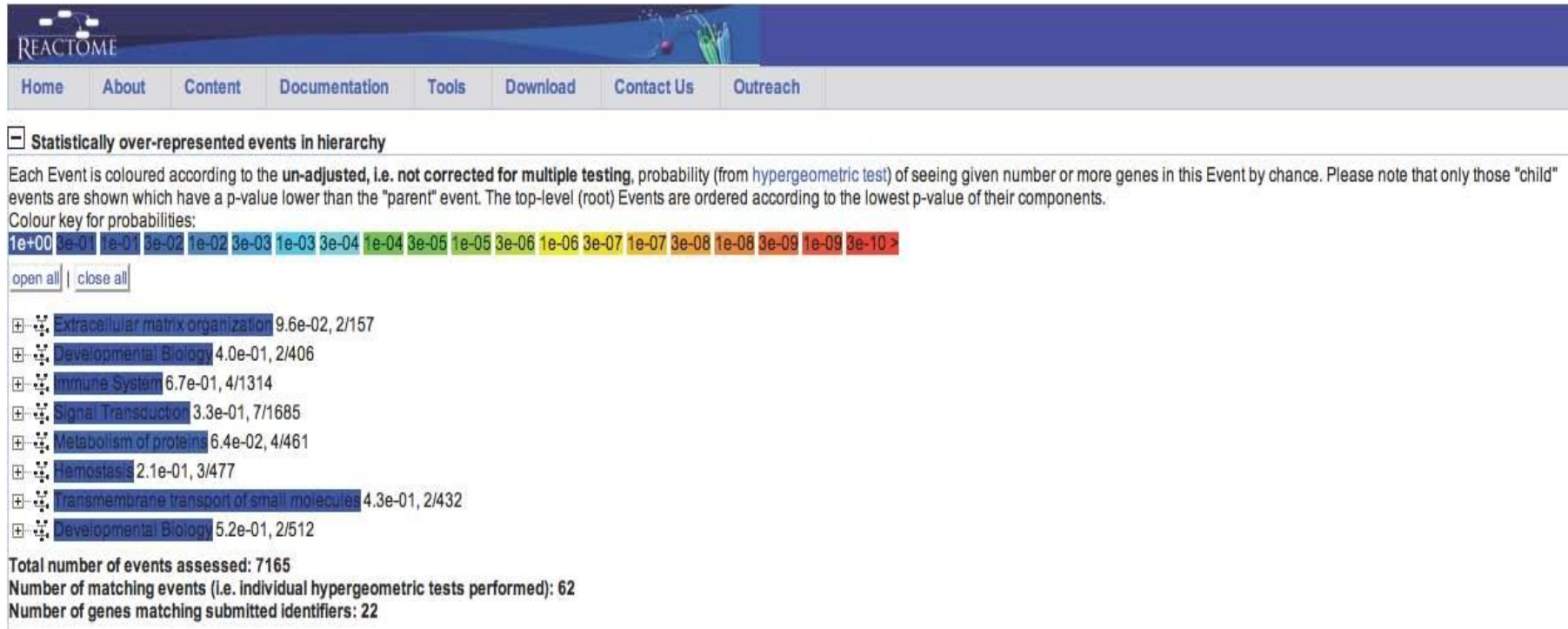
4.3. Anlamlı değişim gösteren mRNA’ların yer aldığı yollar

Mikroarray ve qPCR sonuçlarında anlamlı değişim gösteren mRNA’ların hangi yolda rolü olduğunu belirlemek için KEGG yazılımından ve Reactome programından yararlanılmıştır. Mikroarray analiz sonuçlarına göre qPCR konfirmasyonu yapılan 26 genden KEGG yazılımına göre 9 tanesi tanımlanmış yollarda ve metabolik olaylarda rol oynamaktadır. Tablo 8’de KEGG yazılımına göre mRNA’ların yer aldığı yollar gösterilmiştir.

Tablo 8: KEGG yazılımına göre mRNA'ların rol aldığı yollar

mRNA Kısa Adı	mRNA Adı	İlgili Yolak
GAL	Galanin	Nöroaktif ligand reseptör ilişkisi, Çevresel bilgi işleme
BHLHB2	Basic helix loop helix domain containing protein class B 2	Memeli sirkadyen ritmi
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A	Kanser yolları, mTOR sinyal yolağı
CXCR4	Chemokine CXC motif reseptör 4	Axon guidance, Sitokin-sitokin reseptör ilişkisi, Kemokin sinyal yolağı
SYP	Synaptophysin	Vesiküler transportta SNARE etkileşimi
EGR1	Early growth response 1	Prion hastalıkları, HTLV-1 enfeksiyonları
MME	Membrane metallo-endopeptidase	Alzheimer hastalığı, Renin anjiyotensin sistemi, Protein parçalanması ve emilimi, Hematopoietic cell lineage
IL13RA2	Interleukin 13 receptor, alpha 2	Jak-STAT Sinyal yolağı
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog	MAPK Sinyal yolağı, Kanser yolları, Kolinerjik sinapslar, Dopaminerjik sinapslar, Toll-like reseptör sinyal yolağı, B Hücre reseptör sinyal yolağı, T Hücre Reseptör sinyal yolağı, Osteoklast farklılaşması, Amfetamin bağımlılığı

Mikroarray ve qPCR sonuçlarına göre ekspresyonu değişen genler için reactome programında analiz yapıldığında EPO'nun ekstrasellüler matriks organizasyon, gelişimsel biyoloji, immun sistem, sinyal dönüştürülmesi, protein metabolizması, hemostaz, küçük moleküllerin transmembran transportu ile ilgili ana yolları etkilediği belirlenmiştir (Şekil 2). EPO uygulaması ile ekspresyonu değişen genlerin yer aldığı alt yollar Tablo 9'da verilmiştir.



Şekil 2: Ekspresyonu anlamlı değişen genlerin yer aldığı ana yollar

Tablo 9: 48 saat EPO uyarımı ile ekspresyonu değişen genlerin yer aldığı alt yollar

Number of genes in your query which map to this Event	Total number of genes involved in this Event	Identifier of this Event	Name of this Event	Submitted identifiers mapping to this Event
2	11	REACT_150299	Formation of collagen fibrils	COL3A1, COL5A2
2	11	REACT_150338	Formation of collagen fibres	COL3A1, COL5A2
2	15	REACT_121172	Removal of fibrillar collagen N-propeptides	COL3A1, COL5A2
2	15	REACT_121108	Removal of fibrillar collagen C-propeptides	COL3A1, COL5A2
2	20	REACT_18390	Interaction of NCAM1 with collagens	COL3A1, COL5A2
3	87	REACT_25192	Expression of IFN-induced genes	IFITM3, EGR1, IFITM2
2	26	REACT_16880	PDGF binds to extracellular matrix proteins	COL3A1, COL5A2
3	112	REACT_25162	Interferon alpha/beta signaling	IFITM3, EGR1, IFITM2
2	39	REACT_115586	Addition of GalNAc to mucins to form the Tn antigen	GALNTL4, GALNTL1
2	42	REACT_121366	Secretion of collagens	COL3A1, COL5A2
2	44	REACT_18312	NCAM1 interactions	COL3A1, COL5A2
2	44	REACT_121254	Association of procollagen chains	COL3A1, COL5A2
2	45	REACT_120861	PDI is a chaperone for collagen peptides	COL3A1, COL5A2
2	46	REACT_120777	Galactosylation of collagen propeptide hydroxylysines by PLOD3	COL3A1, COL5A2
2	46	REACT_120743	Glucosylation of collagen propeptide hydroxylysines	COL3A1, COL5A2
2	47	REACT_21351	Exocytosis of platelet alpha granule contents	SPARC, VEGFA
2	47	REACT_121077	Galactosylation of collagen propeptide hydroxylysines by procollagen galactosyltransferases 1, 2	COL3A1, COL5A2
2	48	REACT_121152	Collagen prolyl 4-hydroxylase converts proline to 4-hydroxyproline	COL3A1, COL5A2
2	48	REACT_120864	Procollagen lysyl hydroxylases convert lysine to 5-hydroxylysine	COL3A1, COL5A2
2	48	REACT_120939	Procollagen triple helix formation	COL3A1, COL5A2
2	50	REACT_23887	Aquaporin-mediated transport	AQP10, GNA5
2	50	REACT_120863	Collagen prolyl 3-hydroxylase converts proline to 3-hydroxyproline	COL3A1, COL5A2
2	55	REACT_150180	Assembly of collagen fibrils and other multimeric structures	COL3A1, COL5A2
2	62	REACT_150401	Degradation of collagen	COL3A1, COL5A2
2	63	REACT_115605	O-linked glycosylation of mucins	GALNTL4, GALNTL1
2	63	REACT_121139	Collagen biosynthesis and modifying enzymes	COL3A1, COL5A2
2	70	REACT_18334	NCAM signaling for neurite out-growth	COL3A1, COL5A2
2	78	REACT_316	Platelet degranulation	SPARC, VEGFA
2	79	REACT_118572	Degradation of the extracellular matrix	COL3A1, COL5A2
2	83	REACT_1280	Response to elevated platelet cytosolic Ca2+	SPARC, VEGFA
2	85	REACT_120729	Collagen formation	COL3A1, COL5A2
3	231	REACT_25229	Interferon Signaling	IFITM3, EGR1, IFITM2
2	108	REACT_88853	NCAM signaling for neurite out-growth	COL3A1, COL5A2

Ekspresyonu değişen genlerden 2 tanesinin akson guidance ile ilgili alt yolda yer aldığı belirlenmiştir.

Reactome programında “analyse expression data” bölümünde ekspresyon değişimi gözlenen genlerin yer aldıkları yollarda proteinlerin ne kadarını (%) yer aldığı Tablo 10’da gösterilmiştir.

Tablo 10: Ekspresyon değişimi gözlenen genlerin % olarak yer aldığı yollar

 Home About Content Documentation Tools Download Contact Us Outreach					
Expression per pathway					
This table provides an overview of your expression data in a pathway context. More....					
Video Tutorial					
Select format to download this table: Microsoft Xcel Download					
Pathway name ▼▲	Species ▼▲	Total number of proteins ▼▲	Matching proteins in data ▼▲	% in data ▼▲	Click button to view pathway
Signaling by VEGF	Homo sapiens	22	6	27%	View
Metabolism of Angiotensinogen to Angiotensins	Homo sapiens	12	1	8%	View
Regulation of Insulin-like Growth Factor (IGF) Activity by Insulin-like Growth Factor Binding Proteins (IGFBPs)	Homo sapiens	18	1	5%	View
Cellular response to hypoxia	Homo sapiens	25	1	4%	View
Cellular responses to stress	Homo sapiens	25	1	4%	View
Regulation of Hypoxia-inducible Factor (HIF) by Oxygen	Homo sapiens	25	1	4%	View
Regulation of Water Balance by Renal Aquaporins	Homo sapiens	26	1	3%	View
MAPK targets/ Nuclear events mediated by MAP kinases	Homo sapiens	27	1	3%	View
Aquaporin-mediated transport	Homo sapiens	33	1	3%	View
Circadian Clock	Homo sapiens	36	1	2%	View
MAP kinase activation in TLR cascade	Homo sapiens	46	1	2%	View
Platelet homeostasis	Homo sapiens	58	1	1%	View
HIV Life Cycle	Homo sapiens	121	2	1%	View
MyD88 cascade initiated on plasma membrane	Homo sapiens	66	1	1%	View
MyD88 dependent cascade initiated on endosome	Homo sapiens	68	1	1%	View
MyD88:Mal cascade initiated on plasma membrane	Homo sapiens	73	1	1%	View
MyD88-independent cascade	Homo sapiens	78	1	1%	View
Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺	Homo sapiens	83	1	1%	View

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda EPO'nun bir nöroblastoma hücre hattı olan SHSY-5Y'de meydana getirdiği mRNA ekspresyon değişiklikleri mikroarray ve qPCR yöntemi ile araştırılmıştır. Sonuçlarımıza göre, 24 saatlik EPO uygulaması ile anlamlı bir değişiklik belirlenemezken, 48 saatlik EPO uygulaması ile toplamda ekspresyonu değişen 75 genden 15 tanesi ekstrasellüler matriks organizasyon, gelişimsel biyoloji, immün sistem, sinyal dönüştürülmesi, protein metabolizması, hemostaz, küçük moleküllerin transmembran transportu ile ilgili ana yollarda yer aldığı belirlenmiştir. Ekspresyon değişimi 52 gende ekspresyonda artış, 23 gende ekspresyonda azalış şeklinde idi. qPCR konfirmasyonu için literatür taraması ile seçilen 26 genden 18 tanesinin ekspresyonunda mikroarray verileri ile uyumlu olarak artış, 8 genin ekspresyonunda mikroarray verileri ile uyumlu olarak azalış belirlenmiştir. Bu çalışma, EPO'nun nöronal kökenli hücre hattında mRNA'ların etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

EPO mikroarray ve proteomiks çalışmaları

İlgili literatüre baktığımızda, Mauer MH. ve arkadaşlarının (97), Eritropoetin'i 26 kat fazla eksprese eden transgenik farelerde serebral transkriptom analizi yaptıkları çalışmalarında hücresel metabolizma ile ilişkili genlerden peroksizomal biyogenez faktör (PEX16), mitokondriyal 28 S ribozomal protein (S18-2), mitokondri iç membran translokaz TIM17a ve N-asetilglukozamin-6-O-sulfotransferaz genlerinin upregülasyonunu göstermişlerdir.

Jull SE. ve arkadaşları (98), neonatal fare oksidatif beyin hasarı modelinde Eritropoetin'in proapoptotik, proinflamatuvar genlere etkisini incelemek için yaptıkları çalışmalarında IL-1 α , IL-6, Kaspaz 4, Kaspaz6 ve p53 gen ekspresyonlarının EPO uygulaması ile azaldığını göstermişlerdir.

EPO'nun koruyucu etkilerini proteomiks yöntemi ile inceleyen çalışmalarda, EPO uygulamasının protein up-regülasyonu ile sonuçlandığı ve artan proteinlerin antioksidan, mitokondrial, metabolik, hücre iskeleti ve sinyal yolları ile ilgili proteinler olduğu belirlenmiştir (99). Neonatal hipoksik/iskemik modelinde yapılan proteomiks çalışmasında EPO'nun koruyucu etkisinde SNAP-25'in aracılık edebileceği belirtilmiştir (91).

İlgili literatürdeki tek hücre hattı çalışması olan Renzi MJ. ve arkadaşlarının (100) yaptığı çalışmada, PC-12 Sıçan feokromositoma hücre hattı kullanılmıştır. Bu hücre hattında

EPO indüksiyonu ile gen ekspresyonu değişikliklerini incelediklerinde hücre proliferasyonu, diferansiasyon ve apoptoz ile ilişkili genlerin ekspresyonlarının arttığını bulmuşlardır.

EPO Uyarımı ile En Fazla Ekspresyon Değişimi Gösteren Genler

Çalışmamızda ekspresyonu en fazla artmış bulunan genlerden birisi olan Galanin (GAL) geni, santral ve periferik sinir sisteminde birçok fizyolojik fonksiyonlarda hücrel mesajcı olarak görev alan küçük nöropeptiddir (101). İlgili literatürde EPO'nun bu gen ekspresyonunu etkilediğine dair bir yayına rastlanmamıştır. EPO'nun nöronal hücrelerde nöron koruyucu etkilerine aracılık etmesi olası bir gendir.

Basic helix loop helix domain containing protein class B 2 (BHLHB2) geni birçok dokuda eksprese edilen basic helix-loop-helix proteinini kodlar. Kodladığı proteinin hücre diferansiasyonu kontrolünde rol oynadığı düşünülmektedir (102, 103). Bizim çalışmamızda EPO'nun BHLHB2 gen ekspresyonunu arttırdığı bulunmuştur. İlgili literatürde EPO'nun bu gen ekspresyonunu etkilediğine dair bir yayına rastlanmamıştır.

Çalışmamızda 48 saatlik EPO uygulaması ile ekspresyon artışı gözlemlediğimiz diğer bir gen NEL like 2 (NELL2) genidir. NELL2 geni epidermal büyüme faktörü ailesi ile ilişkilendirilmiştir. Epidermal büyüme faktörü (EGF) tekrarları içeren sitoplazmada bulunan bir glikoproteini kodlar (104). Yapılan çalışmalarda bu genin nöral hücre büyümesinde, diferansiasyonda ve onkogeneizde yer aldığını bildirilmiştir (105). İlgili literatürde EPO'nun bu gen ekspresyonunu etkilediğine dair bir yayına rastlanmamıştır. EPO'nun nöronal hücrelerde nöron koruyucu etkilerine aracılık etmesi olası bir gendir.

Çalışmamızda EPO uygulaması ile ekspresyonu en fazla azalan genlerden biri Transgeline (TAGLN) genidir. TAGLN geni transformasyonda görev alan ve fibroblast ve düz kas hücrelerinde bulunan bir protein kodlar. Birçok hücre hattında down regüle olduğu bulunmuştur. Bu bulgu transformasyonun erken bir belirteci olarak kabul edilir (106, 107). İlgili literatürde EPO'nun bu gen ekspresyonunu etkilediğine dair bir yayına rastlanmamıştır.

FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog (FOS), 4 üyeden oluşan bir gen ailesidir. Ürünü olan protein jun proto-onkogen (JUN) gen ailesi ile dimerize olur ve transkripsiyon faktör kompleksi Aktivatör protein-1 (AP-1)'in formasyonunda görev alır. FOS, hücre proliferasyonu, diferansiasyonu ve transformasyonunda regülatuar olarak görev alırlar. Bazı çalışmalarda FOS ekspresyonu apoptotik hücre ölümü ile ilişkilendirilmiştir (108). Bizim çalışmamızda FOS ekspresyonunun EPO uygulaması ile azaldığı bulunmuştur. Bu

bulgu EPO'nun anti-apoptotik etkisini destekleyen bir bulgudur. İlgili literatüre baktığımızda EPO'nun koruyucu etkilerinde FOS geninin ilgili transkripsiyon faktörü olan AP-1'in rolü olduğu belirlenmiştir (109).

Membrane metallo-endoropeptidase (MME) geni akut lenfoblastik lösemi antijeni kodlar. Sadece lösemik hücrelerde değil birçok normal dokuda da bulunur. Kodladığı protein nötral endopeptidazdır ve birçok peptid hormonun inaktivasyonunda rol oynar (110). Nöronlarda gamma sekretaz kompleksini bir üyesi ile regüle edilir (111). Bizim çalışmamızda 48 saatlik EPO uygulaması ile MME gen ekspresyonunda azalma gözlemlenmiştir. İlgili literatürde EPO'nun bu gen ekspresyonunu etkilediğine dair bir yayına rastlanmamıştır.

Önceki Araştırmalarda EPO'nun Ekspresyon Değişimi Yaratdığı Bildirilen Genler

Early growth response 1 (EGR1) geni, EGR ailesine ait bir gendir, transkripsiyonel regülatör olarak rol oynar. Çalışmamızda anlamlı olarak azalan genlerden biridir. Eritrolökemik hücre hattı olan UT7 hücrelerinde EGR1 geninin EPO antikoru uygulaması ile ekspresyonunun azaldığı belirlenmiştir (112). Bu çalışma ile bulgularımızın uyuşmamasının nedeni kullanılan hücre hattındaki farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Çalışmamızda SHSY-5Y insan kökenli nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Yapılan diğer bir çalışmada, EPO uygulamasının serebral iskemi sonrasında sıçan iskemik korteksindeki gen ekspresyon değişikliklerine etkisi incelenmiştir. Bu çalışmada EGR1 geni ekspresyonu artmış bulunmuştur (113). Bu çalışma ile bulgularımızın uyuşmamasının nedeni kullanılan zaman ve tür farklılıktan kaynaklanıyor olabilir. Çalışmada 2 ve 6.cı saatlerdeki EPO yanıtı değerlendirilirken bizim çalışmamızda 24 ve 48.ci saatlerdeki yanıt incelenmiştir. Bizim çalışmamızda kullandığımız hücre hattı insan kökenli nöronal hücre hattıdır.

CXCR4 geni stromal hücre kaynaklı faktör-1'e spesifik CXC kemokin reseptörü kodlar. Çalışmamızda anlamlı olarak artan genlerden biridir. EPO'nun sıçan akut iskemik stroke modelinde beyin hasar alanına ve nörolojik durumuna etkisini inceleyen çalışmada EPO verilen grupta verilmeyen gruba göre artmış CXCR4 gen ekspresyonu gözlemlenmiştir (114). Çalışmamızın sonuçları bu bulgular ile uyum göstermektedir. TNF alfa uygulanmış insan beyin mikrovasküler endotel hücrelerinde EPO'nun gen ekspresyonuna etkisi incelendiğinde CXCR4 gen ekspresyonunun EPO uygulanan grupta azaldığı gözlemlenmiştir

(115). Bu çalışma ile sonuçlarımızın uyuşmamasının nedeni EPO uygulamasından önce hücrelere TNF-alfa uygulamasının verilmesi olabilir.

Sinaptofizin (SYP) geni beyin ve endokrin hücrelerde küçük sinaptik veziküllerin integral membran proteinini kodlar. Çalışmamızda anlamlı olarak artan genlerden biridir. Eritrolösemik SKT6 hücre hattında hematopoetik sitokinlerin etkisi incelendiğinde EPO'nun SYP geni üzerinde bir etkisi bulunamamıştır (116). Bu çalışma ile sonuçlarımızın uyumlu olmamasının nedeni kullanılan hücre hattından kaynaklanıyor olabilir.

EPO Uyarımı ile En Fazla Ekspresyon Değişimi Gözlenen Yolaklar

Çalışmamızda EPO 48 saat uygulaması ile % olarak en fazla protein değişiminin görüldüğü yolak VEGF sinyal yolağıdır. Bu yolda %27 oranında protein değişimi saptanmıştır. VEGFA geni ilgili yolda yer alan ve çalışmamızda ekspresyonu artmış bulunan genlerdir. VEGFA geni, PDGF/VEGF büyüme faktörü gen ailesinin bir üyesidir. Özellikle endotel hücrelerinde hücre göçünü artırma, apoptozu inhibe etme gibi birçok etkisi bulunmaktadır (117). İlgili literatürde VEGFA geninin ekspresyonunun EPO uygulaması ya da EPO gen ekspresyonu artışı ile artış gösterdiği belirtilmiştir (117-119).

Yapılan araştırmalarla VEGFA geninin nörogenez, nöral göç, sağ kalım ve akson guidance gibi birçok nöronal fonksiyonda yer aldığı gösterilmiştir (120, 121). Ayrıca bu genin kan beyin bariyerinde nörogliovasküler üniteye ana birim olarak yer aldığı, nöral ve vasküler süreçleri etkilediği bildirilmiştir. Beyinde VEGFA nöron ve astrositlerden birçok basamakta ve durumda salgılanır (122, 123). İskemik beyinde VEGFA'nın nörovasküler yeniden modellenmede yer aldığı, anjiyogenezi indüklediği, iskemik nöronları hasardan koruduğu anti inflamatuvar etkilerinin bulunduğu ve nöral öncü hücrelerin proliferasyonu arttırdığı belirlenmiştir (123-128). Nöron progenitör hücreleri ve fare beyin endotel hücreleri ile kökültürü çalışmasında Nöral progenitör hücrelere EPO uygulaması ile VEGF ekspresyonu ve salınımında artış ile PI3K/Akt ve ERK1/2 sinyal yollarında aktivasyon gözlemlenmiştir (129).

Çalışmamızda EPO 48 saat uygulaması ile % olarak değişiminin görüldüğü yollardan bir diğeri hipoksiye hücresel yanıttır. Endojen EPO üretiminin hipoksi ile indüklenebilir faktör-1 (HIF-1) ile arttığı gösterilmiştir (130, 131). İskemik beyin hasarında hipoksi ön uygulamasına bağlı olarak artan HIF-1'in EPO üretimine neden olduğu ve artan EPO'nun rodent beyinde iskemik hasarda koruyucu etkiler gösterdiği bildirilmiştir (130-

132). Sıçan iskemik atak modelinde hipoksi ile ekspresyonu artan EPO'nun koruyucu etkisini PI-3K yolağı aracılığıyla gerçekleştirdiği öne sürülmüştür. Bu modelde PI-3K inhibitörü uygulaması ile EPO'nun hipoksideki koruyucu etkileri azalmıştır (133). Yapılan diğer çalışmalarda hipoksi koşullarında HIF-1 ekspresyon artışının EPO ekspresyon artışına neden olduğu ve EPO'nun koruyucu etkisini AKT fosforilasyonunu arttırarak gerçekleştirdiği bildirilmiştir (134), diğer bir çalışmada hipoksi ile indüklenen EPO'nun etkilerini kaspaz-8, kaspaz-1 ve kaspaz-3 aktivitelerini inhibe ederek gerçekleştirdiği bildirilmiştir (135).

Yenidoğan fokal serebral iskemi modelinde EPO uygulanan grupta hasarlı alanda azalma ile birlikte fosforile JAK2 ve STAT5 ekspresyonunda artma gözlenmiştir (136). Sıçan serebral iskemi modelinde EPO uygulaması ile hipokampal CA1 bölgesinde STAT5 aktivasyonunun daha erken zamanda başladığı bildirilmiştir (137), aynı modelde EPO'nun nöroprotektif etkisini PIK-3 VE AKT fosforilasyonunu arttırarak gösterdiği ve inhibitör uygulaması ile bu etkinin ortadan kalktığı bildirilmiştir (138). Serebral iskemi modelinde EPO'nun hipokampal nöronları hipoksi ile indüklenen nöron ölümünden protein kinaz Akt-1/ protein kinaz B aktivasyonu üzerinden koruduğu bildirilmiştir (139). Ayrıca yapılan çalışmalarla EPO'nun hipoksik yanıtında ERK yolağının rol oynadığı bildirilmiştir (140-143). Tüm bu sonuçlar EPO'nun nöronal hücrelerde hipoksiye yanıtı düzenleyen ana moleküllerdenbiri olduğunu desteklemektedir.

Çalışmamızda EPO 48 saat uygulaması ile % olarak protein değişiminin görüldüğü yollardan birisi Aquaporin aracılı sinyal yolağıdır. Aquaporin ailesi, birçok hücre plazma membranında bulunan su seçici kanal proteini kodlar. Sıçan iskemik inme modelinde EPO uygulamasının beyin hasarlı alan hacminde azalma, nörolojik fonksiyonlarda iyileşme ve aquaporin 4 pozitif hücrelerde azalmaya neden olduğu bildirilmiştir (144). Diğer bir sıçan hipoksik iskemi modelinde EPO uygulamasında azalmış hasarlı doku hacmi ve lezyon bölgesine difüzyon ile aquaporin-4 ekspresyonunda artış gözlemlemiştir (145). Yapılan diğer çalışmalarda EPO'nun aquaporin-1 ekspresyonunu arttırdığı bildirilmiştir. İskemik hasarda astrosit su geçirgenliği artmaktadır. EPO'nun nöroprotektif etkilerinde astrosit su geçirgenliğini aquaporin genlerinin ekspresyonunu etkileyerek gösterdiği bildirilmiştir (146-148).

Myeloid differentiation primary response 88 (MyD88) ve Toll like receptor (TLR) aracılı yollar çalışmamızda değişim belirlediğimiz diğer yollardır. MyD88 geni doğal ve adaptif immun sistemde ana rol oynayan sitozolik adaptör protein kodlar. Bu protein

interlökin-1 ve TLR sinyal yollarında sinyal dönüştürücü olarak görev alır (149). TLR ailesi, doğal immün sistemin aktivasyonunda rol oynar (150). İnflamatuar yanıtlar beyin hasarında önemli bir rol oynar. Travmatik beyin hasarlı hastalarda MyD88 ekspresyonu diğer pro-inflamatuar belirteçlerle birlikte artmış bulunmuştur (151). Yapılan diğer çalışmalarla nöroinflammatuar süreçde MyD88 geninin rol oynadığı bildirilmiştir (152, 153). TLR aracılı sinyal yolları beyin hasarlarından sonra nöroinflammatuar süreçlerde rol oynamaktadır. Siyatik sinir hasarı ile ilgili yapılan çalışmada TLR yolağı ve MyD88 geni hasarlı farelerde aksonal yenilenmede, lokomotor fonksiyon iyileşmesinde azalma gözlemlenmiştir (154). Travmatik beyin hasarı ile ilgili yapılan çalışmalarda TLR sinyal yolak aktivasyonunun, MyD88 adaptör protein ekspresyonunun diğer inflammatuar belirteçlerle arttığı bildirilmiştir (155-158).

Mitogen-activated protein kinazlar (MAPK) yolağı, çalışmamızda değişim belirlediğimiz bir diğer yolaktır. MAPK, birçok uyarana karşı proliferasyon, gen ekspresyonu, diferansiasyon, apoptoz gibi hücresel cevaplar oluştururlar (159). Oksijen glukoz deprivasyonu sonrasında yeniden oksijenlenme modelinde EPO'nun MAPK aktivasyonu ve aquaporin-4 gen ekspresyonunda artış ile etkilerini gösterdiği bildirilmiştir (160). Travmatik ve iskemik beyin hasarları ile ilgili yapılan çalışmada EPO ekspresyonunda ve MAPK aktivitesinde hipoksiye bağlı HIF-1 artışı ile orantılı şekilde artış belirlenmiştir (161). Tavşanlarda yapılan iskemik hasar modelinde EPO'nun koruyucu etkilerini MAPK aktivasyonu aracılığı ile gerçekleştirdiğini göstermişlerdir (162).

SHSY-5Y hücrelerinde EPO uygulamasının etkilediği sinyal alt yolları incelediğimizde öne çıkanlar immün sistem, sinyal dönüştürülmesi, protein metabolizması olduğunu görüyoruz.

EPO'nun sinyal yollarından biri olan MAP kinaz yolağında yer alan nükleer hedef genlerinden biri olan FOS ve EGR1 genlerinin ekspresyonlarının bizim çalışmamızda da anlamlı şekilde değişmesi EPO'nun nöroprotektif etkilerinde bu genlerin aracılık edebileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızın Sınırlılıkları

Çalışmamızda insan kökenli nöronal hücre hattı olan SHSY-5Y kullanılmıştır. Bu hücre hattı diferansiye olmayan nöron öncüsü bir hücre hattıdır. İleri çalışmalarda diferansiye nöron hücrelerinin ve primer nöron kültürünün kullanılması yararlı olacaktır.

Çalışmamızdaki diğer bir sınırlılık EPO dozundan kaynaklanmaktadır. Bizim çalışmamızda SHSY-5Y hücrelerinde toksik olmayan 1U/ml EPO dozu kullanılmıştır. Çalışmamızda 24 saat ve 48 saatlik EPO uygulaması yapılmıştır ve 24 saatlik EPO uygulaması ile anlamlı gen ekspresyonu değişikliği belirlenememiştir. Bu örnek kaynaklı soruna bağlı olabilir. Bizim verilerimiz EPO'ya yanıtta geç dönem değişikliklerini temsil ediyor olabilir. Literatüre baktığımızda EPO'nun gen ekspresyon değişimlerine etkisini inceleyen çalışmalarda daha erken saatlerin de seçildiğini görülmektedir (113). Daha kapsamlı araştırmalar için EPO'ya yanıt değişik zamanlarda da incelenmelidir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Çalışmamızda, SHSY-5Y hücre hattında 24 ve 48 saatlik Eritropoetin uygulaması ile transkripsiyonel düzeyde oluşan değişiklikler mikroarray ve qPCR yöntemleri ile incelenmiş anlamlı değişen genlerin hangi yolaklarda rol aldıkları belirlenmiştir. Ekspresyonu anlamlı değişen genler ekstrasellüler matriks organizasyon, gelişimsel biyoloji, immün sistem, sinyal dönüştürülmesi, protein metabolizması, hemostaz, küçük moleküllerin transmembran transportu ile ilgili ana yolaklarda yer almaktadır.

Çalışmamızda nöron benzeri hücre hattı olan SHSY-5Y kullanılmıştır. Sonraki çalışmalarda primer nöron kültürü kullanılabilir.

Çalışmamızda EPO'nun mRNA ekspresyonu üzerinde zamana bağlı etkisi incelenmiştir, bunun yanı sıra ileri çalışmalarda değişik doz ve sürelerde EPO uygulaması ile EPO'nun mRNA ekspresyonu üzerindeki doz ve zamana bağlı etkileri birlikte değerlendirilebilir.

7. KAYNAKLAR

1. Jelkmann W. Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiol Rev.* 1992;72(2):449-89.
2. Storry PL, Tiplady RJ, Gaines Das RE, Rafferty B ve ark. Lectin-binding assays for the isoforms of human erythropoietin: Comparison of urinary and four recombinant erythropoietins. *J Endocrinol* 1996;150:401–412.
3. Miyake T, Kung CK, Goldwasser E. Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem.* 1977;252(15):5558-64.
4. Fisher JW. Erythropoietin: physiology and pharmacology update. *Exp Biol Med*(Maywood). 2003;228(1):1-14.
5. Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol*, 2004;83:673-86.
6. Tan CC, Eckardt KU, Firth JD, Ratcliffe PJ. Feedback modulation of renal and hepatic erythropoietin mRNA in response to graded anemia and hypoxia. *Am J Physiol.* 1992;263(3 Pt 2):F474-81.
7. Semenza GL. HIF-1 and mechanisms of hypoxia sensing. *Curr Opin Cell Biol.* 2001;13(2):167-71.
8. Moritz KM, Lim GB, Wintour EM. Developmental regulation of erythropoietin and erythropoiesis. *Am J Physiol* 1997;273:R1829–R1844.
9. Lacombe C, Mateux P. Biology of erythropoietin. *Haematologica* 1998;83:724–732.
10. Youssoufian H, Longmore G, Neumann D, Yoshimura A ve ark. Structure, function, and activation of the erythropoietin receptor. *Blood* 1993;81:2223–2236.
11. D’Andrea AD, Zon LI. Erythropoietin receptor. Subunit structure and activation. *J Clin Invest* 1990;86:681–687.
12. Yoshimura A, Misawa H. Physiology and function of the erythropoietin receptor. *Curr Opin Hematol* 1998;5:171–176.
13. Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2008;67(1):39-61.
14. Ebie AZ, Fleming KG. Dimerization of the erythropoietin receptor transmembrane domain in micelles. *J Mol Biol.* 2007;366(2):517-24.
15. Wojchowski DM, Gregory RC, Miller CP, Pandit AK, Pircher TJ. Signal transduction

in the erythropoietin receptor system. *Exp Cell Res*. 1999;253:143–156.

16. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y ve ark. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience*. 1997;76(1):105-16.

17. Nagai A, Nakagawa E, Choi HB, Hatori K ve ark. Erythropoietin and erythropoietin receptors in human CNS neurons, astrocytes, mikroglia, and oligodendrocytes grown in culture. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2001;60(4):386–92.

18. Yamaji R, Okada T, Moriya M ve ark. Brain capillary endothelial cells express two forms of erythropoietin receptor mRNA. *Eur J Biochem*. 1996;239(2):494–500.

19. Masuda S, Chikuma M, Sasaki R. Insulin-like growth factors and insulin stimulate erythropoietin production in primary cultured astrocytes. *Brain Res*. 1997;746(1-2):63-70.

20. Wu H, Lee SH, Gao J, Liu X, Iruela-Arispe ML. Inactivation of erythropoietin leads to defects in cardiac morphogenesis. *Development*. 1999;126(16):3597-605.

21. Schuster JM, Nelson PS. Toll receptors: an expanding role in our understanding of human disease. *J Leukoc Biol*. 2000;67(6):767-73.

22. Kertesz N, Wu J, Chen TH, Sucov HM ve ark. The role of erythropoietin in regulating angiogenesis. *Dev Biol*. 2004 1;276(1):101-10.

23. Shingo T, Sorokan ST, Shimazaki T, Weiss S. Erythropoietin regulates the in vitro and in vivo production of neuronal progenitors by mammalian forebrain neural stem cells. *J Neurosci*. 2001;21(24):9733-43.

24. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F, Sfacteria A ve ark. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(41):14907-12.

25. Murphy JM, Young IG. IL-3, IL-5, and GM-CSF signaling: crystal structure of the human beta-common receptor. *Vitam Horm*. 2006;74:1-30.

26. Mirza S, Chen J, Murphy JM, Young IG. The role of interchain heterodisulfide formation in activation of the human common beta and mouse betaIL-3 receptors. *J Biol Chem*. 2010;285(32):24759-68.

27. Stomski FC, Woodcock JM, Zacharakis B, Bagley Cj ve ark. Identification of a Cys motif in the common beta chain of the interleukin 3,granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interleukin 5 receptors essential for disulfide-linked receptor heterodimerization and activation of all three receptors. *J Biol Chem*. 1998;273(2):1192-9.

28. Hanazono Y, Sasaki K, Nitta H, Yazaki Y, Hirai H. Erythropoietin induces tyrosine phosphorylation of the beta chain of the GM-CSF receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 1995;208(3):1060-6.
29. Jubinsky PT, Krijanovski OI, Nathan DG, Tavernier J, Sieff CA. The beta chain of the interleukin-3 receptor functionally associates with the erythropoietin receptor. *Blood.* 1997;90(5):1867-73.
30. Blake TJ, Jenkins BJ, D'Andrea RJ, Gonda TJ. Functional cross-talk between cytokine receptors revealed by activating mutations in the extracellular domain of the beta-subunit of the GM-CSF receptor. *J Leukoc Biol.* 2002;72(6):1246-55.
31. Scott CL, Robb L, Papaevangeliou B, Mansfield R ve ark. Reassessment of interactions between hematopoietic receptors using common beta-chain and interleukin-3-specific receptor beta-chain-null cells: no evidence of functional interactions with receptors for erythropoietin, granulocyte colony-stimulating factor, or stem cell factor. *Blood.* 2000;96(4):1588-90.
32. Swartjes M, Morariu A, Niesters M, Brines M ve ark. ARA290, a peptide derived from the tertiary structure of erythropoietin, produces long-term relief of neuropathic pain: an experimental study in rats and β -common receptor knockout mice. *Anesthesiology.* 2011;115(5):1084-92
33. Su KH, Shyue SK, Kou YR, Ching Lcve ark. β Common receptor integrates the erythropoietin signaling in activation of endothelial nitric oxide synthase. *J Cell Physiol.* 2011;226(12):3330-9.
34. Masuda S, Okano M, Yamagishi K, Nagao M ve ark. A novel site of erythropoietin production. Oxygen-dependent production in cultured rat astrocytes. *J Biol Chem.* 1994 29;269(30):19488-93.
35. Masuda S, Nagao M, Takahata K, Konishi Y ve ark. Functional erythropoietin receptor of the cells with neural characteristics. Comparison with receptor properties of erythroid cells. *J Biol Chem.* 1993;268(15):11208-16.
36. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D ve ark. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1999;19(6):643-51.
37. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K ve ark. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle

- cerebral artery. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;253(1):26-32.
38. Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C ve ark. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):4044-9.
39. Koshimura K, Murakami Y, Sohmiya M, Tanaka J ve ark. Effects of erythropoietin on neuronal activity. *J Neurochem.* 1999;72(6):2565-72.
40. Wu Y, Shang Y, Sun SG, Liu RG ve ark. Protective effect of erythropoietin against 1-methyl-4-phenylpyridinium-induced neurodegeneration in PC12 cells. *Neurosci Bull.* 2007;23(3):156-64.
41. Sinor AD, Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett.* 2000;290(3):213-5.
42. Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A ve ark. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *Neuroreport.* 2000;11(16):3485-8.
43. Ruscher K, Freyer D, Karsch M, Isaev N ve ark. Erythropoietin is a paracrine mediator of ischemic tolerance in the brain: evidence from an in vitro model. *J Neurosci.* 2002;22(23):10291-301.
44. Digicaylioglu M, Lipton SA. Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature.* 2001;412(6847):641-7.
45. Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu PX ve ark. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res.* 2002;67(6):795-803.
46. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin fosters both intrinsic and extrinsic neuronal protection through modulation of microglia, Akt1, Bad, and caspase-mediated pathways. *Br J Pharmacol.* 2003;138(6):1107-18.
47. Li F, Chong ZZ, Maiese K. Microglial integrity is maintained by erythropoietin through integration of Akt and its substrates of glycogen synthase kinase-3beta, beta-catenin, and nuclear factor-kappaB. *Curr Neurovasc Res.* 2006;3(3):187-201.
48. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S ve ark. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(8):4635-40.
49. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D ve ark. Erythropoietin crosses the blood-

- brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000;97(19):10526-31.
50. Grasso G. Neuroprotective effect of recombinant human erythropoietin in experimental subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg Sci*. 2001;45(1):7-14.
51. Genc S, Kuralay F, Genc K, Akhisaroglu M ve ark. Erythropoietin exerts neuroprotection in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine-treated C57/BL mice via increasing nitric oxide production. *Neurosci Lett*. 2001;298(2):139-41.
52. Romsı P, Rönkä E, Kiviluoma K, Vainionpää V ve ark. Potential neuroprotective benefits of erythropoietin during experimental hypothermic circulatory arrest. *J Thorac Cardiovasc Surg*. 2002;124(4):714-23.
53. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M ve ark. Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(16):10659-64.
54. Celik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M ve ark. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(4):2258-63.
55. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O ve ark. Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(14):9450-5.
56. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T ve ark. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res*. 2002;952(1):128-34.
57. Erbayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW ve ark. Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(11):6741-6.
58. Sekiguchi Y, Kikuchi S, Myers RR, Campana WM. ISSLS prize winner: Erythropoietin inhibits spinal neuronal apoptosis and pain following nerve root crush. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2003;28(23):2577-84.
59. Kumral A, Ozer E, Yilmaz O, Akhisaroglu M ve ark. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*. 2003;83(3):224-8.
60. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D ve ark. Erythropoietin selectively attenuates

cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med*. 2003;198(6):971-5.

61. Matsushita H, Johnston MV, Lange MS, Wilson MA. Protective effect of erythropoietin in neonatal hypoxic ischemia in mice. *Neuroreport*. 2003;14(13):1757-61.

62. Dzietko M, Felderhoff-Mueser U, Siffringer M, Krutz B ve ark. Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2004;15(2):177-87.

63. Savino C, Pedotti R, Baggi F, Ubiali F ve ark. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2006;172(1-2):27-37.

64. Campana WM, Li X, Shubayev VI, Angert M ve ark. Erythropoietin reduces Schwann cell TNF-alpha, Wallerian degeneration and pain-related behaviors after peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci*. 2006;23(3):617-26.

65. Chen G, Shi JX, Hang CH, Xie W ve ark. Inhibitory effect on cerebral inflammatory agents that accompany traumatic brain injury in a rat model: a potential neuroprotective mechanism of recombinant human erythropoietin (rhEPO). *Neurosci Lett*. 2007;425(3):177-82

66. Lee ST, Chu K, Sinn DI, Jung KH ve ark. Erythropoietin reduces perihematoma inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurochem*. 2006;96(6):1728-39.

67. Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, Surucu HS ve ark. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev*. 2004;27(2):113-20.

68. Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, Carelli S ve ark. Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102(45):16379-84.

69. Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Stahel PF ve ark. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J*. 2005;19(12):1701-3.

70. Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke*. 2005;36:1672-8.
71. Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A ve ark. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic-ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate*. 2005;87(1):15-8.
72. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R ve ark. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke*. 2004;35:1732-7.
73. Liu W, Shen Y, Plane JM, Pleasure DE ve ark. Neuroprotective potential of erythropoietin and its derivative carbamylated erythropoietin in periventricular leukomalacia. *Exp Neurol*. 2011;230(2):227-39. *ain Res Mol Brain Res*. 2002;104(1):86-95.
74. Zhu C, Kang W, Xu F ve ark. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. *Pediatrics*. 2009;124: 218–226.
75. Fauchere JC, Dame C, Vonthein R ve ark. An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. *Pediatrics*. 2008; 122: 375–382.
76. Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, Ledbetter KJ ve ark. A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. *Pediatrics*. 2008;122(2):383-91.
77. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C ve ark. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry*. 2007;12(2):206-20.
78. Bartels C, Späte K, Krampe H, Ehrenreich H. Recombinant Human Erythropoietin: Novel Strategies for Neuroprotective/Neuro-regenerative Treatment of Multiple Sclerosis. *Ther Adv Neurol Disord*. 2008;1(3):193-206.
79. Tseng MY, Hutchinson PJ, Kirkpatrick PJ. Interaction of neurovascular protection of erythropoietin with age, sepsis, and statin therapy following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. *J Neurosurg*. 2010;112(6):1235-9.

80. Springborg JB, Møller C, Gideon P, Jørgensen OS ve ark. Erythropoietin in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a double blind randomised clinical trial. *Acta Neurochir (Wien)*. 2007;149(11):1089-101; discussion 1101.
81. Boesch S, Sturm B, Hering S, Scheiber-Mojdehkar B ve ark. Neurological effects of recombinant human erythropoietin in Friedreich's ataxia: a clinical pilot trial. *Mov Disord*. 2008;23(13):1940-4.
82. Boesch S, Sturm B, Hering S, Goldenberg H ve ark. Friedreich's ataxia: clinical pilot trial with recombinant human erythropoietin. *Ann Neurol*. 2007;62(5):521-4.
83. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res*. 2004;1000:19-31.
84. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A ve ark. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2003;62:228-36.
85. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:503-14.
86. Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H ve ark. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* 2004;19:195-206.
87. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 2005;293:90-95.
88. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:577-83.
95. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 2004;11 Suppl 1:S37-44.
90. Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR ve ark. Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab*. 2001;21(7):857-64.
91. Wang X, Zhu C, Wang X, Gerwien JG ve ark. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem*. 2004;91(4):900-10.
92. Garcia-Rodriguez JC, Sosa-Teste I. The nasal route as a potential pathway for delivery of erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke in humans. *ScientificWorldJournal*. 2009;9:970-81.

93. Leist M, Ghezzi P, Grasso G ve ark. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 2004; 305: 239–242.
94. Mennini T, De Paola M, Bigini P, Mastrotto C ve ark. Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. *Mol Med*. 2006;12(7-8):153-60.
95. Grasso G, Sfacteria A, Erbayraktar S, Passalacqua M ve ark. Amelioration of spinal cord compressive injury by pharmacological preconditioning with erythropoietin and a nonerythropoietic erythropoietin derivative. *J Neurosurg Spine*. 2006;4(4):310-8.
96. Subirós N, Del Barco DG, Coro-Antich RM. Erythropoietin: still on the neuroprotection road. *Ther Adv Neurol Disord*. 2012;5(3):161-73.
97. Maurer MH, Frietsch T, Waschke KF, Kuschinsky W ve ark. Cerebral transcriptome analysis of transgenic mice overexpressing erythropoietin. *Neurosci Lett*. 2002;327(3):181-4.
98. Juul SE, McPherson RJ, Bammler TK, Wilkerson J ve ark. Recombinant erythropoietin is neuroprotective in a novel mouse oxidative injury model. *Dev Neurosci*. 2008;30(4):231-42.
99. Meloni BP, Tilbrook PA, Boulos S, Arthur PG ve ark. Erythropoietin preconditioning in neuronal cultures: signaling, protection from in vitro ischemia, and proteomic analysis. *J Neurosci Res*. 2006;83(4):584-93.
100. Renzi MJ, Farrell FX, Bittner A, Galindo JE ve ark. Erythropoietin induces changes in gene expression in PC-12 cells. *Brain Res Mol Brain Res*. 2002;104(1):86-95.
101. Mechenthaler I. Galanin and the neuroendocrine axes. *Cell Mol Life Sci*. 2008;65(12):1826-35
102. Shen M, Kawamoto T, Yan W, Nakamasu K ve ark. Molecular characterization of the novel basic helix-loop-helix protein DEC1 expressed in differentiated human embryo chondrocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1997;236(2):294-8.
103. Stevens JD, Roalson EH, Skinner MK. Phylogenetic and expression analysis of the basic helix-loop-helix transcription factor gene family: genomic approach to cellular differentiation. *Differentiation*. 2008;76(9):1006-22.

104. Watanabe TK, Katagiri T, Suzuki M, Shimizu F ve ark. Cloning and characterization of two novel human cDNAs (NELL1 and NELL2) encoding proteins with six EGF-like repeats. *Genomics*. 1996;38(3):273-6.
105. Luce MJ, Burrows PD. The neuronal EGF-related genes NELL1 and NELL2 are expressed in hemopoietic cells and developmentally regulated in the B lineage. *Gene*. 1999;231(1-2):121-6.
106. Monje P, Hernández-Losa J, Lyons RJ, Castellone MD ve ark. Regulation of the transcriptional activity of c-Fos by ERK. A novel role for the prolyl isomerase PIN1. *J Biol Chem*. 2005;280(42):35081-4.
107. Rui T, Feng Q, Lei M, Peng T ve ark. Erythropoietin prevents the acute myocardial inflammatory response induced by ischemia/reperfusion via induction of AP-1. *Cardiovasc Res*. 2005;65(3):719-27.
108. Kobayashi R, Kubota T, Hidaka H. Purification, characterization, and partial sequence analysis of a new 25-kDa actin-binding protein from bovine aorta: a SM22 homolog. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994;198(3):1275-80.
109. Thweatt R, Lumpkin CK Jr, Goldstein S. A novel gene encoding a smooth muscle protein is overexpressed in senescent human fibroblasts. *Biochem Biophys Res Commun*. 1992;187(1):1-7.
110. Oefner C, Roques BP, Fournie-Zaluski MC, Dale GE. Structural analysis of neprilysin with various specific and potent inhibitors. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*. 2004;60(Pt 2):392-6.
111. Pardossi-Piquard R, Dunys J, Yu G, St George-Hyslop ve ark. Neprilysin activity and expression are controlled by nicastrin. *J Neurochem*. 2006;97(4):1052-6.
112. Ferguson J, Bird C, Wadhwa M, Burns C. Detection of neutralizing antibodies to erythropoietin by inhibition of rHuEPO-stimulated EGR1 gene expression in the UT-7/EPO cell line. *J Immunol Methods*. 2013;387(1-2):191-8.
113. Mengozzi M, Cervellini I, Villa P, Erbayraktar Z ve ark. Erythropoietin-induced changes in brain gene expression reveal induction of synaptic plasticity genes in experimental stroke. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(24):9617-22.
114. Yuen CM, Leu S, Lee FY, Yen CH ve ark. Erythropoietin markedly attenuates brain infarct size and improves neurological function in the rat. *J Investig Med*. 2010;58(7):893-

904.

115. Avasarala JR, Konduru SS. Recombinant erythropoietin down-regulates IL-6 and CXCR4 genes in TNF-alpha-treated primary cultures of human microvascular endothelial cells: implications for multiple sclerosis. *J Mol Neurosci*. 2005;25(2):183-9.
116. Sharlow ER, Pacifici R, Crouse J, Batac J ve ark. Hematopoietic cell phosphatase negatively regulates erythropoietin-induced hemoglobinization in erythroleukemic SKT6 cells. *Blood*. 1997;90(6):2175-87.
117. Lim JW, Han JR. Aqueous humour levels of vascular endothelial growth factor and erythropoietin in patients with diabetic macular oedema before and after intravitreal erythropoietin injection. *Clin Experiment Ophthalmol*. 2011;39(6):537-44.
118. Patton SM, Ponnuru P, Snyder AM, Podskalny GD ve ark. Hypoxia-inducible factor pathway activation in restless legs syndrome patients. *Eur J Neurol*. 2011;18(11):1329-35.
119. Watts KD, McColley SA. Elevated vascular endothelial growth factor is correlated with elevated erythropoietin in stable, young cystic fibrosis patients. *Pediatr Pulmonol*. 2011;46(7):683-7.
120. Krum JM, Mani N, Rosenstein JM. Angiogenic and astroglial responses to vascular endothelial growth factor administration in adult rat brain. *Neuroscience*. 2002;110(4):589-604.
121. Khaibullina AA, Rosenstein JM, Krum JM. Vascular endothelial growth factor promotes neurite maturation in primary CNS neuronal cultures. *Brain Res Dev Brain Res*. 2004;148(1):59-68.
123. Mani N, Khaibullina A, Krum JM, Rosenstein JM. Astrocyte growth effects of vascular endothelial growth factor (VEGF) application to perinatal neocortical explants: receptor mediation and signal transduction pathways. *Exp Neurol*. 2005;192(2):394-406.
124. Ruiz de Almodovar C, Lambrechts D, Mazzone M, Carmeliet P. Role and therapeutic potential of VEGF in the nervous system. *Physiol Rev*. 2009;89(2):607-48.
125. Argandoña EG, Bengoetxea H, Ortuzar N, Bulnes S ve ark. Vascular endothelial growth factor: adaptive changes in the neuroglialvascular unit. *Curr Neurovasc Res*. 2012 Feb;9(1):72-81.
126. Sondell M, Lundborg G, Kanje M. Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci*.

1999;19(14):5731-40.

127. Schwarz Q, Gu C, Fujisawa H, Sabelko K ve ark. Vascular endothelial growth factor controls neuronal migration and cooperates with Sema3A to pattern distinct compartments of the facial nerve. *Genes Dev.* 2004;18(22):2822-34.

128. Jin K, Zhu Y, Sun Y, Mao X ve ark. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99(18):11946-50.

129. Wang L, Chopp M, Gregg SR, Zhang Rl ve ark. Neural progenitor cells treated with EPO induce angiogenesis through the production of VEGF. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28(7):1361-8.

130. Jones NM, Bergeron M. Hypoxic preconditioning induces changes in HIF-1 target genes in neonatal rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2001;21(9):1105-14.

131. Sharp FR, Ran R, Lu A, Tang Y ve ark. Hypoxic preconditioning protects against ischemic brain injury. *NeuroRx.* 2004;1(1):26-35.

132. Bernaudin M, Nedelec AS, Divoux D, MacKenzie ET ve ark. Normobaric hypoxia induces tolerance to focal permanent cerebral ischemia in association with an increased expression of hypoxia-inducible factor-1 and its target genes, erythropoietin and VEGF, in the adult mouse brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2002;22(4):393-403.

133. Malhotra S, Savitz SI, Ocava L, Rosenbaum DM. Ischemic preconditioning is mediated by erythropoietin through PI-3 kinase signaling in an animal model of transient ischemic attack. *J Neurosci Res.* 2006;83(1):19-27.

134. Ryou MG, Liu R, Ren M, Sun J ve ark. Pyruvate protects the brain against ischemia-reperfusion injury by activating the erythropoietin signaling pathway. *Stroke.* 2012;43(4):1101-7.

135. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation.* 2002;106(23):2973-9.

136. Sola A, Rogido M, Lee BH, Genetta T ve ark. Erythropoietin after focal cerebral ischemia activates the Janus kinase-signal transducer and activator of transcription signaling pathway and improves brain injury in postnatal day 7 rats. *Pediatr Res.* 2005;57(4):481-7.

137. Zhang F, Wang S, Cao G, Gao Y ve ark. Signal transducers and activators of

- transcription 5 contributes to erythropoietin-mediated neuroprotection against hippocampal neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Neurobiol Dis.* 2007;25(1):45-53.
138. Zhang F, Signore AP, Zhou Z, Wang S ve ark. Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: potential signaling mechanisms. *J Neurosci Res.* 2006;83(7):1241-51
139. Sirén AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C ve ark. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(7):4044-9.
140. Wei L, Han BH, Li Y, Keogh CI ve ark. Cell death mechanism and protective effect of erythropoietin after focal ischemia in the whisker-barrel cortex of neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Apr;317(1):109-16.
141. Wen TC, Sadamoto Y, Tanaka J, Zhu PX ve ark. Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *J Neurosci Res.* 2002;67(6):795-803.
142. Wang X, Zhu C, Qiu L, Hagberg H ve ark. Activation of ERK1/2 after neonatal rat cerebral hypoxia-ischaemia. *J Neurochem.* 2003;86(2):351-62.
143. Kilic E, Kilic U, Soliz J, Bassetti CI ve ark. Brain-derived erythropoietin protects from focal cerebral ischemia by dual activation of ERK-1/-2 and Akt pathways. *FASEB J.* 2005;19(14):2026-8.
144. Yuen CM, Sun CK, Lin YC, Chang LT ve ark. Combination of cyclosporine and erythropoietin improves brain infarct size and neurological function in rats after ischemic stroke. *J Transl Med.* 2011 Aug 24;9:141.
145. Brissaud O, Villega F, Pieter Konsman J ve ark. Short-term effect of erythropoietin on brain lesions and aquaporin-4 expression in a hypoxic-ischemic neonatal rat model assessed by magnetic resonance diffusion weighted imaging and immunohistochemistry. *Pediatr Res.* 2010;68(2):123-7.
146. De Beuf A, Hou XH, D'Haese PC, Verhulst A. Epoetin delta reduces oxidative stress in primary human renal tubular cells. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:395785.
147. Gunnarson E, Song Y, Kowalewski JM, Brismar H ve ark. Erythropoietin modulation of astrocyte water permeability as a component of neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(5):1602-7.

148. Vitellaro-Zuccarello L, Mazzetti S, Madaschi L, Bosisio P ve ark. Chronic erythropoietin-mediated effects on the expression of astrocyte markers in a rat model of contusive spinal cord injury. *Neuroscience*. 2008;151(2):452-66.
149. Bonnert TP, Garka KE, Parnet P, Sonoda G ve ark. The cloning and characterization of human MyD88: a member of an IL-1 receptor related family. *FEBS Lett*. 1997;402(1):81-4.
150. Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA Jr. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature*. 1999;388(6640):394-7.
151. Li W, Liu HD, You WC, Zhou ML ve ark. Enhanced cortical expression of myeloid differentiation primary response protein 88 (Myd88) in patients with traumatic brain injury. *J Surg Res*. 2012 Nov 22.
152. Drouin-Ouellet J, Gibrat C, Bousquet M, Calon F ve ark. The role of the MYD88-dependent pathway in MPTP-induced brain dopaminergic degeneration. *J Neuroinflammation*. 2011;8:137.
153. Dean JM, Wang X, Kaindl AM, Gressens P ve ark. Microglial MyD88 signaling regulates acute neuronal toxicity of LPS-stimulated microglia in vitro. *Brain Behav Immun*. 2010;24(5):776-83.
154. Boivin A, Pineau I, Barrette B, Filali M ve ark. Toll-like receptor signaling is critical for Wallerian degeneration and functional recovery after peripheral nerve injury. *J Neurosci*. 2007;27(46):12565-76.
155. Zeng KW, Zhang T, Fu H, Liu GX ve ark. Schisandrin B exerts anti-neuroinflammatory activity by inhibiting the Toll-like receptor 4-dependent MyD88/IKK/NF- κ B signaling pathway in lipopolysaccharide-induced microglia. *Eur J Pharmacol*. 2012;692(1-3):29-37.
156. Mao SS, Hua R, Zhao XP, Qin X ve ark. Exogenous administration of PACAP alleviates traumatic brain injury in rats through a mechanism involving the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway. *J Neurotrauma*. 2012;29(10):1941-59.
157. Gao Y, Fang X, Sun H, Wang Y ve ark. Toll-like receptor 4-mediated myeloid differentiation factor 88-dependent signaling pathway is activated by cerebral ischemia-reperfusion in hippocampal CA1 region in mice. *Biol Pharm Bull*. 2009;32(10):1665-71.
158. Kigerl KA, Lai W, Rivest S, Hart RP ve ark. Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4

regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J Neurochem.* 2007;102(1):37-50.

159. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE ve ark. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev.* 2001;22(2):153-83.

160. Tang Z, Sun X, Huo G, Xie Y ve ark. Protective effects of erythropoietin on astrocytic swelling after oxygen-glucose deprivation and reoxygenation: Mediation through AQP4 expression and MAPK pathway. *Neuropharmacology.* 2012;67C:8-15.

161. Marfia G, Madaschi L, Marra F, Menarini M ve ark. Adult neural precursors isolated from post mortem brain yield mostly neurons: an erythropoietin-dependent process. *Neurobiol Dis.* 2011;43(1):86-98.

162. Rafiee P, Shi Y, Su J, Pritchard KA Jr ve ark. Erythropoietin protects the infant heart against ischemia-reperfusion injury by triggering multiple signaling pathways. *Basic Res Cardiol.* 2005;100(3):187-97.

ÖZGEÇMİŞ
ZEYNEP
FİLİZ ZADEOĞLULARI

TC Kimlik No / Pasaport No:	11279560720
Doğum Yılı:	1983
Yazışma Adresi :	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Kampüsü Sağlık Bilimleri Enstitüsü 35340 İzmir/Türkiye
Telefon :	232-4125873
Faks :	232-2789495
e-posta :	zeynepzadeoglu@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi		ONKOLOJİ	Yüksek Lisans	2009
Türkiye	İstanbul Üniversitesi	CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ	TİBBİ BİYOLOJİK BİLİMLER	Lisans	2006

AKADEMİK/MESLEKTE DENEYİM

Kurum/Kuruluş	Ülke	Şehir	Bölüm/Birim	Görev Türü	Görev Dönemi
Dokuz Eylül Üniversitesi	Türkiye	İzmir	TIP BİLİMLERİ	Araştırma Görevlisi	2009-2013

UZMANLIK ALANLARI

Uzmanlık Alanları
Diğer , Yaşam Bilimleri
Onkoloji

DiĞER AKADEMİK FAALİYETLER

Son Bir Yılda Uluslararası İndekslere Kayıtlı Makale/Derleme İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Son Bir Yılda Projeler İçin Yapılan Danışmanlık Sayısı			
Yayınlara Alınan Toplam Atıf Sayısı			
Danışmanlık Yapılan Öğrenci Sayısı		Tamamlanan	Devam Eden
	Yüksek Lisans		
	Doktora		
	Uzmanlık		
Diğer Faaliyetler (Eser/görev/faaliyet/sorumluluk/olay/üyelik vb.)			

ÖDÜLLER

Ödülün Adı	Alındığı Kuruluş	Yılı
------------	------------------	------

YAYINLARI**SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayımlanan makaleler**

Expression and Methylation Pattern of p16 in Neuroblastoma Tumorigenesis. Aktas S, Celebiler AC, Zadeoğlulari Z, Diniz G, Kargı A, Olgun N. Pathol Oncol Res. 2009 May 23. [Epub ahead of print] PMID: 19466588

Diğer dergilerde yayımlanan makaleler**Hakemli konferans/sempozyumların bildiri kitaplarında yer alan yayınlar**

SIGNIFICANCE OF LONG PENTRAXIN 3 AS A ACTIVATION MARKER IN PSORIATIC PATIENTS. SERPİL TANRIVERDİ- AKHİSAROĞLU, ERGÜN KUŞKU, ZÜBEYDE ERBAYRAKTAR, HÜLYA ELLİDOKUZ, ŞEBNEM AKTAN. TURK J BIOCHEM. 200934(SPECIAL İSSUE),240.

CLINICAL SIGNIFICANCE OF MMP-2, MMP-9 AND INHIBITORS TIMP-1, TIMP-2 AND RECK GENE EKSPRESSION IN COLORECTAL CANCER. SERPİL TANRIVERDİ- AKHİSAROĞLU, ZEYNEP ZADEOĞLULARI, DİDEM KELEŞ, ZÜBEYDE ERBAYRAKTAR, ARAS EMRE CANDA, CEM TERZİ, HÜLYA ELLİDOKUZ, MEHMET FÜZÜN, GÜLGÜN OKTAY. TURK J BIOCHEM. 200934(SPECIAL İSSUE),137.

EFFECTS OF TEMOZOLOMIDE AND ERYTHROPOIETIN ON SURVIVIN EKSPRESSION IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME. ZÜBEYDE ERBAYRAKTAR, ZEYNEP ZADEOĞLULARI, SERPİL TANRIVERDİ- AKHİSAROĞLU, SERHAT ERBAYRAKTAR. TURK J BIOCHEM. 200934(SPECIAL İSSUE),127

Diğer yayınlar

Düzenleme Tarihi :19/02/2013

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN KLİNİK ARAŞTIRMALAR DEĞERLENDİRME KOMİSYONU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 1. Kat İnciraltı-İZMİR
TELEFON	0 232 412 22 54-0 232 412 22 58
FAKS	0 232 412 22 43
E-POSTA	etikkurul@deu.edu.tr

BAŞVURU BİLGİLERİ	DOSYA NO:	139-İOÇ
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Eritroprotein'in SHSY-5Y Hücrelerinde Sinyalleme Mekanizmasının Mikroaray Yöntemi ile İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Doç.Dr.Şermin GENÇ Arş.Gör.Zeynep Filiz ZADEOĞULLARI
	ARAŞTIRMA MERKEZİ ve AÇIK ADRESİ	Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler A.D İnciraltı-İZMİR 35340
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ ☐ ÇOK MERKEZLİ ☐

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe ☐ İngilizce ☒ Diğer ☐
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	-		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	-		Türkçe ☐ İngilizce ☐ Diğer ☐

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2010/10-14	Tarih:11.08.2010
	Doç.Dr.Şermin GENÇ'in proje yöneticisi olduğu Arş.Gör.Zeynep Filiz ZADEOĞULLARI sorumluluğunda yapılması tasarlanan "Eritroprotein'in SHSY-SY Hücrelerinde Sinyalleme Mekanizmasının Mikroarray Yöntemi ile İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, çalışmanın özellikli ve hassas kısmının dışarıdan hizmet alımı ile gerçekleştirileceği dikkat çekmiştir. Araştırmacı davet edilerek bu konuda kendisinden gerekçeli görüş alınmış, çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy çokluğu ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	DEU Girişimsel (İnvaziv) Olmayan Klinik Araştırmaları Değerlendirme Komisyonu Yönergesi , İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu
ETİK KURUL ÜYELERİ	

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsiyet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof. Dr. Ayşegül YILDIZ (Başkan)	Psikiyatri	DEU Tıp Fakültesi Psikiyatri Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Dr.Ecz.İskender İNCE (Başkan yardımcısı)	Eczacı	Ege Üniversitesi ARGEFAR	Erkek	E ☐	H ☒	rmli.
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D..Z.Candan ALGUN	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Ph.D.Zuhal BAHAR	Ph.D. Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Yüksekokulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nuray DUMAN	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Derya ERÇAL	Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Genetik Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	rmli.
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	rmli.
Prof.Dr.Ömer Selahattin TOPALAK	İç Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	katlanadı.
Doç.Dr.Hülya ELLİDOKUZ	Halk Sağlığı	DEU Onkoloji Enstitüsü Preventif Onkoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	rmli.
Doç.Dr.Yeşim ÖZTÜRK	Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Av. Tayfun OZANKAYA	Hukuk	Serbest	Erkek	E ☐	H ☒	katlanadı.
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	75. Yıl Özel İlköğretim Okulu Müdür Yrd.	Erkek	E ☐	H ☒	