

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**‘Glioblastoma Multiforme hücre hatlarında var olan
Eritropoetin reseptörlerinin tayini ve Eritropoetin’in
bu hücre hatlarında proliferasyona, migrasyona,
invazyona ve angiogeneze etkilerinin araştırılması’**

Zeynep Özge AYYILDIZ

Temel Sinirbilimler

Yüksek Lisans Tezi

İZMİR-2017

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc. /2014970137

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**‘Glioblastoma Multiforme hücre hatlarında var olan
Eritropoetin reseptörlerinin tayini ve Eritropoetin’in
bu hücre hatlarında proliferasyona, migrasyona,
invazyona ve angiogeneze etkilerinin araştırılması’**

Temel Sinirbilimler

Yüksek Lisans Tezi

Zeynep Özge AYYILDIZ

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin GENÇ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından
2016.KB.SAG.008 numarasıyla desteklenmiştir

TEZ KODU: DEU.HSI.MSc. /2014970137

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimleri Anabilim Dalı, Yüksek Lisans programı öğrencisi Zeynep Özge AYYILDIZ ‘Glioblastoma Multiforme hücre hatlarında var olan Eritropoetin reseptörlerinin tayini ve Eritropoetin bu hücre hatlarında proliferasyona, migrasyona, invazyona ve angiogeneze etkilerinin araştırılması’ konulu Yüksek Lisans tezini 07/07/2017 tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.



Prof. Dr. Şermin GENÇ
(D.E.Ü Sinirbilimler A.D.)
BAŞKAN



Yrd. Doç. Dr. Yavuz OKTAY
(D.E.Ü İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi)
ÜYE



Yrd. Doç. Dr. Özden YALÇIN ÖZUYSAL
(İ.Y.T.E. Moleküler Biyoloji ve Genetik)
ÜYE

Prof. Dr. Görsev YENER
(DEÜ Tıp Fak. Nöroloji AD)
YEDEK ÜYE

Doç. Dr. H. Çağlar KARAKAYA
(İ.Y.T.E. Moleküler Biyoloji ve Genetik)
YEDEK ÜYE

İÇİNDEKİLER

1	GİRİŞ VE AMAÇ	5
	ARAŞTIRMANIN HİPOTEZİ	5
2	GENEL BİLGİLER	6
2.1	EPO, RESEPTÖRLERİ VE SİNYAL YOLAKLARI	7
2.1.1	EPO Reseptörleri	8
2.1.1.1	Eritropoetin reseptörü (EPOR)	8
2.1.1.2	Beta ortak reseptörü (CSF2RB)	9
2.1.1.3	Efrin B tipi reseptör 4 (EPHB4)	10
2.1.2	EPO ile aktive olan sinyal yolları	12
2.2	ERİTROPOESİZ STİMÜLE EDİCİ AJANLAR (ESA) VE KANSER	14
2.3	EPO VE GLİOBLASTOMA	16
3	GEREÇ VE YÖNTEM	19
3.1	ARAŞTIRMANIN TİPİ	19
3.2	ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI	20
3.3	ARAŞTIRMANIN EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ	20
3.4	ÇALIŞMA MATERYALİ	20
3.5	ARAŞTIRMANIN DEĞİŞKENLERİ	20
3.6	VERİ TOPLAMA ARAÇLARI	20
3.6.1	Hücre Kültürü	20
3.6.2	Transient Gen İfadesi Susturulması	21
3.6.3	RNA İzolasyonu	22
3.6.4	Real Time PCR yöntemi ile gen ekspresyonu tayini	23
3.6.5	Immunoblot	26
3.6.6	Proliferasyon Deneyleri	26
3.6.7	Boşluk Kapama Migrasyon Deneyi	27
3.6.8	İnvazyon Deneyi	28
3.7	ARAŞTIRMA PLANI VE TAKVİMİ	28
3.8	VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ	29
3.9	ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI	29
3.10	ETİK KURUL ONAYI	29
4	BULGULAR	30
4.1	U-87 MG HÜCRE HATTINDA EPO RESEPTÖRLERİNİN VARLIĞININ MRNA VE PROTEİN SEVİYESİNDE GÖSTERİLMESİ	30
4.2	RHuEPO ‘NUN U-87 MG HÜCRELERİNDE PROLİFERASYONA ETKİSİNİN GÖSTERİLMESİ	31
4.3	RESEPTÖR GEN İFADELERİNİN SUSTURULMASI	32
4.4	RESEPTÖR SUSTURMALARININ PROLİFERASYONA ETKİSİ	34
4.5	RESEPTÖR SUSTURMALARININ MİGRASYONA ETKİSİ	35
4.6	RESEPTÖR SUSTURMALARININ İNVAZYONA ETKİSİ	36
5	TARTIŞMA	39
6	SONUÇLAR VE ÖNERİLER	42
7	KAYNAKLAR	43
8	EKLER	52
8.1	ETİK KURUL ONAYI	52
8.2	ARBİS FORMATINDA ÖZGEÇMİŞ	55

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. ESA kullanımının Glioblastoma Multiform üzerine etkisinin incelendiği in vitro ve in vivo çalışmalar.....	18
Tablo 2. Plak tipine göre tranfeksiyon deneyi optimizasyonu	21
Tablo 3. Plak tipine göre transfeksiyon reaksiyonu karışım içeriği	22
Tablo 4. cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri	23
Tablo 5. qPCR için gen primer dizini.....	24
Tablo 6. DreamTaq end point PCR reaksiyon bileşenleri	24
Tablo 7. qPCR reaksiyonu bileşenleri	25



ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1:Farklı mRNA Kesim Varyantları Tarafından Sentezlenen EPOR'leri.	8
Şekil 2: Doku Koruyucu Olarak Görev Yaptığı Önerilen EPOR-CSF2RB Heterodimeri ve Heterotrimeri	10
Şekil 3: NEPOR, EPO Bağımlı Doku Koruyucu Reseptörleri.....	11
Şekil 4: EPO Sentezinin Normal (%21 O ₂) ve Hipoksi (%1 O ₂) Koşulunda Regülasyonu	12
Şekil 5:Araştırma Planı Zaman Çizelgesi.....	28
Şekil 6: EPO Reseptörlerinin U-87 MG Hücre Hattında Varlıklarının mRNA Seviyesinde Gösterilmesi.....	30
Şekil 7: EPO reseptörlerinin U-87 MG Hücre Hattında Varlıklarının Protein Seviyesinde Gösterilmesi.....	30
Şekil 8: U-87 MG hücre hattında EPO'nun 72 saatte proliferasyona etkisinin gösterilmesi.	31
Şekil 9: 1 IU/ml EPO'nun 3 zaman noktasında proliferasyona etkisinin Presto Blue ile gösterilmesi.....	31
Şekil 10: 1 IU/ml EPO'nun 3 zaman noktasında proliferasyona etkisinin BrdU proliferasyon deneyi ile gösterilmesi.....	32
Şekil 11: EPO reseptörlerinin ifadelerinin siRNA ile susturulması.	33
Şekil 12: EPO reseptörlerinin ifadelerinin siRNA ile susturulması kantitatif olarak gösterilmesi.....	33
Şekil 13: EPO reseptörlerinin U-87 MG Hücrelerinde Proliferasyona Etkisinin Gösterilmesi	34
Şekil 14:1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde invazyona etkisi ve EPO reseptörlerinin migrasyona etkisinin gösterilmesi.	36
Şekil 15:1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde invazyona etkisi ve EPO reseptörlerinin invazyona etkisinin gösterilmesi	37
Şekil 16:1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde invazyona etkisi ve EPO reseptörlerinin invazyona etkisinin represantatif gösterilmesi	38

KISALTMALAR

- AKI: Akut böbrek yetmezliği (Acute kidney injury)
- BAD: Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü uyaran protein (BCL2 associated agonist of cell death)
- CBP: cAMP respons elementine bağlanan proteinine (CREB) bağlanan protein (CREB binding protein)
- CHF: Kronik kalp hastalarında (Chronic Heart Failure)
- CIA: Kemoterapi ile indüklenen anemi (Chemotherapy induced anemia)
- CRA: Kanserin kendisi yüzünden (Cancer related anemia)
- CSF2RB: Beta ortak reseptörü (Beta common receptor)
- EPHB4: Efrin B tipi reseptörü (Ephrin B type receptor)
- EPO: Eritropoetin (Erythropoietin)
- EPOR: Eritropoetin reseptörü (Erythropoietin receptor)
- EPOR-F: Fonksiyonel EPO reseptörü (Functional EPO receptor)
- EPOR-S: Çözünebilir EPO reseptörü (Soluble EPO receptor)
- EPOR-T: Trunkat EPO reseptörü (Truncated EPO receptor)
- ERK: Ekstraselüler sinyal regüle edene kinaz (extracellular signal-regulated kinase)
- ESA: Eritropesiz stimüle edici ajanlar (Erythropoiesis stimulating agents)
- FDA: Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (US Food and Drug Administration)
- GBM: Glioblastoma Multiforme
- GSC: Glioblastoma kanser kök hücresi (Glioblastoma stem cell)
- GM-CSF: Granülosit- makrofaj koloni sitümüle edici faktör (Granulocyte-macrophage colony stimulating agent)
- GPI: Glikozilfosfatidilinositol (Glycosylphosphatidylinositol)
- GSK3 b: Glikojen sentetaz kinaz 3 b (Glycogen synthase kinase 3 beta)
- HIF: Hipoksi ile indüklenen transkripsiyon faktörleri (Hypoxia induced transcription factor)
- HNF-4: Hepatosit nükleer faktör -4 (Hepatocyte nuclear factor-4)
- HRE: Hipoksi respons elementi (Hypoxia Response Element)
- MAPK: Mitojen aktive eden protein kinaz (Mitogen activated protein kinase)
- NF-κB: Nükleer Faktör Kappa-B
- O-DDD: O2 bağımlı degradasyon kısmı (O2 dependent degradation domain)
- PHD: Prolil-4 hidroksilaz (Prolyl hydroxylase)

PI3K: Fosfoinositid 3-kinaz (phosphoinositide 3-kinase)

PKC: Protein kinaz c (Protein kinase c)

PLC γ : Fosfolipaz C gama (Phospholipase c gamma)

RBC: Kırmızı kan hücresi (Red blood cell)

rHuEPO: Rekombinant insan eritropoeitini (Recombinant human erythropoietin)

RTK: Reseptör tirozin kinaz (Receptor tyrosine kinase)

SHP: Src-homology-tirozin fosfataz 1'in (Src- homology tyrosine phosphatase 1)

SRC: Steroid reseptör koaktivatörü (Steroid receptor coactivator)

STAT5: Sinyal transdüser ve transkripsiyon aktive edici 5 (Signal transducer and activator of transcription 5)

TMZ: Temozolamid

U-87 MG: U-87 malignant glioma (Uppsula- 87 malignant glioblastoma)

TEŞEKKÜR

İlk olarak Laboratuvarı'nda çalışmama izin verip, çalışmaya başladığım günden itibaren bana her anlamda destek olan sevgili hocalarım Prof. Dr. Şermin Genç'e ve Prof. Dr. Kemal Kürşad Genç'e teşekkür ederim. Kendileri ile çalıştığım süreç, bilimsel bakış açım ve gelişimim üzerinde etkili olduğu kadar, kişisel gelişim üzerinde de etkili olmuştur.

Lisans yıllarımdan bugünlere üzerimde emeği olan; bilimsel anlamda çıkmaza düştüğümde adresim olan, güler yüzlülüğü, pozitif enerjisiyle her anlamda destek aldığım sevgili- 'Çiğdem Abla'- Çiğdem Özen'e,

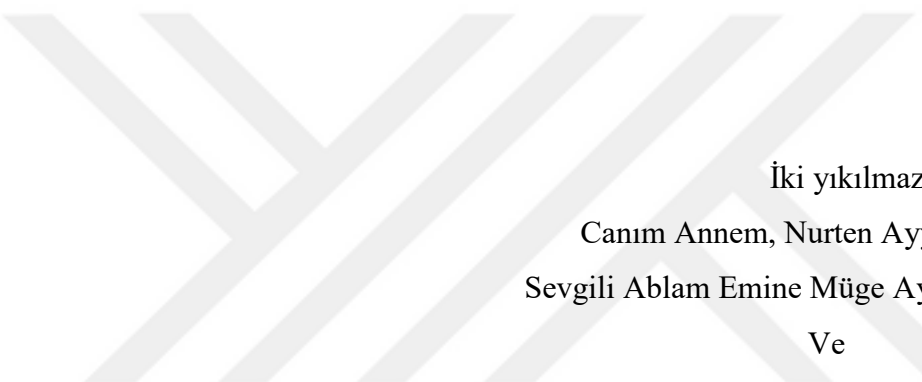
Ve yine Lisans yıllarımdan beri görünmez bir kahraman şeklinde; bana inanıp, beni destekleyen sevgili Hocam Prof. Dr. Nevin Eldem Keskin'e,

Bu süre zarfında kapılarını her çaldığımda vakit ayırıp, bilgilerini ve tecrübelerini benimle paylaşan sevgili Gülçin Çakan Akdoğan'a, Ayşim Güneş'e, Sanem Tercan Avcı'ya, Aslı Sade Memişoğlu'na,

Lisansüstü eğitimlerim sırasında bulunduğum yerlerde çalışma şansı bulduğum; çözüm odaklı, pozitif yaklaşımları ile çalışmalarımızın aksamasını engelleyen sevgili Bilge Kılıç'a hem özverili çalışmaları hem de dostluğu için,

Aynı zamanlarda çalışmalarımıza devam ettiğimiz; Aslı Kartal, Yağmur Azbazdar, Hande Topel, Süheyl Akbar ve Uğur Tüfekçi'ye ve tüm İzmir Biyotıp ve Genom Enstitüsü'ndeki arkadaşlara; varlıkları ve güzel enerjileri için teşekkürü bir borç bilirim.

Zeynep Özge AYYILDIZ



İki yıkılmaz Dağ' ıma;
Canım Annem, Nurten Ayyıldız'a,
Sevgili Ablam Emine Müge Ayyıldız'a
Ve
Babam, Turhan Ayyıldız' ın anısına ithafen

Temmuz'2017

**GLİOBLASTOMA MULTİFORME HÜCRE HATLARINDA VAR OLAN
ERİTROPOETİN RESEPTÖRLERİNİN TAYİNİ VE ERİTROPOETİN'İN BU
HÜCRE HATLARINDA PROLİFERASYONA, MİGRASYONA, İNVAZYONA VE
ANGİOGENESİZE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI**

Zeynep Özge AYYILDIZ, Dokuz Eylül Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinirbilimler
Anabilim Dalı, 35340, İnciraltı, İzmir

ÖZET

Glioblastoma multiform (GBM), yetişkinlerde görülen malignant beyin tümörleri arasında en yaygın olarak rastlanan beyin tümörü şeklidir. Günümüzde GBM hastalarına uygulanan cerrahi rezeksiyon, temozolamide aracılığı ile alkilleyici ajan bazlı kemoterapötik uygulanması ve iyonize edici radyasyon tedavisi gibi tedavi yöntemlerine karşı GBM hastalarının ortalama yaşam süreleri 15 ay olup, 5 yıllık sağ kalım oranları %10 dan azdır. Anemi hem hematolojik kökenli hem de solid tümöre sahip kanser hastalarında, hastalığın seyri boyunca herhangi bir evresinde görülen ve hastalığın seyrini etkileyen bağımsız bir prognostik faktördür. Kanser süresince görülen aneminin, kanser hastalarında radyoterapiye, kemoterapiye ve cerrahi müdahaleye yanıtı azalttığını, tedaviyi olumsuz etkilediğini gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Rekombinant insan eritropoeitini (rHuEPO) klinik olarak kronik böbrek hastalığı ile antiviral HIV terapisi ilişki anemide kullanıldığı gibi kemoterapinin tetiklediği aneminin (CIA) gözlendiği kanser hastalarında da kullanılmaktadır.

Bu çalışmamızda, U-87 malignant glioma (U-87 MG) hücre hattında öncelikle, hangi eritropoetin (EPO) reseptörlerinin bulunduğu belirlenmesi ve sonrasında bu EPO reseptörleri aracılığı ile proliferasyon, migrasyon, invazyon ve angiogenesiz gibi hangi biyolojik olayların düzenlendiğinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Bu doğrultuda önce bilinen EPO reseptörleri olan EPO reseptörü (EPOR), Efrin B4 reseptör tirozin kinaz (EPHB4) ve Beta ortak reseptörü (CSF2RB)'nün varlığı U-87 malignant glioma hücre hattında gösterilmiş, daha sonra reseptör spesifik siRNA'lar ile gen ifadeleri 24 saatte efektif olarak susturulmuştur. Reseptör gen ifadesi baskılanan hücreler 1

IU/ml Epo ile muamele edilmiş, hedef reseptörlerin rHuEPO'nun proliferasyona, migrasyona ve invazyona etkisi *scrambled* kontrolleri ile kıyaslanarak yorumlanmıştır.

rHuEpo'nun U-87 MG hücrelerinin proliferasyonunu ve invazyonunu anlamlı bir şekilde artırdığı bulunmuştur. EPO reseptörlerinin, EPOR, EPHB4 ve CSF2RB; bu hücrelerde proliferasyon ve invazyon metabolik yollarının aktive olmasına ayrı ayrı katkı sağladığı anlamlı olarak gösterilmiştir. Her bir reseptörün ayrı ayrı susturulduğu koşullarda, proliferasyon ve invazyon anlamlı olarak azalmıştır. Bununla beraber rHuEPO'nun U-87 MG hücrelerinin migrasyonunu anlamlı olarak artırmadığı gösterilmiştir.

ANAHTAR KELİMELEER: Malignant Glioma, Eritropoetin, EPOR, EPHB4, CSF2RB, Proliferasyon, Migrasyon, İnvazyon, Angiogeneez

**CONFIRMATION OF PRESENCE OF KNOWN ERYTHROPOIETIN RECEPTORS
IN GLIOBLASTOMA MULTIFORME CELL LINES AND FURTHER
INVESTIGATING EFFECT OF ERYTHROPOIETIN IN PROLIFERATION,
MIGRATION, INVASION AND ANGIOGENESIS**

Zeynep Özge AYYILDIZ, Dokuz Eylül University, Institute of Health Sciences, Department
of Neuroscience, 35340, İnciraltı, İzmir

ABSTRACT

Glioblastoma multiforme (GBM), are one of the most frequent primary malignant brain tumors seen in adults. In contrast to current treatment regimens applied to GBM patients (neurosurgery, alkylating agent based-chemotherapy with temozolomide (TMZ) and ionising radiation), median survival of GBM patients is about 15 months with a 5 year survival rate lesser than 10%. Anemia is an independent prognostic factor that plays role at some point in the course of the disease in cancer patients with both hematological and solid tumors. Studies demonstrate that anemia seen during cancer may decrease the response to radiotherapy, chemotherapy and surgery in cancer patients. Recombinant human erythropoietin (rHuEPO) has been used clinically for the treatment of anemia associated with chronic kidney disease, antiviral HIV therapy as well as for the chemotherapy induced anemia observed in cancer patients.

In this study, we aim to search first, which known erythropoietin receptors are present and further by which receptor erythropoietin contributes to proliferation, migration, invasion and angiogenesis in U-87 malignant glioma cell line.

Accordingly, first, presence of known erythropoietin receptors; EPO receptor (EPOR), EphrinB4 receptor tyrosine kinase (EPHB4) and Beta common receptor (CSF2RB) in U-87 malignant glioma cell line are confirmed. Subsequently, receptor expression knockdown with receptor specific siRNAs are efficiently performed in 24 hours. The cells with interest of specific receptor gene knockdown further treated with 1IU/ml erythropoietin and contribution

of target receptor to erythropoietin induced proliferation, migration, invasion and angiogenesis is evaluated compared to scrambled group.

The effect of rHuEPO in U-87-MG cells in terms of proliferation, and invasion is significantly demonstrated. The contribution of each EPO receptor; EPOR, EPHB4, and CSF2RB, to proliferation, and invasion in U-87 MG cells was shown significantly. Knock down of each receptor alone reduced proliferation, and invasion of U-87 MG cells in a significant manner. However, it has been demonstrated that 1 IU/ml rHuEPO has no significant effect on migration in U-87 MG cells.

KEY WORDS: Malignant Glioma, Erythropoietin, EPOR, EPHB4, CSF2RB, Proliferation, Migration, Invasion and Angiogenesis

1 GİRİŞ VE AMAÇ

Anemi, kanser süresince kemoterapi alan hastalarda görülen ve hastanın yaşam kalitesini düşüren bir etkidir. Anemi tedavisinde kullanılan kırmızı kan hücresi transfüzyonuna göre daha güvenilir bir yöntem olan eritropoesiz stimüle edici ajanların (ESA) kullanımının hastaya pozitif katkıda bulunması amaçlanmaktadır. Bu uygulamanın amacının aksine, hastalığın seyrini kötü etkileme olasılığı ile ilgili belirsizlik ESA kullanımını güçleştirmektedir. Bu belirsizliğe neden olan mekanizmanın aydınlatılması ile GBM ya da diğer kanser türlerinde alternatif uygulamaların ve/veya ilaçların özgün şekilde kullanılması tedavi sürecine pozitif etkiyecektir. Bu nedenle EPO'nun etkisinin klasik EPO/EPOR sinyal yolağı ve EPO ilişkilendirilmiş tüm reseptörleri de kapsayarak araştırılması kritik öneme sahiptir.

Bu projenin amacı ilk olarak literatürde EPO sinyal yolağı ile ilişkilendirilmiş reseptörlerin U-87 MG glioblastoma hücre hattında varlığının belirlenmesidir. Ardından rHuEPO'nun U-87 MG hücrelerinde (1) proliferasyon, (2) migrasyon, (3) invazyon ve (4) angiogenesize etkilerinin araştırılmasıdır. Son olarak da rHuEPO 'nun etki ettiği gösterilen kanserin kötü prognozunda rolü olduğu bilinen bu mekanizmaları hangi reseptörler aracılığı ile gerçekleştirdiğini GBM hücrelerinde ilk defa belirleyebilmektir.

Araştırmanın Hipotezi

U-87 MG glioblastoma hücrelerinde EPOR, EPHB4, β CR EPO reseptörleri ve bu reseptörlerin homodimer, heterodimer ve heterotrimer formları EPO bağımlı olarak proliferasyon, migrasyon ve invazyon gibi biyolojik prosesleri düzenlemektedir.

2 GENEL BİLGİLER

Carnot ve Deflandre 1906 yılında kanda dolaşan ve anemi durumunda kırmızı kan hücresi üretimini kontrol eden hemopoetik bir faktör olduğunu öne sürdü¹. Bu humoral faktörün bulunduğu deneysel olarak kanıtlandı ve faktöre eritropoeitin adı verildi². EPO 1977 yılında idrardan saflaştırıldı³ ve bu gelişme; EPO proteininin geninin klonlanmasına, karakterizasyonuna ve in vitro ekspresyonuna dair araştırmaların yapılmasına olanak sağladı⁴; 5. Amerikan Gıda ve İlaç Kurumu (US Food and Drug Administration, FDA) rHuEPO; epoetin alfa'yı öncelikle kronik böbrek yetmezliği sonucu ortaya çıkan anemi tedavisinde⁶, sonra da kanser hastalarında kemoterapi ile indüklenen anemi tedavisinde uygulanması için onayladı⁷. 1990 yılı itibari ile rHuEPO ve diğer eritropoesiz stimüle edici ajanlar, kırmızı kan hücresi transferi gerektiren anemi tiplerinde bu işlem yerine tercih edilen tedavi yöntemidir.

Birçok çalışmada EPO'nun klasik bir hematopoietik sitokin olmasının çok ötesinde rol oynadığı⁸⁻¹⁰; doğrudan ya da dolaylı olarak birden fazla hücre tipini etkilediği; antioksidan enzim üretimini artırdığını, serbest radikalleri metabolize ettiği, neoangiogenesizi stimule ettiği, inflamasyonu modifiye edip, endotelial öncü hücrelerinin çoğalmasını ve farklılaşmasını uyardığı şeklindeki geniş çaplı etkileri çalışmalarla gösterilmiştir^{11; 12}.

EPO'nun olası koruyucu etkisi kardiyovasküler, sinir ve renal hücrelerde gösterilmiştir¹³. Kronik kalp hastalarında (Chronic Heart Failure, CHF) anemi prevalansı %20 olarak tahmin edilmekle beraber^{14; 15}; anemi CHF hastalarının kötü prognozunu, ağırlaşan seyir ve artan ölüm oranını, gösteren bir faktördür¹⁶⁻¹⁸. Bununla beraber yapılan meta-analiz ve sistematik derlemeler, CHF hastalarına uygulanan ESA'ların, hastaların anemiye bağlı hastaneye yatırımlarında azalma sağladığı ve ESA tedavisinin hastanın hayat kalitesini ve egzersiz toleransını artırdığını göstermiştir. Öte yandan CHF hastalarında ölüm oranını düşürücü bir etkisi olduğu gösterilememiştir¹⁹.

Renal hücreler; mezanjial, distal ve proksimal tubüldeki epitelial hücreler, EPO-R mRNA'sı sentezlemektedirler²⁰. Ayrıca kültürü yapılan renal hücrelerde EPO sinyal yolağının aktif hale geldiği; DNA sentezinin ve proliferasyonun arttığı gösterilmiştir. EPO'nun renal hücrelerdeki koruyucu etkisinin otokrin –parakrin bir mekanizma ile sağlandığı öne sürülmüştür²¹. Akut böbrek yetmezliği (Acute kidney injury, AKI) üzerine EPO'nun etkisini araştıran çalışmalar her ne kadar hayvan modellerinde koruyuculuk göstermişse de²¹; insan

çalışmalarında²² koruyuculuk bulunamamıştır. Kronik böbrek yetmezliğinde EPO'nun etkisi sadece anemi ile ilişkili semptomları giderici olarak ele alındığından, genel olarak hastalığın seyri üzerine etkisi pek araştırılmamıştır. Bununla beraber yapılan bazı çalışmalar EPO'nun CKD prognozu üzerine pozitif yönde etkilediğini gösterse de²³, etkisi olmadığını da öne süren çalışma mevcuttur¹¹.

Yapılan çalışmalar EPO'nun ve EPO reseptörünün merkezi ve periferik sinir sisteminde olduğunu göstermiştir²⁰. EPO uygulamasından sonra omurilik seviyesinde artan EPO miktarı, EPO'nun kan beyin bariyerini geçtiğini de kanıtlamıştır²¹. EPO'nun multiple sklerozis hayvan modelinde immün baskılayıcı etkisi; yine hayvan ve insan modellerinde serebral iskemi sonrası oluşan hasarı azaltmaya yönelik etkisi²²; embriyonik nörogenesize etkisi²³; farklılaşmamış schwann hücrelerinin proliferasyonuna etkisi yapılan çalışmalarla gösterilmiştir²⁴. EPO antioksidan enzim ekspresyonunu artırmakta böylece serbest radikallerin üretim hızını düşürmektedir. EPO ile aktive olan Akt; glikojen sentetaz kinaz 3 b (GSK3 b), Bcl-2 ile ilişkili hücre ölümü uyaran protein (BAD) ve kaspaz-9 gibi hücre ölümü metabolik yolların inhibe etmektedir²²⁻²⁵.

2.1 EPO, Reseptörleri ve Sinyal Yolakları

EPO fetal dönemde hepatositlerde; doğum sonrası renal korteksteki peritübüler fibroblastlarda üretilen glikoprotein yapı da 34 kDa moleküler ağırlığına sahip bir sitokindir. Yetişken bireylerde EPO üretimi ağırlıklı olarak böbrek olsa da; dolaşım sistemindeki EPO'nun %10'u²⁶; beyin, karaciğer, akciğer, testis ve dalak gibi nonrenal dokularda üretilir.²⁴ EPO üretimi düşük oksijen seviyesine duyarlı mekanizmalar tarafından kontrol edilir ve periferik kan dolaşımındaki oksijen kapasitesini sabit tutmak için günlük olarak 2×10^{11} kırmızı kan hücresini kemik iliğinde üretir¹². Bununla beraber EPO üretimi hipoksi haricinde hipoglisemi, artan hücre içi kalsiyum miktarı, insülin salınımı, östrojen, androjen, somatotropin, insülin benzeri büyüme faktörü-1 gibi molekülleri ile de modüle edilebilir^{24; 25}.

İnsan EPO geni tek bir kopya şeklinde 7. Kromozomun²⁷ 7q22 pozisyonunda bulunup²⁸, 3kb bir bölgeyi kapsar ve 5 ekzon içerir^{28; 29}. Bu gen ilk olarak 193 aminoasit içeren bir protein sentezler. Post-translasyonel modifikasyonlar sırasında N-terminalindeki 27 aminoasitlik sinyal peptidi ve C-terminalindeki arjinini kesilerek 165 aminoasitlik olgun EPO proteini elde edilir³⁰. EPO protein yapısı; aminoasit zinciri içinde, C7-C161 ve C29-C33 pozisyonlarındaki 2 disülfid köprüsü ile stabilize edilir (Şekil 1. EPO' in yapısı). Bununla

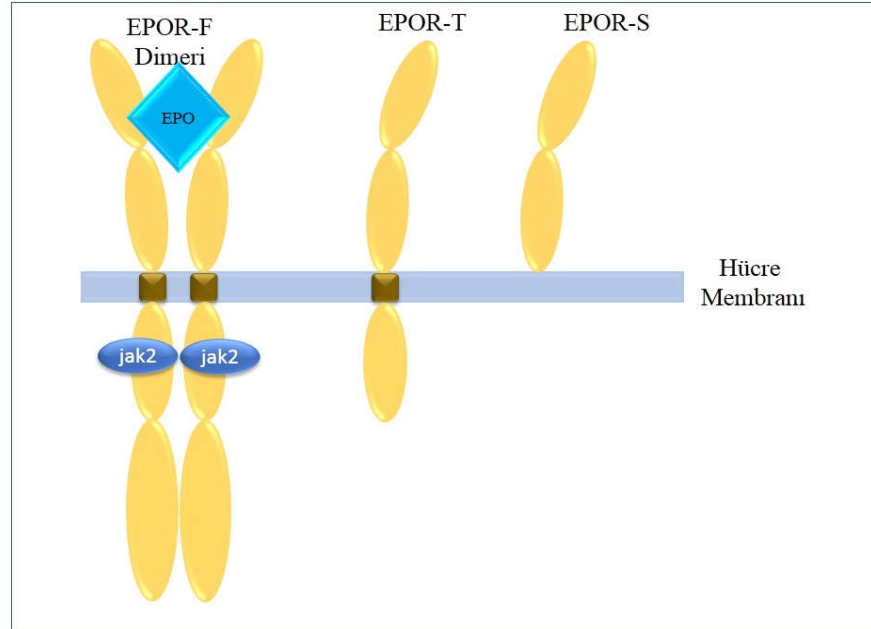
beraber EPO molekülünün ağırlığının %35-40'ını N (N24, N38 ve N83) ve O (S126) bağlantılı oligosakkarit yan zincirler oluşturur^{31; 32}. EPO'nun yapısındaki disülfid bağların eksikliği molekülün bioaktivitesinin düşmesine sebep olurken³³, N bağlantılı oligosakkaritlerin eksikliği in vitro molekülün fonksiyonunu etkilemezken; in vivo olarak molekülün biosentezini, yapısal stabilitesini, sekresyonunu, plazmadaki yarılanma süresini ve temizlenmesini etkiler³⁴⁻³⁶. Deglikolize olmuş EPO'nun aktivitesi oldukça kısa sürer³⁷.

Eritropoesiz stimule edici ajanlar; endojen olarak sentezlenen rHuEPO 'nun değişik glikolizasyon paterni gösteren iki formu olan eritropoetin- α ve eritropoetin- β , ve 2. nesil üretim olan 2 ekstra N-glikolizasyon kısmı eklenmiş uzun süreli etkili (daha uzun yarılanma ömrü olan) darbopoetin- α şeklinde bulunabilir³⁸.

2.1.1 EPO Reseptörleri

2.1.1.1 Eritropoetin reseptörü (EPOR)

İnsan EPOR geni kromozom 19'da p13.3-p13.2 pozisyonunda bulunur^{39; 40}. EPOR geni 6kb'lık bir bölgeyi kapsar ve 508 aminoasitlik bir protein sentezleyen 8 ekzon içerir⁴¹. EPOR genin; non-coding RNA, fonksiyonel transmembran proteini (EPOR-F), trunkat proteini (EPOR-T) ve en az bir tane çözünür proteinini (EPOR-S) sentezleyen farklı kesim varyantları vardır⁴²⁻⁴⁴.



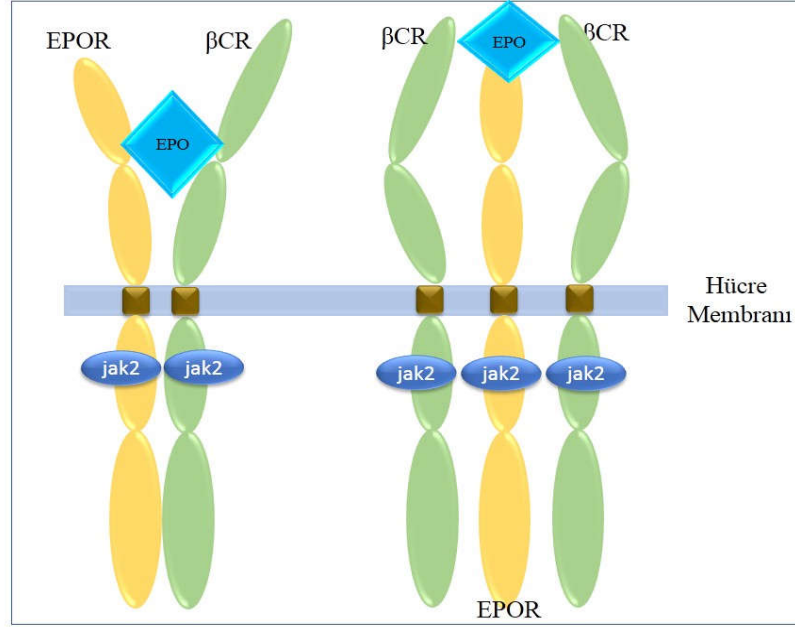
Şekil 1:Farklı mRNA Kesim Varyantları Tarafından Sentezlenen EPOR'leri.

EPOR, sitokin tip 1 reseptör ailesinin (cytokine type 1 receptor family) bir reseptörüdür²⁴. Post-translasyon modifikasyonları sırasında, N-terminalindeki 24 aminoasitlik sinyal peptidi kesilir ve EPOR proteini; glikolizasyon, fosforilasyon ve ubiquitinasyon ile 60 - 105kDa arasında değişen moleküler ağırlığı olan matur EPOR proteinleri oluşur⁴⁵⁻⁴⁷. Matur insan EPOR proteininin; ⁴⁸ transmembran kısmına yakın bulunan korunmuş WSXWS motifi ve 2 çift sistein rezidüsü olan liganda bağlanan ekstraselüler kısmı, ⁴⁸ tek transmembran kısmı ve (3) katalitik aktivitesi olmayan sitoplazmik kısımları bulunur⁴⁹.

EPO ‘nun hematopoietik hücrelerdeki etkisi, hücre yüzeylerindeki EPO’ ya özgü reseptör olan EPOR aracılığı ile gerçekleşir²⁵. EPO ‘nun reseptörlere bağlanması ile EPOR dimerizasyonu oluşur. EPO reseptörlerinin büyük bir kısmı kemik iliğindeki eritrosit öncül hücrelerinin [erythroid burst-forming units (BFU-E), and erythroid colony-forming units (CFU-E)] yüzeyinde bulunur²⁴. Bununla beraber; kardiyomiyositlerin, kardiyak fibroblastlarının, endotelial ve vasküler düz kas hücrelerinde, mide hücrelerinde, retinal ve prostat hücrelerinde, insan saç foliküllerinde ve iç kulaktaki işitsel kıl hücrelerinde bulunabilir^{45; 50; 51}. Ayrıca EPO reseptörü birçok kanser hücresi yüzeyinde de bulunabilir²⁴.

2.1.1.2 Beta ortak reseptörü (CSF2RB)

İnsan koloni stimüle edici faktör 2 beta reseptörü [colony-stimulating factor 2 receptor, beta (CSF2RB)] 14 ekzon içerir ve kromozom 22 ‘de 22q13.1 pozisyonunda bulunur (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/1439>). CSF2RB geni interlökin 3 ve 5 ‘in ve granülosit-makrofaj koloni stimüle edici faktör (GM-CSF) ‘nin yüksek afinite reseptör subunitesi olan ortak beta zincir proteinini sentezler²⁴.



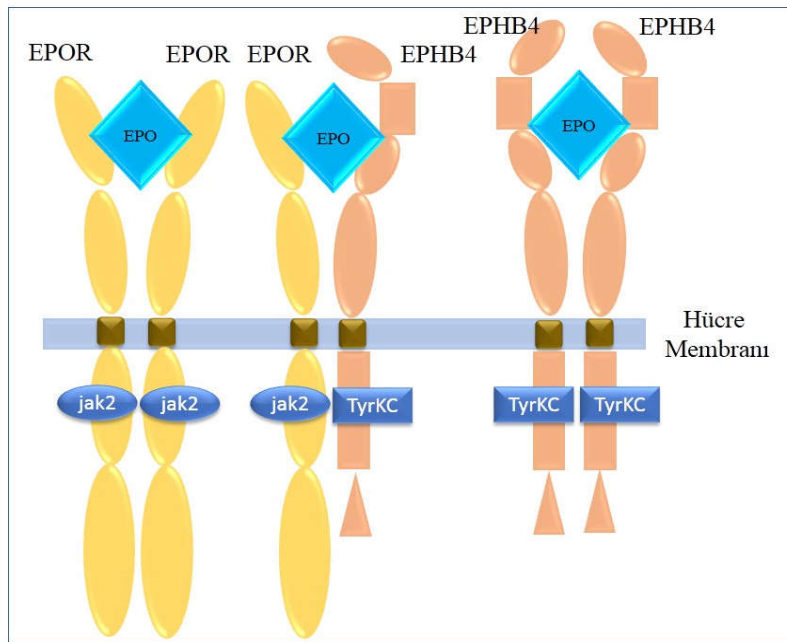
Şekil 2: Doku Koruyucu Olarak Görev Yaptığı Önerilen EPOR-CSF2RB Heterodimeri ve Heterotrimeri

EPO'nun non-hematopoietik dokulardaki (kalp, kan damarları, böbrek ve beyin) hücre koruyucusu etkisinin⁵² EPOR- βcR heterodimeri²⁴ ya da EPOR- βcR-EPOR heterotrimeri¹ aracılığı ile yapıldığına dair görüşler bulunmaktadır. Her ne kadar hayvan modellerinde eritropoetik olarak inaktif EPO türevleri ve analogları uygulanarak doku koruyuculuğu gösterilmiş olsa da⁵³, non hematopoietik dokudaki EPOR varlığını kanıtlayan yöntemlere dair kuşklar bulunmaktadır⁵⁴. EPOR- βcR arasında oluşan heteroreseptör kompleksi ile aktive olan sinyal yollarının klasik EPOR dimerizasyonu ile aktive olan sinyal yollarından farklı olabileceği düşünülse de tam olarak çalışma mekanizması ve yolları ile ilgili bir bilgi yoktur⁵⁵⁻⁵⁸.

2.1.1.3 Efrin B tipi reseptör 4 (EPHB4)

Efrin B4 reseptörü (EphB4) kromozom 7'de 7q22 pozisyonunda bulunup, 17 ekzona sahiptir (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/2050>). Efrin reseptörleri, vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) ve Tie reseptör tirozin kinazlar (RTK) gibi angiogenesizi kontrol eden RTKs ailelerinden bir diğeridir⁵⁹. Efrin RTK ailesini diğer RTK ailelerinden ayıran sadece sahip olduğu 14 reseptör ve 8 efrin ligandı ile büyüklüğü değil, ayrıca membrana bağlı olan efrin ligandları ile çalışması ve hücrel itme, adhezyon, hücrenin ekstraselüler matrikse tutunması ve hücre migrasyonu sırasında rol almasıdır⁵⁹. Ayrıca efrin reseptörleri ve ligandları

arasındaki etkileşim tek yönlü değil çift yönlü şekilde çalışır ve sinyal yollarını aktive eder⁵⁹. Efrin reseptörleri ve ligandlarının omurgalı ve omurgasızlarda homologları olmakla beraber⁶⁰; reseptör/ligand çiftlerinin sinir sisteminde arka beyin gelişimi sırasında, akson ve nöral krest hücresi yönlendirmede⁶¹ ve embriyonik dönemde vasküler gelişimde, erişkin dönemde angiogenesiz de görev yaptıklarına dair çalışmalar mevcuttur⁵⁹. Yapılan çalışmalar⁶² gelişimin erken safhalarında EphB4 reseptörünün toplardamar endotelial hücreleri için; efrin B2 ligandının ise atardamar endotelial hücreleri için en iyi biyobelirteç olduğunu göstermiştir. EphB4/Efrin B2 ikilisinin herhangi birinin knock out olduğu durumlarda elde edilen sonuçlar; reseptör-ligand çiftinin embriyonik vasküler gelişimi çift yönlü regüle ettiğini ortaya koymuştur⁶³. EphB4/Efrin B2; atar-toplardamar kavşağında endotelial hücrelerin ilişkilerini kontrol edip; yeni kapiller oluşumunu stimule edebildiği gibi, atar-toplardamarlardaki jukstakrin ekspresyonları kontak oluşumuna bağımlı iletişim ile vasküler oluşumu indükleyebilir ve etraflarındaki mezenkimal hücrelerle de etkileşime geçerek oluşan damarlanmanın kalıcılığını sağlamak amacıyla, onların perivasküler destek hücrelerine farklılaşmalarını sağlayabilirler⁵⁹.

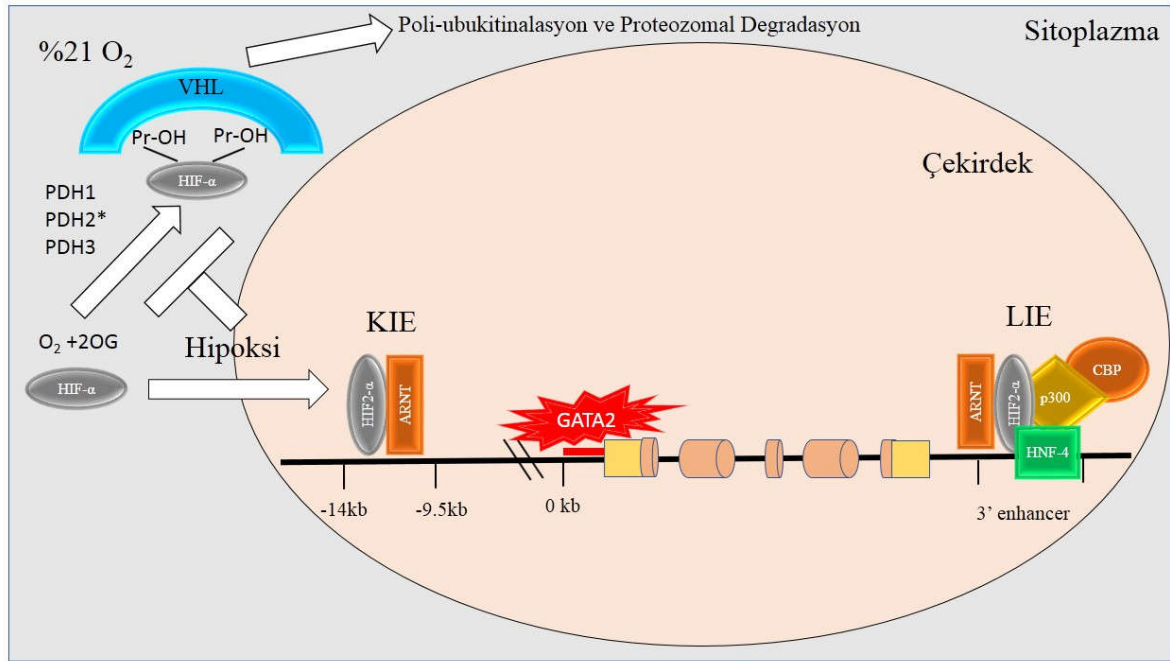


Şekil 3: NEPOR, EPO Bağımlı Doku Koruyucu Reseptörleri

Bunların yanı sıra EphB4 ‘ün eritropoesizde rolü olduğu da ileri sürülmüştür⁶⁴. Suenobu at al, EphB4 RTK sahip öncül eritroid hücreleri ile EphB4 ligandı efrin B2’ye sahip

kemik iliği stroma hücreleri ve endotelial atardamarların beraber kültürü yapıldığında, eritroid progenitor hücrelerinin stromal hücrelerden ayrıldığı ve olgun eritrositleri oluşturduğunu göstermiştir. Jackson et al, 2013 yılında Amerika patent uygulamasında EPOR homodimeri, EPOR-EPHB4 heterodimeri ve EPHB4 homodimerinden oluşan reseptör komplekslerine NEPOR adını vermiş ve bu komplekslerin özgün bir doku koruyucu etkisi olduğunu öne sürmüştür.

2.1.2 EPO ile aktive olan sinyal yolları



Şekil 4: EPO Sentezinin Normal (%21 O₂) ve Hipoksi (%1 O₂) Koşulunda Regülasyonu

Epo ile aktive olan sinyal yollarını incelemeyen önce Epo gen ekspresyonunu modüle eden O₂ miktarına duyarlı mekanizmadan bahsetmek doğru olacaktır. Her ne kadar hipoksi ile indüklenen Epo üretimine dair bilgiler hepatoma hücre hatlarından elde edilmiş olsa da²⁴ renal ve hepatik hücrelerde üretilen Epo 2 hususta farklılık gösterir. İlki; renal ve hepatik hücrelerde hipoksi respons element' inin (HRE) Epo genindeki lokalizasyonundaki farklılıktır: HRE, renal hücrelerde genin upstreamin de, hepatik hücrelerde ise downstreaminde bulunur⁶⁵. İkincisi ise Epo üretimini sağlayan hipoksiye verilen cevap miktarında şeklinde görülür; Cevap, renal hücrelerde ya hep ya hiç şeklinde, öte yandan hepatik hücrelerde dereceli olarak görülür⁶⁶. Epo ekspresyonu normal koşullarda GATA-2 ve Nükleer Faktör Kappa-B (NF-kB) ile negatif¹; hipoksi koşulunda hipoksi ile indüklenen

transkripsiyon faktörleri (HIF'ler)²⁴ ; hepatosit nükleer faktör -4 (HNF-4) ve transkripsiyonel ko-aktivatörler: p300, cAMP respons elementine bağlanan proteinine bağlanan protein (CBP)⁶⁷ and p160 steroid reseptör koaktivatörü (SRC)⁶⁸ ile pozitif yönde kontrol edilmektedir. Epo promotörü normal koşullarda GATA-2 tarafından inhibe edilmiştir. HIF proteinleri α ve β subunitelerinden oluşur. α subunitleri C terminallerinde O₂ bağımlı degradasyon kısmı (O-DDD) ve trans aktive kısmı olan sitoplazmik bir proteindir⁶⁹. O₂ varlığında HIF1- α prolin rezidülerinden prolin-4 hidroksilaz (PHD-1/2/3) ile hidroksillenir ve Hippel-Lindau tümör baskılayıcı protein (VHL)/E3 ligaz ile birleşerek direk proteozomal degradasyona uğrar²⁴. Son olarak Epo ekspresyonu doku spesifik, O₂ bağımsız olarak ta HIF bağlanma bölgesinin yanındaki doğrudan tekrarlanan (DR2) DNA elementine bağlanan⁷⁰ tiroit hormonu⁷¹ ya da retinoik asit⁷² ile de indüklenebilir.

EPO'nun etkisinin normal ya da tümör hücresi üzerinden direkt olarak görülebilmesi ve alt sinyal yollarının aktivasyonu için hücre yüzeyinde fonksiyonel EPOR bulunmalıdır. EPOR, EPO ile aktivasyonu sonucunda konformasyonel değişikliğe uğrayan ekstraselüler kısmı ile alt sinyal yollarının aktivasyonunda görevli proteinlerin bağlanabileceği 8 fosforilasyon rezidüsü bulunan sitoplazmik kısımdan oluşur⁷³. Yapılan çalışmalar, EPOR ile Janus-activated kinase 2 (JAK2)/ sinyal transdüser ve transkripsiyon aktive edici 5 (STAT5); mitojen aktive eden protein kinaz (MAPK)/ekstraselüler sinyal ile regüle edene kinaz (ERK); fosfoinositid 3-kinaz (PI3K)/Akt; and protein kinaz C (PKC) sinyal yollarının aktive olduğu¹; bununla beraber hipoksi ve apoptoz sinyal yollarının da EPOR ile ilişkili olduğunu gösterilmiştir.

EPO'nun EPOR'a bağlanması ile EPOR homo-dimerizasyonu oluşur. Bu sayede intrinsik tirozin kinaz aktivitesi olmayan EPOR yerine, EPOR'un intraselüler kısmında bulunan sitoplazmik tirozin kinaz olan JAK2 moleküllerinin; dimerizasyon ile birbirine yaklaşmasıyla transfosforilasyonları gerçekleşir⁴⁹. Aktif JAK2, EPOR dâhil olmak üzere intraselüler proteinlerin fosforilasyonunu sağlar. STAT5'da JAK2 ile fosforile olan proteinlerden biridir⁷⁴. Fosforilasyonu takiben STAT5 proteinleri homodimer oluşturarak aktif hale gelir ve çekirdeğe taşınırlar. Oluşan dimer DNA ile direk olarak STAT5 spesifik bağlanma motifi ile etkileşime geçer ve siklin D1, BCL-XL gibi hücre döngüsü kontrol ve apoptoz direnç mekanizmaları ile ilişkili genlerin aktivasyonunu sağlar⁷³. Bununla beraber eritroid farklılaşması ile genlerin transkripsiyonel aktivasyonu da sağlanmış olur⁷⁵. Aktive olan sinyal yolağı ise EPOR'a (fosfotirozin 429), Src-homology-tirozin fosfat 1'in (SHP1)

bağlanması ile JAK2 defosforilasyonu ile alt sinyal yollarının aktivasyonu deregüle edilmiş olur⁷⁵⁻⁷⁷.

SOS, GRB2 gibi adaptör proteinlerin EPOR ile fosforilasyonu ve RAS'ın aktivasyonunu sağlamaları ile MAPK/ERK ve PI3/AKT sinyal yolları aktive olur⁷⁸. İki sinyal yolağının da EPO ile aktivasyonu sonucu c-myc ekspresyonun ve dolayısı ile nükleer c-myc proteinin miktarında artış gözlenmiştir. Buna bağlı olarak myc'in diğer nükleer proteinlerle oluşturacağı heterodimerler ile hücre döngüsü kinaz inhibitörleri, protein sentezi regülatörleri ve microRNA'ların da modülasyonunda değişiklikler oluşturabilecek etkilerden bahsedilebilir⁷⁹.

EPO-EPOR aktivasyonu ile indüklenen bir diğer yolak ta PKC metabolik yolağıdır. EPO'nun EPOR'a bağlanması ile fosforile olan fosfolipaz C gamma (PLC γ); membrana bağlı glikozilfosfatidilinositol (GPI) ilişkili protein hidrolize sebep olur⁸⁰. GPI'nin hidrolize oluşu da PKC yolağını aktive eder. Yolak ERK gibi regülatör proteinlerin nükleer translokasyonu ve apoptoz direnci ve DNA sentezi gibi hücre davranışında değişikliğe sebep olacak genlerin transkripsiyonun indüklenmesi ile son bulur.

EPOR aktivasyonunun kanser⁸¹⁻⁸³ ve nörolojik korunma^{84; 85} durumlarında apoptotik metabolik yollar üzerine etkisi literatür de farklı şekillerde önerilmiştir. Bu etki anti-apoptotik BCL-XL ve BCL-2 proteinlerinin up-regülasyonu ile açıklandığı gibi BAX, BAD ya da kaspazlarından bahsedebileceğimiz proapoptotik moleküllerin down regülasyonu ile de gösterilmiştir⁸⁶⁻⁸⁸. NF-kB yolağının da EPO aracılığı gelişen apoptotik direnç mekanizmalarından biri olduğu öne sürülmüştür^{89; 90}.

2.2 Eritropoesiz stimule edici ajanlar (ESA) ve Kanser

Kanser hastalarında görülen anemi; hastalığın prognozu için bağımsız bir sağkalım faktörüdür⁹¹. Kanser türüne göre, hastalarda görülen anemi prevalansı değişse de yapılan çalışmalar, solid tümörlerin %66'ında, hematolojik kökenli tümörlerin ise %72 sinde hastalığın seyri boyunca bir dönemde hastaların anemik olduğunu gösteriyorlar⁹². Anemi, kemoterapi gören hastalarda kemoterapinin mielosupressif etki göstermesi yüzünden; kanser ile indüklenen anemi (CIA) şeklinde ya da kanserin kendisi yüzünden (CRA) görülebilir⁹³. Kanser anemisi için 2 farklı terapi bulunuyor; ⁴⁸ kırmızı kan hücresi (RBC) transfüzyonu, ve ⁴⁸ kemik iliğindeki kırmızı kan hücresi öncüllerindeki EPOR'u aktive ederek RBC üretimini

uyaran eritropoesiz stimüle edici ajanlar (ESA)⁹⁴. RBC transfüzyonu hızlı bir şekilde hemoglobin seviyesinde artış sağlamak için⁹⁵ bir seçenek olsa da; etkisinin 15 gün içinde azalması⁹⁶ ve bununla beraber bulaşıcı patojen taşınması ve transfüzyona bağlı akut akciğer rahatsızlığı gibi riskleri⁹⁷ bulunmaktadır. Epoetin alfa ve darbepoetin alfa gibi ESA'lar ile plasebo kontrollü denemeler, ESA kullanımının RBC transfüzyon miktarını azalttığını göstermiştir⁹⁴. Bunu takiben her ne kadar ESA kullanımı kemoterapi tedavisi gören hematolojik kökenli olmayan kanser hastalarında uygulanması için FDA tarafından onaylansa da ESA kullanımının; tromboembolik olayları artırdığına⁹⁸, hastalığın ilerlemesini ve mortaliteyi artırdığını gösteren⁹⁹ çalışmalar mevcuttur.

Kullanılan ESA ilaçlarının prospektüsünde ESA kullanımının kanser hastalığının seyrini ve kötü prognozunu artırdığını öneren 8 klinik denemeden bahsedilmektedir⁹⁴. Bu çalışmaların ikisi sadece radyoterapi görmüş hastalarda, ikisi hiçbir tedavi görmemiş kanser hastalarında ve son olarak 4'ü ise sadece kemoterapi tedavisi almış kanser hastalarından yapılmış çalışmalardır.

İlk iki çalışma sadece radyoterapi alan baş ve boyun kanseri hastalarında yapılmış ENHANCE¹⁰⁰ ve DAHANCA-10¹⁰¹ klinik denemeleridir. ENHANCE denemesinde epoetin beta, DAHANCA-10 denemesinde ise darbepoetin alfa, hastalara uygulanmış; her iki uygulamada da hemoglobin seviyesinin $\geq 14\text{g/dl}$ olması hedeflenmiştir. ENHANCE denemesinde ESA alan hastalarda lokorejyonel ilerleme ve düşük sağkalım görülmüştür. Benzer şekilde DAHANCA-10 denemesinde de darbepoetin alfa ile tedavi edilen hasta grubunda da kötü prognoz ve düşük sağ kalım oranları görülmüştür. Her ne kadar bu iki denemede bulunan sonuçlar yapılan diğer çalışmalarda tekrarlanamasa da ESA kullanımının sadece radyoterapi alan hastalarda önerilmemesi için yeterli etkiyi yapmıştır.

Hiçbir tedavi almayan kanser hastalarında yapılan EPO-CAN-20¹⁰² ve AMG 20010103¹⁰³ denemelerinde sırasıyla büyük hücreli akciğer kanseri ve hematolojik kökenli olmayan kanser hastaları, epoetin alfa ve darbepoetin alfa ile tedavi edilmişlerdir. EPO-CAN-20 çalışması ara analizler sırasında ESA alan grupta artan mortalite oranı yüzünden sonlandırılmıştır. AMG 20010103 çalışmasında ise yapılan mortalite analizlerinde ESA yanıtının ESA grubunda mortaliteyi artıran bir faktör olduğu ortaya çıkmıştır. Her ne kadar daha sonra yapılan çözümleyici veri analizleri mortalite risk oranını ve istatistiksel anlamlılığını düşürüp bu durumun tüm hasta alt gruplarını yansıtmadığını önerse de bu iki çalışma temel

alınarak, ESA kullanımının hiçbir tedavi görmeyen kanser hastalarında uygulanması tavsiye edilmemektedir.

BEST¹⁰⁴, AMG 2000016⁴⁸, GOG-191¹⁰⁵ ve PREPARE^{106; 107} klinik denemelerinde, sırasıyla kemoterapi tedavisi gören göğüs kanseri, lenfoproliferatif kanserler, servikal kanser ve son olarak antrasiklin ve taksinler ile yoğun kemoterapi tedavisi gören göğüs kanseri hastalarında; epoetin alfa, darbopoetin alfa, rHuEPO ve darbopoetin alfa uygulanmıştır. Bu denemelerde ESA uygulanması ile beklenen hemoglobin seviyesi sırasıyla; 12-14g/dl; 13-14g/dl kadınlar için, 13-15g/dl erkekler için; 13-14g/dl ve son olarak 12.5-13g/dl olarak amaçlanmıştır. BEST denemesinin; EPO-CAN-20 gibi ara analizler sonucundan ESA tedavisi alan gruptaki yüksek mortalite değerleri yüzünden sonlandırılması önerilmiştir. AMG 2000016 denemesinde de 29 aylık takip sonunda ESA ile muamele edilen hasta grubunda yüksek mortalite görülmüştür. Servikal kanser hastalarında yapılan GOG-191 klinik denemesinde ise ESA tedavisi grubunda artan tromboembolik olaylardan dolayı çalışma sonlandırılmıştır. Ancak yine de 37 ay süren çalışmalarda ESA tedavisi gören grubun %33 ünde hastalığın tekrarı (kontrol grubunda %25) görülürken %60'ında stabil seyir (kontrol grubunda %65) gözlenmiştir. Yine 3 yıla yakın süren PREPARE denemesinde ESA tedavisi gören grupta daha az stabil seyir ve sağkalım gözlemlendi. Her ne kadar sonuçlar istatistiksel bir anlamlılıktan ziyade bir trendi işaret etse de genelinde bu 4 çalışma ile ESA kullanımı sadece kemoterapi gören hastalarda kullanım için tavsiye edilmemektedir.

2.3 EPO ve Glioblastoma

rHuEPO'nun Glioblastoma Multiforme 'da etkisi in vitro ve in vivo olarak araştırılmış olsa da literatürde özellikle göğüs kanseri ve renal hücre kanseri kadar geniş çaplı ele alınmamıştır.

İlk çalışma 2007 yılında Mohyeldin ve arkadaşları tarafından yapılmış; U251, U87 ve U373 GBM hücre hatlarında EPOR reseptörü varlığını gösterilmiştir. GBM ve Glioma 2.evre doku örneklerinin (65 örnek toplam) %100'ünde EPOR; %68'inde EPO varlığını; bununla beraber sadece GBM örneklerinde hipoksik olarak bilinen perinekrotik alanlarda EPO ve EPOR ile birlikte yüksek HIF1 α proteini ve yine GBM örneklerinin 3'te 2'sinde MMP-2 protein varlığını IHC ile göstermişlerdir. GBM hücrelerine hipoksik koşullarda rHuEPO uygulandığında p-JAK, p-STAT5 ve p-AKT ve genel olarak hücre için tirozin fosforilasyonun da artışı gözlemlenmiştir. Hipoksik koşulların HIF1 α 'nın nükleer lokalizasyonunu artırdığı

ve uzun süreli hipoksik koşullarda EPO ve EPOR protein seviyesinde artış görülmesi ile hipoksi bağımlı otokrin/parakrin bir mekanizma olduğunu öne sürmüşlerdir. Öte yandan rHuEpo'nun cisplatine karşı GBM hücrelerinin canlılığını korumasını sağladığı ve özellikle hipoksik koşullarda bu etkinin daha net görüldüğü belirtilmiştir. Son olarak bu çalışmada hipoksisinin MMP-2 aktivitesini artırarak invazyonu artırdığı, bununla beraber bu etkinin EPOR aracılığı ile sağlandığı in vitro ve in vivo olarak gösterilmiştir¹⁰⁸.

Yin ve ark. aynı yıl, daha geniş bir GBM hücre hattı panelinde (U87, U118, U138, U343, U373, T98G) ve Mohyeldin et al.'dan farklı olarak primer hücre hatlarında (DA66, JM94) EPOR'un varlığı hem mRNA hem de protein seviyesinde göstermiştir. EPO'nun (T98G, U87, JM94) EPOR aracılığı ile proliferasyonu; p-ERK, p-AKT, p-JNK ve p-Jun gibi ikincil sinyal yollarının proteinlerinin aktivasyonunu sağladığı ve son olarak antiapoptotik Bcl-2, Bcl-xl proteinlerinin sentezini artırdığı gösterilmiştir¹⁰⁹.

Hassouna ve ark. rHuEpo'nun GBM hücre hatlarında bazal de proliferasyona ve migrasyona etkisi olmadığını; in vivo olarak uygulandığında da tümör'ün büyümesini sağlamadığını öne sürmüşlerdir. Ancak bu çalışma da rHuEpo'nun kemoradyasyon uygulamalarında GBM hücre hatlarında hücre koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir¹¹⁰.

Cao ve ark. önceki çalışmalardan farklı olarak; rHuEpo'nun GBM hücrelerinde dışardan etkilerine bakmak yerine; EPOR 'un GBM kök hücrelerindeki (GSC; CD133⁺) varlığını ve tümör oluşumuna etkilerini incelemişlerdir. CD133⁺/EPOR⁺ GSC'lerin nörosfer oluşturma eğilimin daha fazla olduğu gibi EPOR'un GSC'lerde büyüme ve canlılığı artırdığı; STAT3 aktivasyonunu sağladığı in vitro, tümör oluşumunu ve sağ kalımı etkilediğini ise in vivo olarak göstermişlerdir. STAT3 inhibisyonun ise sadece büyüme ve canlılığa etkisi in vitro olarak gösterilmiştir¹¹¹.

Nico ve ark. farklı evre astrositomların küçük ölçekli bir doku grubu panelinde; artan evre derecesi ile doğru korelasyon gösteren mikro damar yoğunluğu, tümör EPO immün reaksiyonu ve endotelial EPOR immün reaktivitesi olduğunu göstermişlerdir. Bununla beraber doku örnekleri kullanarak yaptıkları in vivo angiogenesiz deneylerinde GBM dokularında angiogenesizin arttığı ve anti-EPOR antikoru ile birlikte verilen GBM dokularında ise angiogenesizin anlamlı olarak azaldığı görülmüştür.¹¹² Daha geniş bir hasta doku panelinde yapılan EPOR, p-JAK2, p-STAT5 immünboyama sonuçları ise GBM dokularının sadece %36'sının p-JAK/p-STAT5 pozitif ve sadece %20'sinin EPOR/p-JAK/p-STAT5 pozitif olduğu yönde bulgular ortaya koymuştur¹¹³.

Son olarak Peres ve ark. GBM hücre hatlarında aktif ve fonksiyonel EPO/EPOR bulunduğu ve otokrin/parakrin bir mekanizma ile çalıştığı; ERK sinyal yolağı aktivasyonunu sağlayarak proliferasyon üzerine hem endojen EPO' nın hem de EPOR'un anlamlı olarak etkisi olduğunu göstermişlerdir. Grup ayrıca EPOR'un in vivo olarak da tümör büyümesi ve sağ kalım üzerine negatif etkisi olduğunu öne sürmüştür¹¹⁴. GBM üzerine yaptıkları çalışmaların devamında EPOR'un G2/M fazında hücre döngüsünü durdurduğunu ve hücreleri radyoterapi ve kemoterapiye duyarlı hale getirdiğini göstermişlerdir. Hücre döngüsünün bozulmasının artan siklin B1 aracılığı ile yapıldığını öne sürmüşlerdir¹¹⁵.

Tablo 1. ESA kullanımının Glioblastoma Multiform üzerine etkisinin incelendiğı in vitro ve in vivo çalışmalar

Çalışma	Tümör Modeli Hücre Hattı	ESA doz aralığı/ Anti-EPO uygulaması	Uygulanan Tedavi	Sonuçlar
Mohyeldin ve ark. ¹⁰⁸	GBM hücre hatları, Glioma 2. ve 4. Evre hasta dokuları	rHUEPO 200 IU/ml	Cisplatin	GBM hücre hatlarında fonksiyonel EPOR varlığı ve hipoksik koşullarda miktarında artış; Glioma doku örneklerinde EPO ve EPOR ifadesi ve bunun tümör evresiyle korelasyon göstermesi; EPO'nun normal ve hipoksik koşullarda GBM hücrelerini cisplatin toksisitesine karşı koruması, metallaproteinaz aktivitesini artırarak invazyonu artırması.
Yin ve ark.. ¹⁰⁹	GBM hücre hatları, GBM primer hücre kültürleri, Normal beyin dokusu, GBM hasta dokusu	rHUEPO 2 IU/ml	PI3-K inhibitör LY90024	Epo bağımlı hücre çoğalması; Bcl-2, BCL-xl antiapoptotik gen ekspresyonunda artış; PI3K/AKT aktivasyonu; p-ERK, p-c-JUN, p-JNK miktarından artış.
Hassouna ve ark. ¹¹⁰	P53 mutant GBM hücre hatları, GBM hasta dokusu	rHUEPO 0,3 IU/ml in vitro, 5000IU/kg in vivo	Radyasyon, Temozolomid	EPO'nun bazalde hücre migrasyonuna (4/4), ve proliferasyonuna (3/4) etkisinin olmadığı; In vivo olarak uygulandığında tümör büyüklüğünü değıştirmedeğı; Radyasyon ve kemoterapötik ajan ile muamele edilen hücrelere (3/4) EPO verildiğinde koruyuculuk sağladığı; GBM doku örneklerinde HIF1á'nın EPOR ve EGFRvIII ile pozitif korelasyon göstermesi

Cao ve ark. ¹¹¹	Glioma Kök Hücre Hatları		WP1066	CD133 ⁺ 'in CD133 ⁻ 'lere göre daha fazla EPOR ⁺ oldukları; CD133 ⁺ /EPOR ⁺ hücrelerin nörosfer oluşturma eğilimlerinin daha fazla olduğu; Glioma kök hücrelerinde EPOR gen ifadesinin susturulmasının; bu hücrelerin büyümesini, sağ kalımlarını, nörosfer oluşturma kapasitelerini ve STAT3 aktivasyonu azalttığını; STAT3 inhibisyonun da GSC sağ kalım ve büyümesi için kritik rol oynadığı
Nico ver ark. ¹¹²	Glioma 2. ve 3. Evre; GBM hasta dokuları	rHuEPO 10IU/ml		EPO/EPOR ifadesinin angiogenesiz ile pozitif korelasyon göstermesi; tümör biyopsi örneklerinin angiogenesizi artırması, anti-EPO antikor kullanımının tümör örneklerinin indüklediği angiogenesizi anlamlı olarak inhibe ettiği
Kondyli ve ark. ¹¹³	Hasta Beyin Tümör dokuları (Diffüz fibriller astrositom, Anaplastik astrositom, Glioblastoma multiforme, Oligodendroglioma, Ependimoma, Medullablastoma, Menenjioma)			GBM dokularının %36'sının p-JAK/p-STAT5 pozitif; sadece %20'sinin EPOR/p-JAK/p-STAT5 pozitif olduğu
Brunotte ve ark. ¹¹⁶	GBM hasta dokuları		Radyoterapi, ACNU Temozolomid	EPOR ekspresyonunda artış /göreceli genç hastalarda sağkalım pozitif korelasyon; EPO ekspresyonunda artışı/ daha iyi sağkalım pozitif korelasyon; EPO/EPOR ifadesinde artışın/daha uzun sağkalım süresi pozitif korelasyon; Azalan EPO miktarının /hastalığın tekrarı pozitif korelasyon
Peres ve ark. ¹¹⁴	Sıçan ve İnsan GBM hücre hatları			In vitro; Fonksiyonel EPO/EPOR sisteminin ERK sinyal yolağı aracılığı ile proliferasyon üzerine etki göstermesi. İn vivo; EPOR varlığının tümör büyümesi ve sağ kalıma ile negatif korelasyon göstermesi
Peres ve ark. ¹¹⁵	İnsan GBM hücre hatları	rHUEPO 2IU/ml	Radyasyon, Temozolomid	Normal ve hipoksik koşullarda; EPOR ekspresyonun azaltılmasının siklin B protein miktarında artışa sebep olarak G2/M fazında hücre döngüsünün durmasına yol açması ve radyasyon-kemoterapiye etkisinin artırması

3 GEREÇ VE YÖNTEM

3.1 Araştırmanın Tipi

Çalışma deneysel (in vitro) bir çalışmadır.

3.2 Araştırmanın Yeri ve Zamanı

Bu çalışmamız İzmir Biyotıp ve Genom Merkezi Enstitüsü Laboratuvarlarında 2015 Şubat-2017 Haziran tarihleri arasında yapılmıştır.

3.3 Araştırmanın Evreni ve Örneklemi

Hücre Kültürü çalışmasıdır.

3.4 Çalışma Materyali

Çalışmamızda Amerikan Tipi Kültür Koleksiyonu'ndan (American Type Culture Collection-ATCC) alınan U-87 MG hücre hattı kullanılmıştır.

3.5 Araştırmanın Değişkenleri

-EPO (Bağımsız Değişken)

-Proliferasyon, Migrasyon, Invazyon, Angiogenez (Bağımlı Değişken)

3.6 Veri Toplama Araçları

3.6.1 Hücre Kültürü

Bu çalışma da kullanılan U-87 MG hücre hattı ATCC'den alınmıştır. Hücre hattının idamesi için %10 fetal sığır serumu (Fetal Bovine Serum; FBS) (Gibco, Thermo Scientific Fisher) (Waltham, MA USA), %1 L-Glutamine (Biochrom AG, Almanya) ve %1 Penisilin-streptomisin (Biochrom AG, Almanya) ile desteklenmiş sodyum pürivat içeren yüksek glukozlu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Biochrom AG, Almanya) kullanıldı. Hücrelerin pasajı 2 günde 1, hücrelerin, konsantrasyonu %0.25 olan Tripsin/EDTA (Biochrom AG, Almanya) ile 75cm² lik kültür flasklarından kaldırılarak, ATCC'nin önerdiği hücre miktarında diğer kültür kaplarına ekilmesi ile gerçekleştirilmiştir. Hücre kültürü çalışmaları süresince Laminar akımlı kabinet (Safe 2020 Class II Biological Safety Cabinets, Thermo

Scientific Fisher) (Waltham, MA USA) kullanılıp, kültür %5 CO₂ içeren inkübatörde (Mettler GmbH, Schwabach, Almanya) 37°C'de idame ettirilmiştir.

Hücreler rutin pasajlanma işlemi sırasında öncelikle inverted ışık mikroskobu (Zeiss, Oberkochen, Germany) ile kontrol edildi. Bunu takiben hücrelerin bulunduğu flaskların içindeki besin ortamı vakum makinasına bağlı pipetle uzaklaştırıldı. Hücrelere 2 ml %0.25lik Tripsin/EDTA (Biochrom AG, Almanya) solüsyonu eklendi, solüsyonun tüm yüzeyi kaplanması sağlandı ve inkübatör de 3 dakika bekletildi. Bu sürenin sonunda flask yüzeylerinden ayrılan hücrelere 4 ml hücre ortamı eklenerek flask yıkandı ve içeriği 15 ml'lik falkonlara alındı. Hücreler 1500 rpm hızda 5 dk. santrifüj edildi(Eppendorf) (Hamburg,

Almanya). Çökelen hücrelerin üzerindeki hücre ortamı uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml taze hücre ortamı yeniden süspanse edildi. Kaldırılan hücre miktarı Thoma lamı (Marienfeld, Almanya) kullanılarak sayıldı. Hücreler, 1×10^6 hücre/ flask şeklinde üzerlerine 12 ml hücre ortamı eklenerek ekildi ve inkübatöre kaldırıldı.

3.6.2 Transient Gen İfadesi Susturulması

EPO'nun bilinen reseptörleri olan EPOR, EPHB4 ve CSF2RB 'yi hedef alan siRNA'lar (Silencer Select SiRNA, Thermo Scientific Fisher) (Waltham, MA USA) kullanıldı. Gen ifadesi susturma işlemi için transfeksiyon reaktifi olarak DharmaFECT transfeksiyon reaktifi 1 kullanıldı (GE Dharmacon) (Little Chalfont, United Kingdom). Hücrelerin transfeksiyonu için kullanılacak hücre miktarı ve transfeksiyon reaktif 1 miktarı; $0,3 \text{ cm}^2$ yüzey alanı için 2500 hücre ve $0,1 \mu\text{l}$ DharmaFECT transfeksiyon reaktifi 1 olarak optimize edildi. Hücreler belirlenmiş deney tipine uygun hücre kültür plaklarına bu optimizasyon baz alınarak (Tablo 1), penisilin-streptomisin içermeyen hücre ortamı ile ekildi.

Tablo 2. Plak tipine göre tranfeksiyon deneyi optimizasyonu

Plak Tipi	Hücre Sayısı/Kuyu	Dharmafect Transfeksiyon Etkeni (μl) /Kuyu
96 Kuyu	2500	0,1
24 kuyu	15000	2,5
6 kuyu	75000	2,9
T/25	210000	8,3

Hücreler %40-%80 oranında ekildikleri yüzeyi kapladıkları zaman ilgili siRNA ile transfekte edildi. Öncelikle transfeksiyon reaktifi 1, hedef olmayan havuzdaki siRNA'lar ve hedef siRNA'lar hedef konsantrasyon (50 nM) baz alınarak hiçbir destek içermeyen DMEM ile seyreltildi ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bunu takiben her siRNA ve hedef olmayan havuzdaki siRNA'lar 1:1 oranında transfeksiyon reaktifi 1 ile karıştırıldı ve 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde ilgili kültür kabı için önerilen deney ortamı hacmine penisilin-streptomisin ve FBS içermeyen DMEM'in transfeksiyon reaktifi-siRNA kompleksine eklenmesi ile ulaşıldı (Tablo 2). Bu karışım hücrelere eklenerek 24 saat süreyle inkübe edildi.

Tablo 3. Plak tipine göre transfeksiyon reaksiyonu karışım içeriği

İnkübasyon süresi (Dakika)	Plak tipi Malzeme	96 Kuyu (µl/Kuyu)	24 Kuyu (µl/Kuyu)	6 Kuyu (µl/Kuyu)	T25 Flask (µl/Flask)
5	Transfeksiyon Reaktifi 1	0,1	0,6	2,9	8,3
	DMEM	9,9	49,4	197,1	491,7
	1.Toplam	10	50	200	500
5	siRNA veya Non-Target Pool (50nm)	0,25	2,5	5	12,5
	DMEM	9,75	47,5	195	487,5
	2. Toplam	10	50	200	500
20	Ara toplam	20	100	400	1000
yok	DMEM + %1 L-glutamine	80	400	1600	4000
	Toplam Miktar	100	500	2000	5000

3.6.3 RNA İzolasyonu

Glioblastoma multiforme hücrelerinden RNA izolasyonu için TRIzol (Thermo Scientific Fisher) (Waltham, MA USA) kullanıldı. Hücreler öncelikle 6 kuyucuklu plaklara her kuyucuğa Tablo 1.'de belirtilen miktarda P/S içermeyen hücre ortamı ile ekildi. Hücreler %40-%80 oranında yüzeyi kapladıklarında transfeksiyon reaktifi 1 Tablo 2.'de belirtilen miktarlarda 6 kuyucuklu plak için 5X şeklinde hazırlandı. Hedef gen içermeyen siRNA

havuzu ve hedef siRNA'lar yine Tablo 2 temel alınarak 2X şeklinde hazırlandı. Her iki dilüsyon da oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Bunu takiben 200µl transfeksiyon reaktifi, 200 µl hedef içermeyen siRNA havuzu ve hedef siRNA'lar ile karıştırıldı. 20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İlgili kuyulara, kuyucuk başına 1600µl P/S ve FBS içermeyen DMEM ve 400 µl transfeksiyon reaktifi-siRNA kompleksi eklendi. Kontrol hücreleri içeren kuyu için 400 µl destek içermeyen DMEM kullanıldı. 24 saat süreyle inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon bitiminde 6 kuyucuklu plaktaki ortam uzaklaştırıldı. Kuyucuk başına 500 µl TRIzol kullanıldı. Fenol-Kloroform ile RNA izolasyon metodu uygulandı (Referans). Bu yöntem ile elde edilen RNA miktarı ve kalitesi Nanodrop (Thermo Scientific Fisher) (Waltham, MA USA) ile ölçüldü. İzole edilen RNA örnekleri DNase ve RNase içermeyen mikro santrifüj tüplerinde -80°C'de saklandı.

3.6.4 Real Time PCR yöntemi ile gen ekspresyonu tayini

Hücrelerden elde edilen RNA örneklerinden öncelikle komplementer DNA (Complementary DNA, cDNA) sentezi yapıldı. Bunun için RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Fisher) (Massachusetts, United States) kullanıldı. Her biri 2000ng olan RNA örneklerine 1 µl Random Primer eklendi. Her örnek nuclease free water (NFW) ile 12 µl'ye tamamlandı. 5 dakika 65°C'de inkübe edildikten sonra her örneğe Tablo 4.'te belirtilen miktarda diğer reaksiyon bileşenleri eklenerek, PCR cihazında 5 dakika 25°C, 30 dakika 42°C'de 5 dakika 70°C'de inkübe edildi. Reaksiyon sonrası örnekler -80 °C'de saklandı.

Tablo 4. cDNA sentezi için reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
5X Reaksiyon Buffer	4 µl
RiboLock RNAase Inhibitor	1 µl
10mM dNTP Mix	2 µl
RevertAid M-MuLV RT	1 µl
Toplam	8 µl

Hedef genler için kullanılan primerler NCBI Blast programı ile dizayn edildi. Primer dizileri Tablo 4'teki gibidir. EPOR, EPHB4 ve CSF2RB primerleri öncelikle kontrol örneği

ile DreamTaq DNA Polymerase (Thermo Scientific Fisher) (Waltham, MA USA) kullanılarak end point PCR (Tablo 5) ile her bir gen için istenilen amplicon bölgesini çoğaltıp çoğaltmadıkları kontrol edildi. Örnekler 95 °C de 1 dakika, 1 döngü initial denaturation için; 95° C 30 saniye denaturation, 60°C 30 saniye annealing, 72° C 1 dakika extension, 40 döngü ve 72 °C 10 dakika final extension için 1 döngü olacak şekilde PCR cihazında inkübe edildi. %1'lik agaroz jel döküldü. Her bir gen için elde edilen PCR ürünü jele yüklendi. Jel 120 V 'ta 2 saat yürütüldü. Jel görüntüsü ChemiDoc XRS+ (BioRad), (California, United States) görüntüleme cihazında çekildi.

Tablo 5. qPCR için gen primer dizini

Gen	Forward Primer (5'→3')	Tm (°C)	Amplicon Uzunluğu (baz çifti)
EPOR Forward Primer	ATCCTGACGCTCTCCCTCA T	60.11	134
EPOR Reverse Primer	AGGCCTTCAAACCTCGCTCT C	60.04	
EPHB4 Forward Primer	CGCAACCTACGAAGTGTGT GA	60.32	198
EPHB4 Reverse Primer	GTCCGCATCGCTCTCATAG TA	59.46	
CSF2RB Forward Primer	ATTCTACAAGCCCAGCCCA G	59.74	197
CSF2RB Reverse Primer	GGGCCATCTGGATGTTTAC T	59.74	

Tablo 6. DreamTaq end point PCR reaksiyon bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
10X DreamTaq Buffer	5 µl
dNTP Mix (10mM)	1µl
Forward Primer (10µM)	5µl
Reverse Primer (10µM)	5µl
Dream Taq Polymerase (5U/µl)	0,25µl
Template cDNA	3µl
Nuclease Free H ₂ O	30,75µl
Toplam	50 µl

Her bir gene ait primer verimliliği hesaplanması için elde edilen kontrol cDNA örneği 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 oranında seyreltilti. Her bir primer için tüm seyreltme konsantrasyonlarında GoTaq qPCR Master Mix (Promega) (Madison, Wisconsin, United States) ile Real time PCR reaksiyonu kuruldu. qPCR reaksiyonu için Tablo 6. 'daki maddelerden kullanarak reaksiyon karışımı hazırlandı. Elde edilen sonuçlar ile primerlere ait primer verimliliği analizi yapıldı.

Tablo 7. qPCR reaksiyonu bileşenleri

Reaksiyon Bileşeni	Miktar
2X GoTaq qPCR Master Mix	10 µl
Forward Primer (10µM)	0,8µl
Reverse Primer (10µM)	0,8µl
Template cDNA	2µl
Nuclease Free H ₂ O	6,4µl
Toplam	20 µl

Primerlerin validasyonundan sonra yine GoTaq qPCR Master Mix ile her gen için tüm örneklerden Tablo 6.'da belirtilen miktarlarda reaksiyon karışımı hazırlandı. Roche Lightcycler 480 (Roche) (Basel, İsviçre) cihazında analiz gerçekleştirildi. Normalizasyon

amacıyla housekeeping gen olarak GAPDH kullanıldı. Ekspresyon farklılığı delta delta Ct yöntemine göre analiz edildi (Referans).

3.6.5 Immunoblot

GBM hücrelerinde bilinen EPO metabolik yolağı ile ilişkili reseptörler olan; EPOR, CSF2RB, EPHB4'nın varlıkları bazal seviyede gösterildi. Hücreler Tablo 1.'de belirtilen miktarda T25 flasklarına ekildi. Tablo 2.'de belirtilen miktarlarda transfeksiyon karışımı hazırlanarak ekimi takip eden gün hücrelere verildi. GBM hücre hatlarında bazal seviyede ve ilgili siRNA(50nM) ile muamele edilmiş koşullarda hücrelerden total protein transfeksiyonun 24 saat sonra bitmesi ile RIPA buffer kullanılarak elde edildi. Elde edilen örneklerden 5µl ayrılarak her bir örneğin protein konsantrasyonu BCA (Thermo Scietific Fisher) (Waltham, MA USA) protein analiz yöntemi ile belirlendi. Her örnekten 25µg protein 5X Leammli buffer ile hazırlandı. Protein örnekleri EPOR için %10'luk; CSF2RB, EPHB4 için ise %6 'lık jel konsantrasyonlarında SDS-PAGE jel ile (120 V, 2 saat) ayrımlanıp poliviniliden diflorür (PVDF) membranına transfer (375mA, 2 saat) edildi. 1 saat, oda sıcaklığında, %5 süt tozu içeren TBS-T ile bloklama işleminden sonra; membranlar EPOR, CSF2RB, EPHB4 antikorları içeren aynı bloklama solüsyonu ile +4 °C'de 16 saat enkübe edildi. Her membran HRP ile işaretli sekonder antikor ile oda sıcaklığında 45 dakika enkübe edildi. İnkübasyon aralarında ve görüntüleme öncesinde membranlar %0,1'lik TBS-T ile protokolde belirtilen sürelerde yıkandı. Görüntüleme için SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate kiti (Thermo Scietific Fisher) (Waltham, MA USA) kullanıldı. Görüntü UVP jel dokümantasyon sisteminde elde edildi. Band yoğunlukları dansitometrik olarak Imaje J programı ile analiz edildi.

3.6.6 Proliferasyon Deneyleri

GBM hücreleri 96 kuyucuklu plaklara her bir kuyuya 7500 hücre olacak şekilde 200µl hacimde 4 farklı EPO konsantrasyonu ve kontrol hücre grupları için her grupta 6 kuyu olacak şekilde ekildi. Ekimi takip eden gün, Neorecormon 2000IU/300µl (Roche, Basel, Switzerland) kullanılarak seri dilüsyon yöntemi ile 0,1-1-10-100 IU/ml içeren DMEM hücre ortamı hazırlandı. Her gruba ait hücrelerin ortamları uzaklaştırıldı ve ilgili konsantrasyondaki EPO içeren ortam verildi. 72 saat inkübasyona bırakıldı. 72 saat sonra 100 µl supernatant kuyulardan uzaklaştırıldı ve her kuyuya 10 µl Presto Blue (Thermo Scietific Fisher) (Waltham, MA USA) eklenildi. 2 saat inkübasyona bırakıldı. 2 saat sonunda plak Multiskan

GO (Thermo Scientific Fisher) (Waltham, MA USA) mikropate spektrofotometre ölçüm cihazı ile 570nm hedef dalga boyu, 600nm referans dalga boyunda okutuldu.

Hücreler aynı hücre miktarında sadece 1IU/ml EPO dozu için 3 farklı zaman noktasında (24-48-72 saat) ölçüm almak için kontrol ve 1IU/ml dozu olmak üzere 2 grup ve her grup 6 kuyu olacak şekilde 3 farklı plağa tekrar ekildi. 24 saat sonra 1IU/ml EPO içeren DMEM hücre ortamı ile hazırlandı. Her bir plakta ilgili kuyulara daha evvel belirtildiği şekilde uygulandı. 24, 48 ve 72 saatlerde Presto Blue ile yukarıda belirtildiği şekilde muamele edilip, ölçüm alındı.

1 IU/ml EPO 'nun proliferasyona etkisi 3 farklı zaman noktası için BrdU Cell Proliferation Chemiluminescent Kiti (Cell Signalling Technology, Danvers, MA, USA) ile de gösterildi. GBM hücreleri 96 well siyah plağa (Greiner Bio-one) (Kremsmünster, Avusturya) 3 grup ve her grupta 6 kuyu olacak şekilde 7500 hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. 24 saat sonra kontrol ve 1IU/ml gruplarına daha evvel belirtildiği şekilde hücre ortamı ve hazırlanmış 1IU/ml EPO içeren hücre ortamı verildi. Her zaman noktasına ait deneyin bitiminden 16 saat önce 2µl 100X BrdU, BrdU içeren kontrol ve 1IU/ml EPO ile muamele edilmiş gruplara eklendi. BrdU içermeyen kontrol grubuna aynı miktarda hücre ortamı eklendi. Deney bitiminde hücrelerin ortamı uzaklaştırılıp her kuyuya 100 µl 1X fiksasyonu solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında 30 dakika inkübasyona bırakıldı. 30 dakika sonunda fiksasyon solüsyonu uzaklaştırıldı ve her kuyuya hazırlanmış 1X detection antibody solüsyonu ile 100µl olarak eklendi, 1 saat oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Inkübasyon sonunda her kuyu 100 µl 1X wash buffer ile 3 defa yıkandı. 1X HRP-conjugated secondary antibody solüsyonu 100 µl/kuyu olacak şekilde oda sıcaklığında 30 dakika uygulandı. Her kuyu tekrar 100 µl 1X wash buffer ile 3 defa yıkandı. Luminol/Enhancer solüsyonu ile Stable Peroxide solüsyonu 1:1 karıştırılarak çalışma solüsyonu hazırlandı. 100 µl/kuyu olacak şekilde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Inkübasyon sonunda Centro LB 960 mikropate luminometer (Berthold Technologies, Switzerland) ölçüm alındı.

3.6.7 Boşluk Kapama Migrasyon Deneyi

Glioblastoma Multiforme hücreleri migrasyon deneyi için Tablo 1.'de belirtilen miktarlarda 24 kuyucuklu plaklara kontrol, hedef olmayan siRNA havuzu ve hedef siRNA'lar için ekilmiştir. Transfeksiyon işlemi bittikten sonra her grubun ortamı, 500µl %10 FBS ve %1 L-glutamine/Penisilin-streptomisin içeren DMEM medium ile değiştirildi ve hücreler 24 saat yenilenmeye bırakıldı. 4. Gün her kuyucukta 1 ml'lik mavi tip ucu ile +işareti çizildi. Hür

gruptaki 2 kuyucuğun mediumları sırasıyla, 500µl %10 FBS ve %1 L-glutamine/Penisilin-streptomisin içeren DMEM medium ve 1IU/ml rHUEPO içeren 500µl %10 FBS ve %1 L-glutamine/Penisilin-streptomisin içeren DMEM medium ile değiştirildi. Her kuyunun sıfıncı zaman görüntüleri kameralı inverted mikroskopta 4X'te çekildi. Fotoğraf çekimi 24 ve 48 'inci saatlerde de tekrarlandı. Tüm kuyulardan her zaman noktasında 5 fotoğraf çekildi. Görüntüler, Imaje J programı ile yara kapama analizi (wound healing analysis) eklentisi ile analiz edildi.

3.6.8 Invazyon Deneyi

Glibolastoma Multiforme hücreleri invazyon deneyi için Tablo 1.'de belirtilen miktarda 6 kuyucuklu plaklara kontrol, hedef olmayan siRNA havuzu ve hedef siRNAlar için daha evvel belirtilen şekilde ekildi. 24 saat sonra her kuyu için Tablo 2.'de 6 kuyucuklu plak için belirtilen transfeksiyon karışımı hazırlandı ve ilgili kuyulara eklendi. Transfeksiyon işlemi bitiminde her kuyudaki hücreler %0,025'lik tripsin-EDTA ile kaldırıldı, sayıldı. Bu arada invazyon deneyi için 24 kuyucuklu plak hazırlandı. Her örnek için 2 insert 24 kuyucuklu plağa yerleştirildi. Insertler matrigel ile kaplandı ve 2 saat süreyle 37°C inkübe edildi. 2 saatin sonunda her bir insertin altına kemoatraktant olarak %10 FBS içeren media kondu. Her bir inserte ise ilgili örneklerden 20.000 hücre /insert olacak şekilde 1 IU/ml EPO içeren ya da içermeyen %1 FBS'li media ile hücre ekildi. 24 saat sonunda her bir insert sırasıyla fiksasyon, eozin, hematoksilin ile 1' muamele edildi. Tüm kuyulardan 5 fotoğraf çekildi. Görüntüler faz-kontrast çevrik mikroskop (CKX41, Olympus) ile fotoğraflandı ve her kuyudaki hücre sayısı Imaje J programı ile sayılıp, analiz edildi.

3.7 Araştırma Planı ve Takvimi

Araştırılma planı Şekil 5.'de gösterildiği gibidir.



Şekil 5: Araştırma Planı Zaman Çizelgesi

3.8 Verilerin Değerlendirilmesi

Araştırma sonuçlarının istatistik analizi, GraphPad Prism istatistik programının 6.0 versiyonu kullanılarak yapıldı. Veriler ortalama $\pm$ standart hata biçiminde verilmektedir. Gruplar arası karşılaştırmalarda Mann Whitney U testi kullanıldı. Tüm değerlendirmelerde $p < 0,05$ anlamlılık düzeyi olarak belirlenmiştir.

3.9 Araştırmanın Sınırlılıkları

Araştırma in vitro deneylere dayandığı için; bulunan verilerin in vivo olarak da gösterilerek sonuçların konfirme edilmesi gerekmektedir. Hipotezimizin geçerliliğini artıracak in vivo deneylerin eksikliği bu araştırmadaki sınırlılıktır.

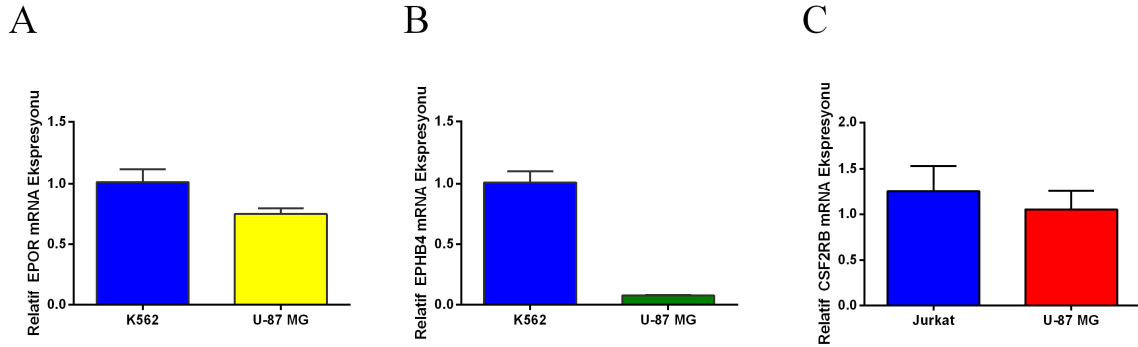
3.10 Etik Kurul Onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu 22.12.2016 tarih ve 2016/32-26 no.lu kararında; 3035-GOA protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

4 BULGULAR

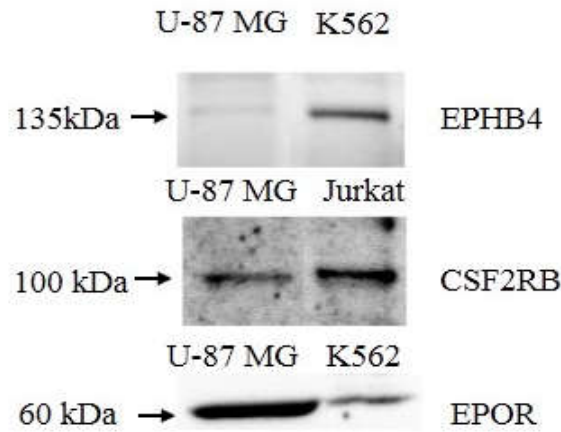
4.1 U-87 MG Hücre Hattında EPO Reseptörlerinin Varlığının mRNA ve Protein seviyesinde gösterilmesi

U-87 MG hücre hattında var olan EPO reseptörleri; EPOR, EPHB4, CSF2RB bazal seviyede hem mRNA (Şekil 6) hem de protein (Şekil 7) seviyesinde gösterilmiştir. Kronik miyeloid lösemi hücre hattı K562, EPOR ve EPHB4 için; insan immortalize edilmiş T lenfosit hücre hattı JURKAT ise CSF2RB için pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



Şekil 6: EPO Reseptörlerinin U-87 MG Hücre Hattında Varlıklarının mRNA Seviyesinde Gösterilmesi.

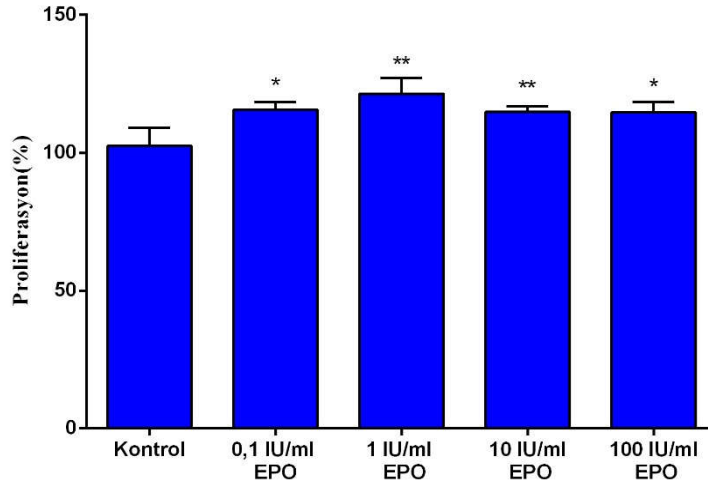
K562 ve Jurkat pozitif kontrol (A) EPOR, (B) EPHB4 ve (C) CSF2RB mRNA seviyesinde gösterilmesi.



Şekil 7: EPO reseptörlerinin U-87 MG Hücre Hattında Varlıklarının Protein Seviyesinde Gösterilmesi

4.2 rHuEPO ‘nun U-87 MG Hücrelerinde Proliferasyona Etkisinin Gösterilmesi

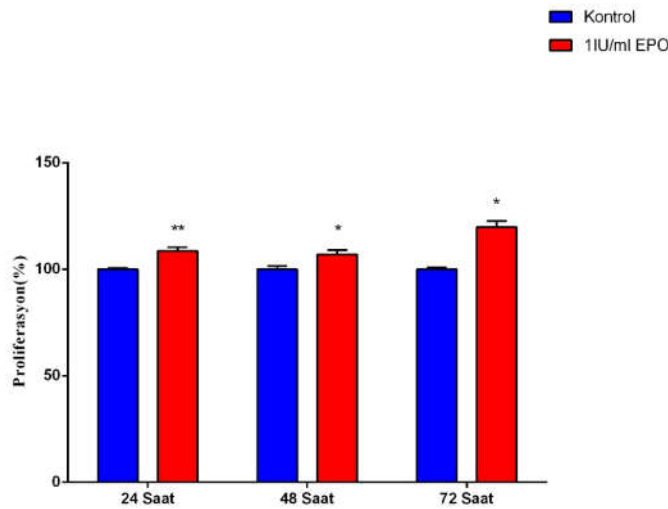
U-87 MG hücrelerinde rHuEPO’nun etkisini gösterdiği dozu bulmak için, hücreler önce 0,1-1-10 ve 100 IU/ml rHuEpo ile 72 saat muamele edilmiştir (Şekil 8). U-87 MG hücrelerinde IU/ml EPO’nun proliferasyonu anlamlı olarak artırdığına karar verilmiştir.



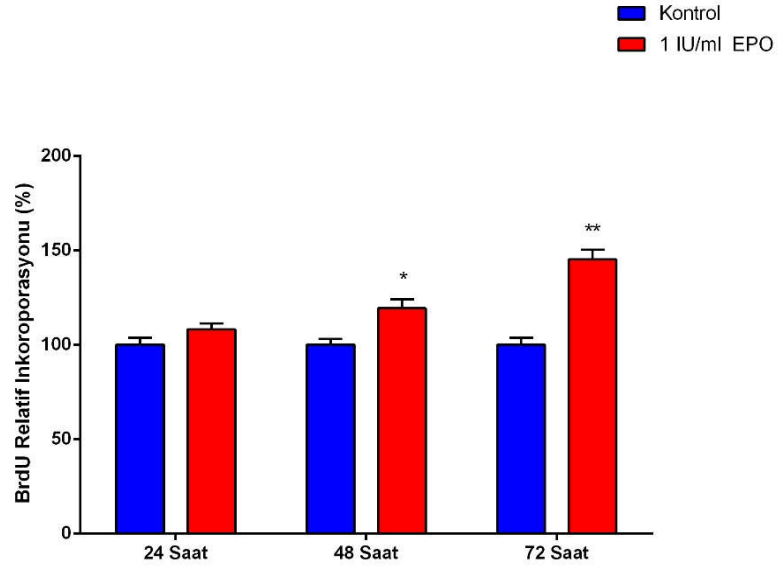
Şekil 8: U-87 MG hücre hattında EPO’nun 72 saatte proliferasyona etkisinin gösterilmesi.

Mann Whitney U testi *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ anlamlı değeri ile işaretlenmiştir.

Bu dozun 24-48-72 saatteki etkileri hem Presto Blue (Şekil 9) hem de BrdU inkorporasyon deneyi (Şekil 10) ile gösterilmiştir. rHuEPO’nun bu hücre hattındaki etkilerini incelemek için 1 IU/ml olarak uygulanmasına bu sonuçlar doğrultusunda karar verilmiştir.



Şekil 9: 1 IU/ml EPO’nun 3 zaman noktasında proliferasyona etkisinin Presto Blue ile gösterilmesiMann Whitney U testi *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ anlamlı değeri ile işaretlenmiştir.

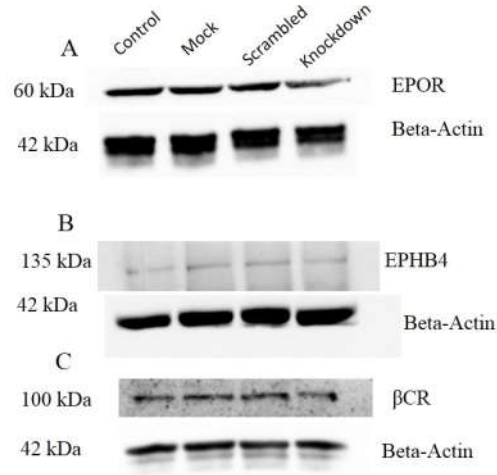


Şekil 10: 1 IU/ml EPO'nun 3 zaman noktasında proliferasyona etkisinin BrdU proliferasyon deneyi ile gösterilmesi

Mann Whitney U testi *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ anlamlı değeri ile işaretlenmiştir.

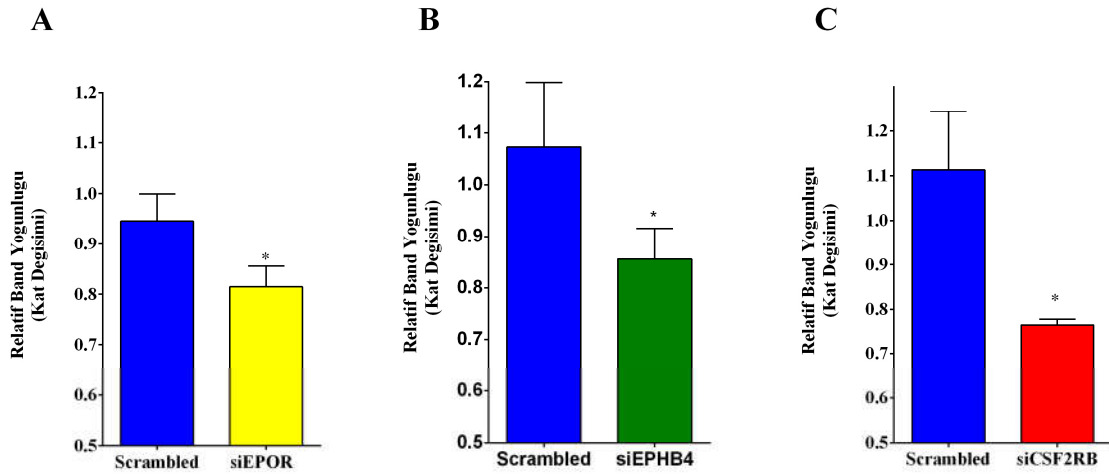
4.3 Reseptör Gen İfadelerinin Susturulması

EPO reseptörlerinin; EPOR, EPHB4 ve CSF2RB ifadelerinin kullanılan siRNA'larla susturulması protein seviyesinde representatif (Şekil 11) ve istatistiksel olarak (Şekil 12) gösterilmiştir. Her protein 24 saatlik knockdown ile anlamlı şekilde protein seviyesinde indirgenmiştir.



Şekil 11: EPO reseptörlerinin ifadelerinin siRNA ile susturulması.

(A) EPOR, (B) EPHB4 ve (C) CSF2RB representatif olarak gösterilmesi.



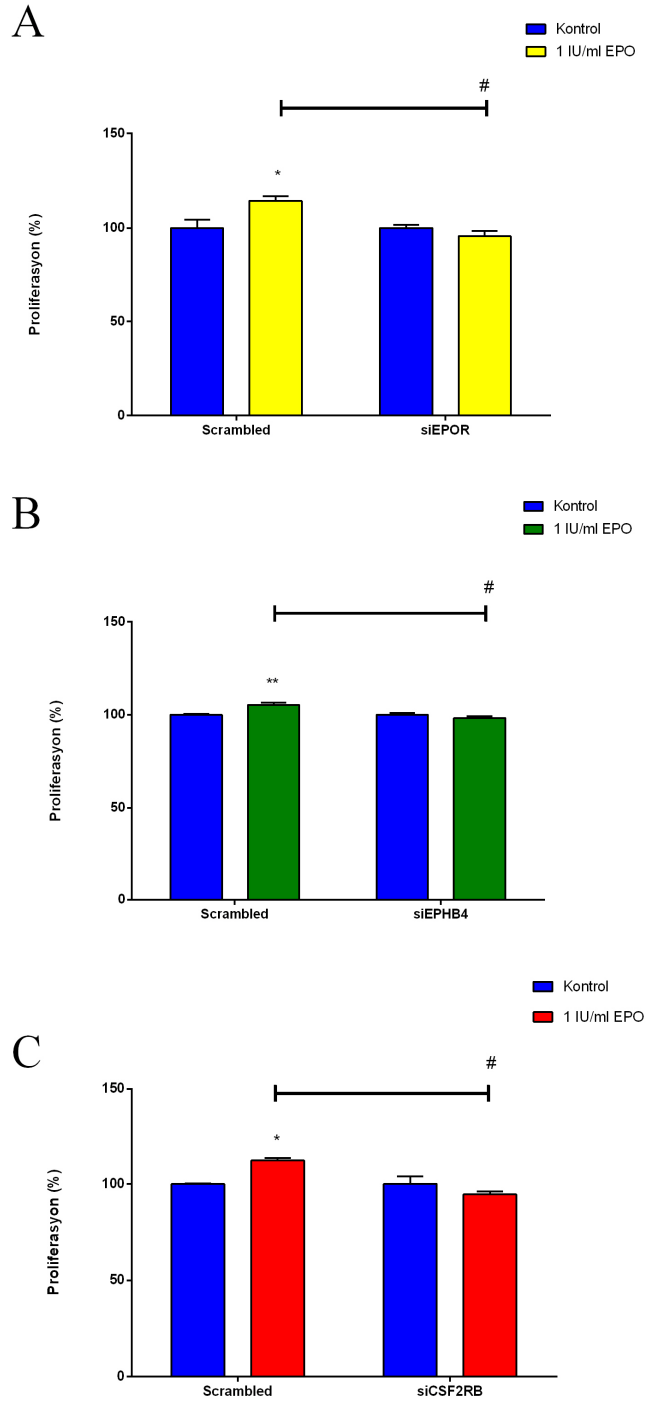
Şekil 12: EPO reseptörlerinin ifadelerinin siRNA ile susturulması kantitatif olarak gösterilmesi

U-87 MG hücre hattı 24 saat süreyle ilgili siRNA ile muamele edilmiştir. (A) EPOR, (B) EPHB4 ve (C) CSF2RB kantitatif gösterilmesi.

Mann Whitney U testi *, $p \leq 0.05$ değeri ile işaretlenmiştir.

4.4 Reseptör Susturmalarının Proliferasyona etkisi

rHuEPO'nun proliferasyona etkisini hangi reseptörler (homodimer ya da heterodimerler olarak) aracılığı ile gerçekleştirdiği; her reseptörün tek başına knock down edildiği koşullarda Presto Blue deneyi ile gösterilmiştir (Şekil 13).



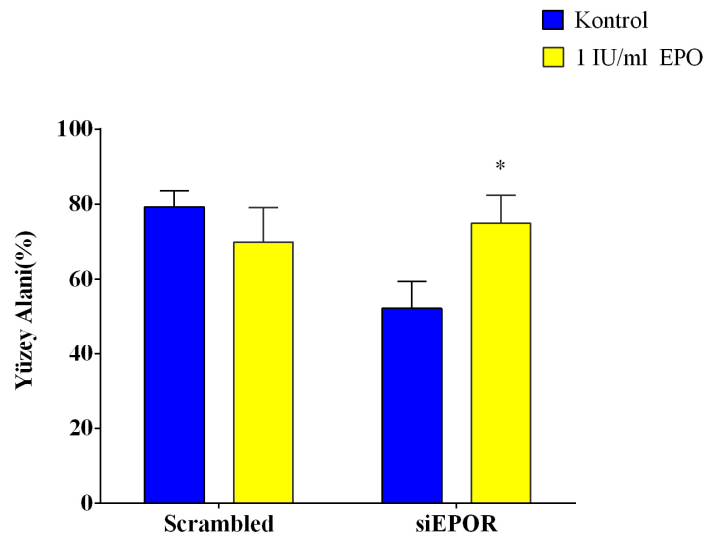
Şekil 13: EPO reseptörlerinin U-87 MG Hücrelerinde Proliferasyona Etkisinin Gösterilmesi

1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde etkisi (A)EPOR, (B)EPHB4 ve (C)CSF2RB siRNA ile muamele edildikten sonra 72 saat uygulanarak gösterilmiştir. Mann Whitney U testi *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ anlamlı değeri ile işaretlenmiştir.

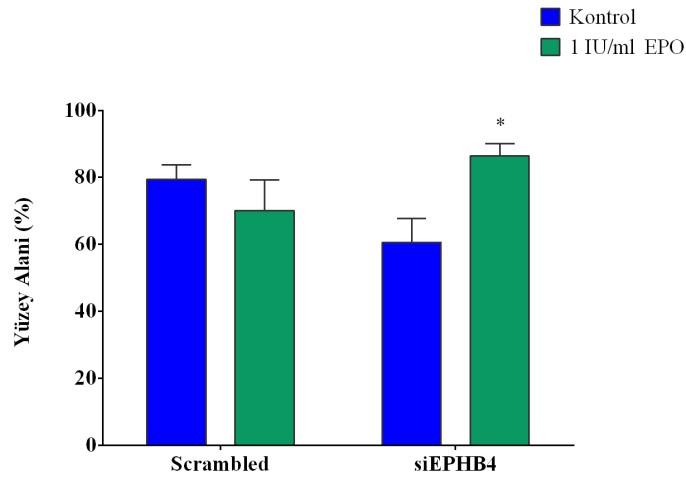
4.5 Reseptör Susturmalarının Migrasyona Etkisi

1 IU/ml rHuEPO'nun U-87 MG hücrelerinde migrasyonuna etkisi ve rHuEpo'nun migrasyona olan etkisini hangi reseptör/reseptörler üzerinden gerçekleştirildiği ise her reseptörün tek başına susturulduğu deney düzeneklerinde gösterilmiştir (Şekil 14).

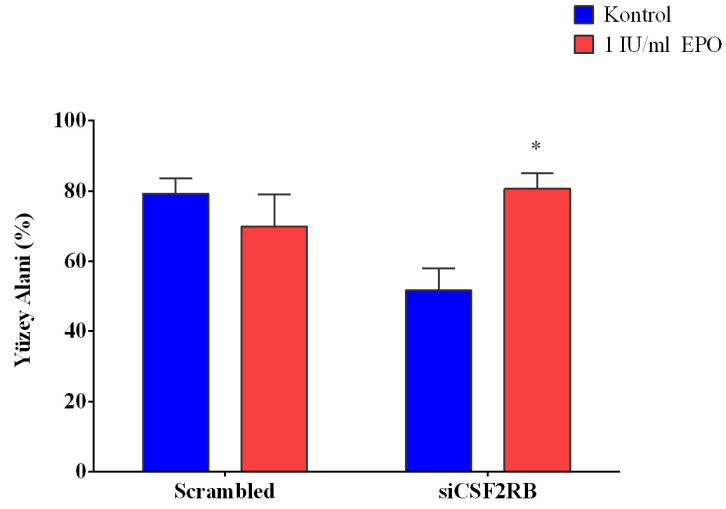
A



B



C



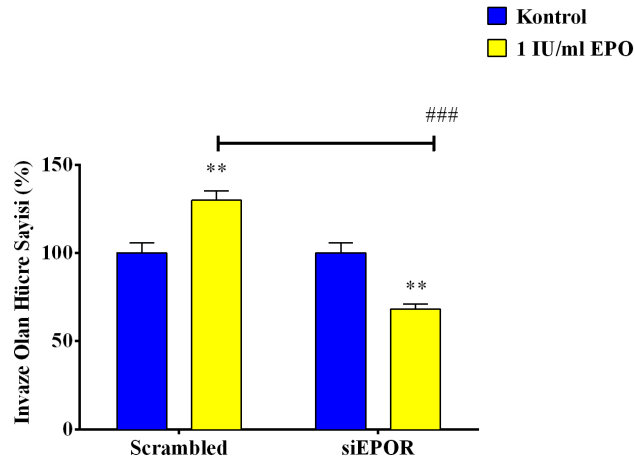
Şekil 14: 1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde invazyona etkisi ve EPO reseptörlerinin migrasyona etkisinin gösterilmesi.

1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde etkisi (A)EPOR, (B)EPHB4 ve (C)CSF2RB siRNA ile muamele edildikten sonra 24 saat uygulanarak gösterilmiştir. Mann Whitney U testi *, $p \leq 0.05$ anlamlı değeri ile işaretlenmiştir.

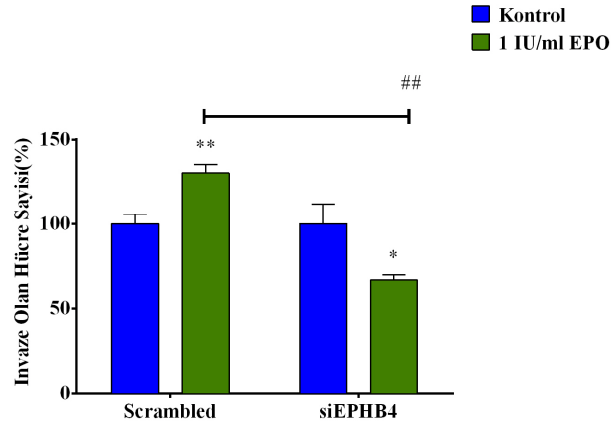
4.6 Reseptör Susturmalarının İnvazyona Etkisi

Son olarak EPO reseptörlerinin her birinin tek başına susturulduğu koşullarda, rHuEpo'nun U-87 MG hücrelerindeki invazif etkisindeki değişim gösterildi (Şekil 15). Şekil 16'da da bu değişim representatif olarak gösterilmiştir.

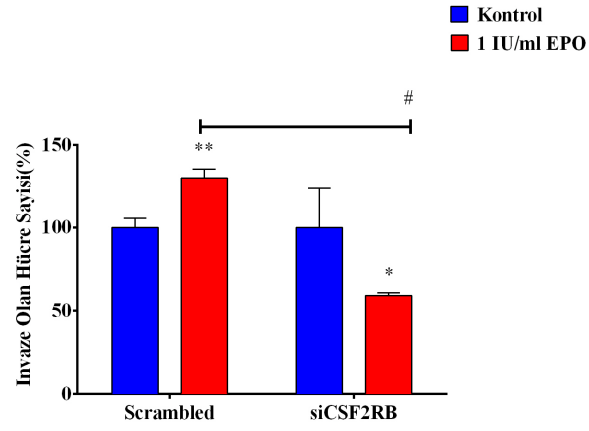
A



B

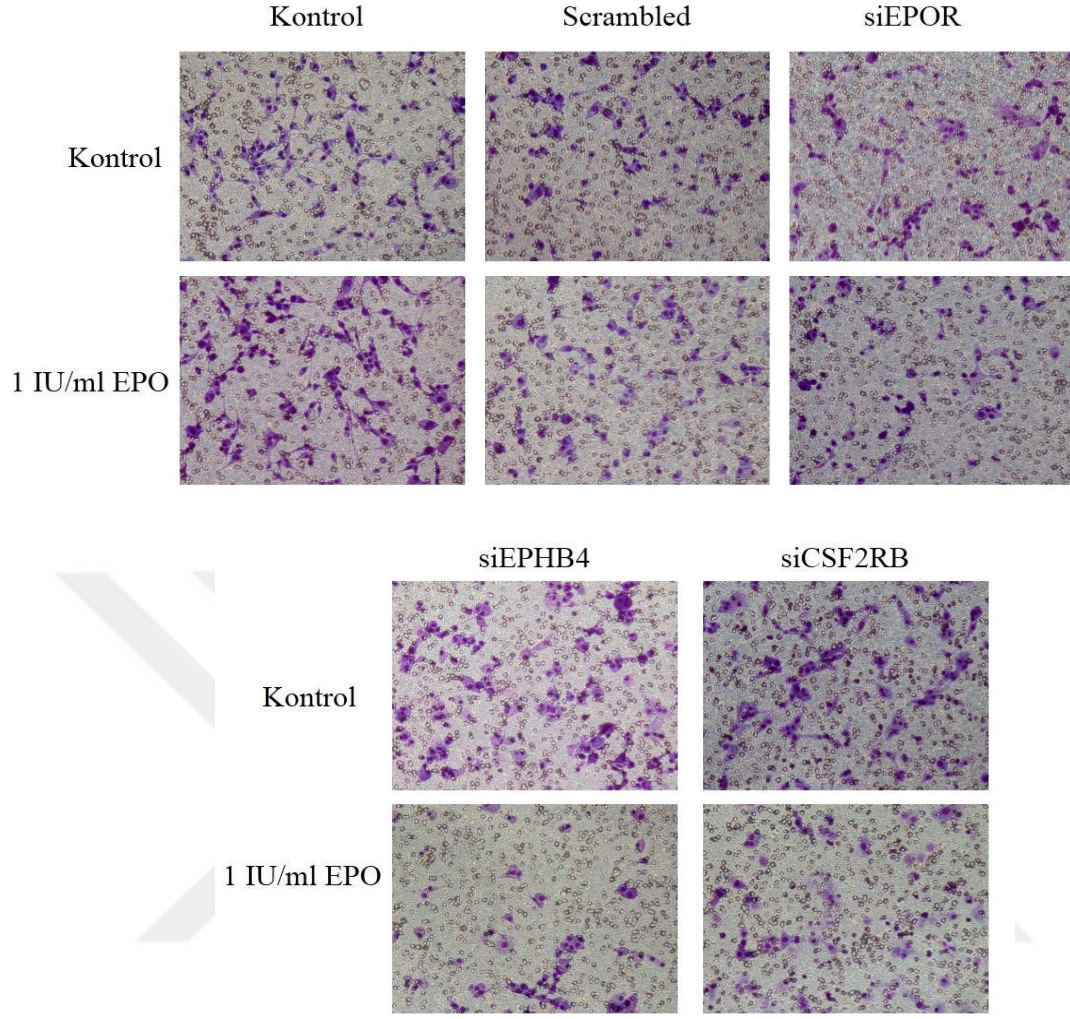


C



Şekil 15: 1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde invazyona etkisi ve EPO reseptörlerinin invazyona etkisinin gösterilmesi

1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde etkisi (A)EPOR, (B)EPHB4 ve (C)CSF2RB siRNA ile muamele edildikten sonra 24 saat uygulanarak gösterilmiştir. Mann Whitney U testi *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$ anlamlı değeri ile işaretlenmiştir.



Şekil 16: 1 IU/ml EPO'nun U-87 MG hücrelerinde invazyona etkisi ve EPO reseptörlerinin invazyona etkisinin representatif gösterilmesi

5 TARTIŞMA

Bu çalışmamızda in vitro olarak GBM hücrelerinin fonksiyonel EPOR, EPHB4 ve β CR reseptörlerinin sentezlediğini ve her birinin rHuEPO'nun glioma hücrelerinin proliferasyonuna ve invazyonuna katkı sağladığını ancak migrasyonunu anlamlı olarak artırmadığını gösteriyoruz.

CIA ve CRA hastalarında rHuEPO'nun kullanımının hasta yaşam kalitesini artırdığına dair çalışmalar bulunsun da kanser tedavisi görmeyen ya da farklı adjuvan tedaviler uygulanan hastalarda rHuEPO'nun uygulanmasına dair çekinceler bulunmaktadır. GBM hücrelerinde EPOR'un varlığı, U-87 MG hücre hattı dahil, GBM hücre hatlarında mRNA¹⁰⁹ ve protein^{108; 109; 114} seviyesinde ve ayrıca hasta dokularında¹¹³ immün doku boyama ile bazal seviyede gösterilmiştir. Her hücre hattında ve her hasta dokusunda aynı miktarda veya yüksek miktarlarda olmasa da EPOR ifadesi genel olarak GBM hücrelerinde doğrulanmıştır. GBM hücrelerinde rHuEPO'un (0,1-2-10-100 IU/ml) proliferasyona Yin ve ark.'ları tarafından gösterilmiştir.¹⁰⁹ Peres ve ark.'ları da rHuEPO'nun (10 IU/ml) endojen olarak sentezlenen EPO ifadesi susturulsa dahi proliferasyonu artırdığını ve bunu EPOR bağımlı olarak gerçekleştirdiğini göstermişlerdir.¹¹⁴ Bununla beraber; Hassouna ve ark. U-87 MG dahil olmak üzere 4 farklı hücre hattında rHuEPO'nun (0,3 IU/ml) migrasyona anlamlı bir etkisini olmadığını gösteren sonuçları bulunmaktadır.¹¹⁰ Migrasyona etkisi olmadığı öne sürülen rHuEPO'nun, U-251 MG ve U-373 MG hücre hatlarında (200 IU/ml) invazyonu artırdığı Mohyeldin ve ark.'ları tarafından gösterilmiştir.¹⁰⁸ Biz çalışmamız da literatür ile uyumlu olarak rHuEPO'nun U-87 MG hücre hattında anlamlı olarak proliferasyonu artırdığını göstermekteyiz. Bununla beraber EPO bağımlı EPOR dimerizasyonu ile aktive olan klasik EPO metabolik sinyal yolağının glioma hücrelerindeki proliferasyona etkisini araştırmak için transient bir şekilde EPOR ifadesini susturduk. Bunun EPO uygulanmış EPOR knockdown hücrelerdeki proliferasyonu anlamlı olarak azalttığını gösterdik. Bununla birlikte rHuEPO'nun glioma hücrelerinde migrasyonu anlamlı olarak artırmadığını ancak EPOR knockdown edilen koşullarda EPO uygulamasının migrasyonu anlamlı olarak artırdığını gösterdik. Çalışmalarımızdaki hücre hattı, kullanılan rHuEPO dozu ve buna bağlı olarak invazyon miktarındaki farklılıklar olmakla beraber, Mohyeldin ve ark. ile uyumlu olarak rHuEPO'nun U-87 MG hücrelerinde invazyonu anlamlı olarak artırdığını gösterdik. Yine bu etkinin EPOR bağımlı olduğunu, EPOR knockdown hücrelerinin rHuEPO'ya karşı verdiklerini invazyon yanıtındaki anlamlı azalmayla gösterdik.

EPHB4 reseptörü' nün, Efrin B2 ligandı ile birlikte ifadesinin embriyonik gelişim süresince atar ve toplar damarlara spesifik sentezlendiğini ve özellikle angiogenesis ile ilişkili olduğu gösterilmiştir.⁷⁸ EPHB4'ün ifadesinin kanser hücrelerinde genel olarak arttığını ve artış miktarının kanser progresyonu ile pozitif korelasyonunu gösteren çalışmalar bulunmaktadır. Bununla beraber EPHB4'ün tümör prognozunu efrinB2 ligandı bağımsız sinyal yolları tarafından gerçekleştirildiği önerilmiştir.

EPHB4'ün eritropoesiz de görev aldığı bilinmektedir.⁶⁴ Tümör ve EPO/EPOR bağlamında EPHB4 potansiyel EPOR partneri olarak ilk defa göğüs kanseri hücre hattı panelinde incelenmiştir. EPHB4 ekspresyonun tüm göğüs kanseri hücre hatlarında var oluşu ve EPOR ifadesi ile pozitif korelasyon göstermesi sonucu EPOR sinyal yolağında görev aldığı öne sürülmüştür. Pradeep ve ark. ları rHuEPO'nun EPOR bağımsız olarak EPHB4 reseptörü ve STAT3 aracılığı ile tümör büyümesini ve progresyonunu artırdığını göstermişlerdir.

EPHB4 ve EfrinB2 glioma ilişkisi, farklı evrelere ait glioma dokularında immün doku boyaması ile gösterilmiş; artan evre ile doğru orantılı olarak artan EPHB4 ve efrinB2 ligandı ekspresyonu bulunmuştur, Buna ek olarak EPHB4/Efrin B2 miktarındaki birlikte görülen artış ile stabil seyir gösteren hasta miktarında azalış olduğu belirtilmiştir. Glioma hücrelerinde EPHB4 ifadesinde artışın in vitro ve in vivo olarak proliferasyonu artırdığı ve daha invazif bir fenotipi indüklediği gösterilmiştir. Ayrıca EPHB4'ün miktarındaki artışın STAT3 ve ERK fosforilasyonu artırdığı ve EGFR miktarında da artışa sebep olduğu gösterilmiştir.

Bu çalışmada rHuEPO 'nun tümör prognozuna etkilerinin EPHB4 varlığı ile de gerçekleşebileceği hipotezine dayanarak; EPHB4'ün ifadesinin susturulduğu koşullarda U-87 MG hücrelerinin rHuEPO' ya bağlı proliferasyona, migrasyona ve invazyona olan cevabını araştırdık. EPHB4'ün diğer 2 reseptöre nazaran proliferasyona etkisinin daha az olduğu, ancak U-87 MG hücrelerinin rHuEPO bağımlı invazyonuna doğrudan aracılık ettiğini gösterdik.

Beta ortak reseptörünün EPOR ile oluşturduğu düşünülen reseptör dimerleri ile endojen ya da ekzojen rHuEPO'nun doku koruyucu etkilerinin gösterilmesinde rol aldığı önerilmiştir. EPOR ile beraber kanser de varlığı ilk defa Debeljak ve ark.ları tarafından sorgulanmıştır. Göğüs kanseri hücrelerinden oluşan bir hücre hattında panelinde CSF2RB

ifadesinin az miktarda olduğu ve EPOR ile negatif korelasyon gösterdiği belirtilmiştir. EPOR ile negatif korelasyon göstermesi ise de CSF2RB ve EPOR oluşturduğu önerilen doku koruyucu reseptör komplekslerinin en azından incelenen hücre hatlarında oluşup oluşmadığına dair soru işaretleri yaratmıştır.

Literatür de CSF2RB ‘nin GBM hücre hatlarında ya da hastalarında varlığını araştıran bir çalışma bulunmamaktadır. Bununla beraber biz CSF2RB ‘nin glioma hücrelerinde varlığını ve ötesinde beta ortak reseptörünün ekzojen olarak verilen rHuEPO bağımlı olarak bu hücrelerde proliferasyona ve invazyona etkisini göstermiş bulunuyoruz.



6 SONUÇLAR VE ÖNERİLER

Potansiyel olarak endojen ya da ekzojen EPO ile aktive olduğu düşünülen EPHB4 ve CSF2RB ve klasik EPOR reseptörü çalıştığımız GBM hücre hattında bulunmaktadır. Her 3 reseptörün de rHuEPO'nun proliferasyon ve invazyona etkisini belirli derecelerde etkilediği gösterilmiştir. Literatürdeki GBM ve rHuEPO arasındaki ilişkiyi inceleyen in vitro ve in vivo çalışmalar ile beraber GBM hasta dokularında yapılan çalışmalarda EPO/EPOR ve hastalıksız sağ kalım korelasyon çalışmaları göz önünde bulundurulduğunda; bizim de çalışmamızla beraber, rHuEPO'nun GBM hastalarında CIA ya da CRA kullanılmasının dikkatli gerçekleşmesini gerektiğini önermekteyiz. Bundan sonraki çalışmalarda, öncelikle reseptör spesifik bloklayıcı antikorlar kullanılarak yine reseptörlerin proliferasyona, migrasyona ve invazyona etkilerinin tekrar konfirme edilmesi gerektiğini düşünüyoruz. Bununla birlikte rHuEPO ile ilişkili bu 3 reseptörün tümör progresyonuna etkisinin hangi reseptör ikilileri aracılığı ile hangi sinyal yolları ile gerçekleştiğinin daha detaylı olarak incelenmesi gerektiğini düşünüyoruz.

7 KAYNAKLAR

1. Debeljak, N., Solar, P., and Sytkowski, A.J. (2014). Erythropoietin and cancer: the unintended consequences of anemia correction. *Frontiers in immunology* 5, 563.
2. Erslev, A. (1953). Humoral regulation of red cell production. *Blood* 8, 349-357.
3. Miyake, T., Kung, C.K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J Biol Chem* 252, 5558-5564.
4. Lin, F.K., Suggs, S., Lin, C.H., Browne, J.K., Smalling, R., Egrie, J.C., Chen, K.K., Fox, G.M., Martin, F., Stabinsky, Z., et al. (1985). Cloning and expression of the human erythropoietin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82, 7580-7584.
5. Bonora, M., Wieckowski, M.R., Chinopoulos, C., Kepp, O., Kroemer, G., Galluzzi, L., and Pinton, P. (2015). Molecular mechanisms of cell death: central implication of ATP synthase in mitochondrial permeability transition. *Oncogene* 34, 1608.
6. Eschbach, J.W., Egrie, J.C., Downing, M.R., Browne, J.K., and Adamson, J.W. (1987). Correction of the anemia of end-stage renal disease with recombinant human erythropoietin. Results of a combined phase I and II clinical trial. *The New England journal of medicine* 316, 73-78.
7. Glaspy, J., Bukowski, R., Steinberg, D., Taylor, C., Tchekmedyian, S., and Vadhan-Raj, S. (1997). Impact of therapy with epoetin alfa on clinical outcomes in patients with nonmyeloid malignancies during cancer chemotherapy in community oncology practice. Procrit Study Group. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 15, 1218-1234.
8. Malyszko, J., Zbroch, E., Malyszko, J., Mysliwiec, M., and Iaina, A. (2010). The cardio-renal-anaemia syndrome predicts survival in peritoneally dialyzed patients. *Archives of medical science : AMS* 6, 539-544.
9. Kowalczyk, M., Banach, M., and Rysz, J. (2011). Ferumoxytol: a new era of iron deficiency anemia treatment for patients with chronic kidney disease. *Journal of nephrology* 24, 717-722.
10. Elshamaa, M.F., Sabry, S., Mokhtar, I., El-Saaïd, G.S., Raafat, M., and Abd-El Haleem, D.A. (2010). Aluminium and lead abnormalities in children on haemodialysis: relationship with some medications. *Archives of medical science : AMS* 6, 420-429.
11. Druke, T.B., Locatelli, F., Clyne, N., Eckardt, K.U., Macdougall, I.C., Tsakiris, D., Burger, H.U., Scherhag, A., and Investigators, C. (2006). Normalization of hemoglobin level in patients with chronic kidney disease and anemia. *The New England journal of medicine* 355, 2071-2084.
12. Jelkmann, W. (1992). Erythropoietin: structure, control of production, and function. *Physiological reviews* 72, 449-489.
13. Kowalczyk, M., Banach, M., Mikhailidis, D.P., and Rysz, J. (2011). Erythropoietin update 2011. *Medical science monitor : international medical journal of experimental and clinical research* 17, RA240-247.
14. Tanner, H., Moschovitis, G., Kuster, G.M., Hullin, R., Pfiiffner, D., Hess, O.M., and Mohacsi, P. (2002). The prevalence of anemia in chronic heart failure. *International journal of cardiology* 86, 115-121.
15. Tang, Y.D., and Katz, S.D. (2006). Anemia in chronic heart failure: prevalence, etiology, clinical correlates, and treatment options. *Circulation* 113, 2454-2461.
16. Ezekowitz, J.A., McAlister, F.A., and Armstrong, P.W. (2003). Anemia is common in heart failure and is associated with poor outcomes: insights from a cohort of 12 065 patients with new-onset heart failure. *Circulation* 107, 223-225.

17. Anand, I., McMurray, J.J., Whitmore, J., Warren, M., Pham, A., McCamish, M.A., and Burton, P.B. (2004). Anemia and its relationship to clinical outcome in heart failure. *Circulation* 110, 149-154.
18. Ngo, K., Kotecha, D., Walters, J.A., Manzano, L., Palazzuoli, A., van Veldhuisen, D.J., and Flather, M. (2010). Erythropoiesis-stimulating agents for anaemia in chronic heart failure patients. *The Cochrane database of systematic reviews*, CD007613.
19. Lawler, P.R., Filion, K.B., and Eisenberg, M.J. (2010). Correcting anemia in heart failure: the efficacy and safety of erythropoiesis-stimulating agents. *Journal of cardiac failure* 16, 649-658.
20. Westenfelder, C. (2002). Unexpected renal actions of erythropoietin. *Experimental nephrology* 10, 294-298.
21. Bernhardt, W.M., and Eckardt, K.U. (2008). Physiological basis for the use of erythropoietin in critically ill patients at risk for acute kidney injury. *Curr Opin Crit Care* 14, 621-626.
22. Endre, Z.H., Walker, R.J., Pickering, J.W., Shaw, G.M., Frampton, C.M., Henderson, S.J., Hutchison, R., Mehrrens, J.E., Robinson, J.M., Schollum, J.B., et al. (2010). Early intervention with erythropoietin does not affect the outcome of acute kidney injury (the EARLYARF trial). *Kidney international* 77, 1020-1030.
23. Gouva, C., Nikolopoulos, P., Ioannidis, J.P., and Siamopoulos, K.C. (2004). Treating anemia early in renal failure patients slows the decline of renal function: a randomized controlled trial. *Kidney Int* 66, 753-760.
24. Jelkmann, W. (2011). Regulation of erythropoietin production. *J Physiol* 589, 1251-1258.
25. Hardee, M.E., Arcasoy, M.O., Blackwell, K.L., Kirkpatrick, J.P., and Dewhirst, M.W. (2006). Erythropoietin biology in cancer. *Clin Cancer Res* 12, 332-339.
26. Fried, W., Kilbridge, T., Krantz, S., McDonald, T.P., and Lange, R.D. (1969). Studies on extrarenal erythropoietin. *The Journal of laboratory and clinical medicine* 73, 244-248.
27. Powell, J.S., Berkner, K.L., Lebo, R.V., and Adamson, J.W. (1986). Human erythropoietin gene: high level expression in stably transfected mammalian cells and chromosome localization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83, 6465-6469.
28. Watkins, P.C., Eddy, R., Hoffman, N., Stanislovitis, P., Beck, A.K., Galli, J., Vellucci, V., Gusella, J.F., and Shows, T.B. (1986). Regional assignment of the erythropoietin gene to human chromosome region 7pter---q22. *Cytogenetics and cell genetics* 42, 214-218.
29. Jacobs, K., Shoemaker, C., Rudersdorf, R., Neill, S.D., Kaufman, R.J., Mufson, A., Seehra, J., Jones, S.S., Hewick, R., Fritsch, E.F., et al. (1985). Isolation and characterization of genomic and cDNA clones of human erythropoietin. *Nature* 313, 806-810.
30. Rahbek-Nielsen, H., Roepstorff, P., Reischl, H., Wozny, M., Koll, H., and Haselbeck, A. (1997). Glycopeptide profiling of human urinary erythropoietin by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS* 32, 948-958.
31. Lai, P.H., Everett, R., Wang, F.F., Arakawa, T., and Goldwasser, E. (1986). Structural characterization of human erythropoietin. *The Journal of biological chemistry* 261, 3116-3121.
32. Romanowski, R.R., and Sytkowski, A.J. (1994). The molecular structure of human erythropoietin. *Hematology/oncology clinics of North America* 8, 885-894.

33. Sasaki, R., Masuda, S., and Nagao, M. (2000). Erythropoietin: multiple physiological functions and regulation of biosynthesis. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry* 64, 1775-1793.
34. Delorme, E., Lorenzini, T., Giffin, J., Martin, F., Jacobsen, F., Boone, T., and Elliott, S. (1992). Role of glycosylation on the secretion and biological activity of erythropoietin. *Biochemistry* 31, 9871-9876.
35. Dube, S., Fisher, J.W., and Powell, J.S. (1988). Glycosylation at specific sites of erythropoietin is essential for biosynthesis, secretion, and biological function. *The Journal of biological chemistry* 263, 17516-17521.
36. Sytkowski, A.J., Feldman, L., and Zurbuch, D.J. (1991). Biological activity and structural stability of N-deglycosylated recombinant human erythropoietin. *Biochemical and biophysical research communications* 176, 698-704.
37. Dordal, M.S., Wang, F.F., and Goldwasser, E. (1985). The role of carbohydrate in erythropoietin action. *Endocrinology* 116, 2293-2299.
38. Savona, M.R., and Silver, S.M. (2008). Erythropoietin-stimulating agents in oncology. *Cancer J* 14, 75-84.
39. Xiao, Y., Ye, Y., Yearsley, K., Jones, S., and Barsky, S.H. (2008). The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype. *The American journal of pathology* 173, 561-574.
40. Winkelmann, J.C., Penny, L.A., Deaven, L.L., Forget, B.G., and Jenkins, R.B. (1990). The gene for the human erythropoietin receptor: analysis of the coding sequence and assignment to chromosome 19p. *Blood* 76, 24-30.
41. Penny, L.A., and Forget, B.G. (1991). Genomic organization of the human erythropoietin receptor gene. *Genomics* 11, 974-980.
42. Arcasoy, M.O., Jiang, X., and Haroon, Z.A. (2003). Expression of erythropoietin receptor splice variants in human cancer. *Biochemical and biophysical research communications* 307, 999-1007.
43. Harris, K.W., and Winkelmann, J.C. (1996). Enzyme-linked immunosorbent assay detects a potential soluble form of the erythropoietin receptor in human plasma. *American journal of hematology* 52, 8-13.
44. Sinclair, A.M., Todd, M.D., Forsythe, K., Knox, S.J., Elliott, S., and Begley, C.G. (2007). Expression and function of erythropoietin receptors in tumors: implications for the use of erythropoiesis-stimulating agents in cancer patients. *Cancer* 110, 477-488.
45. Jones, S.S., D'Andrea, A.D., Haines, L.L., and Wong, G.G. (1990). Human erythropoietin receptor: cloning, expression, and biologic characterization. *Blood* 76, 31-35.
46. Bailey, S.C., Feldman, L., Romanowski, R.R., Davis, K.L., and Sytkowski, A.J. (1993). Antipeptide antibodies as probes of the recombinant and endogenous murine erythropoietin receptors. *Experimental hematology* 21, 1535-1543.
47. Hosoi, S., Miyaji, H., Satoh, M., Kurimoto, T., Mihara, A., Fujiyoshi, N., Itoh, S., and Sato, S. (1991). Optimization of cell culture conditions for production of biologically active proteins. *Cytotechnology* 5, 17-34.
48. Hedenus, M., Adriansson, M., San Miguel, J., Kramer, M.H., Schipperus, M.R., Juvonen, E., Taylor, K., Belch, A., Altes, A., Martinelli, G., et al. (2003). Efficacy and safety of darbepoetin alfa in anaemic patients with lymphoproliferative malignancies: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. *British journal of haematology* 122, 394-403.
49. Farrell, F., and Lee, A. (2004). The erythropoietin receptor and its expression in tumor cells and other tissues. *The oncologist* 9 Suppl 5, 18-30.

50. Bodo, E., Kromminga, A., Funk, W., Laugsch, M., Duske, U., Jelkmann, W., and Paus, R. (2007). Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 21, 3346-3354.
51. Lubas, A., Zelichowski, G., Prochnicka, A., Wisniewska, M., and Wankowicz, Z. (2010). Renal autoregulation in medical therapy of renovascular hypertension. *Archives of medical science : AMS* 6, 912-918.
52. Brines, M., and Cerami, A. (2006). Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise. *Kidney international* 70, 246-250.
53. Leist, M., Ghezzi, P., Grasso, G., Bianchi, R., Villa, P., Fratelli, M., Savino, C., Bianchi, M., Nielsen, J., Gerwien, J., et al. (2004). Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 305, 239-242.
54. Sinclair, A.M., Coxon, A., McCaffery, I., Kaufman, S., Paweletz, K., Liu, L., Busse, L., Swift, S., Elliott, S., and Begley, C.G. (2010). Functional erythropoietin receptor is undetectable in endothelial, cardiac, neuronal, and renal cells. *Blood* 115, 4264-4272.
55. Brines, M., and Cerami, A. (2005). Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nature reviews Neuroscience* 6, 484-494.
56. Brines, M., and Cerami, A. (2012). The receptor that tames the innate immune response. *Molecular medicine* 18, 486-496.
57. Brines, M., Patel, N.S., Villa, P., Brines, C., Mennini, T., De Paola, M., Erbayraktar, Z., Erbayraktar, S., Sepodes, B., Thiemermann, C., et al. (2008). Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10925-10930.
58. Ghezzi, P., and Brines, M. (2004). Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell death and differentiation* 11 Suppl 1, S37-44.
59. Cheng, N., Brantley, D.M., and Chen, J. (2002). The ephrins and Eph receptors in angiogenesis. *Cytokine Growth Factor Rev* 13, 75-85.
60. (1997). Unified nomenclature for Eph family receptors and their ligands, the ephrins. Eph Nomenclature Committee. *Cell* 90, 403-404.
61. Flanagan, J.G., and Vanderhaeghen, P. (1998). The ephrins and Eph receptors in neural development. *Annual review of neuroscience* 21, 309-345.
62. Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1998). Molecular distinction and angiogenic interaction between embryonic arteries and veins revealed by ephrin-B2 and its receptor Eph-B4. *Cell* 93, 741-753.
63. Gerety, S.S., Wang, H.U., Chen, Z.F., and Anderson, D.J. (1999). Symmetrical mutant phenotypes of the receptor EphB4 and its specific transmembrane ligand ephrin-B2 in cardiovascular development. *Mol Cell* 4, 403-414.
64. Suenobu, S., Takakura, N., Inada, T., Yamada, Y., Yuasa, H., Zhang, X.Q., Sakano, S., Oike, Y., and Suda, T. (2002). A role of EphB4 receptor and its ligand, ephrin-B2, in erythropoiesis. *Biochem Biophys Res Commun* 293, 1124-1131.
65. Kochling, J., Curtin, P.T., and Madan, A. (1998). Regulation of human erythropoietin gene induction by upstream flanking sequences in transgenic mice. *British journal of haematology* 103, 960-968.
66. Koury, S.T., Koury, M.J., and Bondurant, M.C. (1989). Cytoskeletal distribution and function during the maturation and enucleation of mammalian erythroblasts. *The Journal of cell biology* 109, 3005-3013.

67. Bunn, H.F., Gu, J., Huang, L.E., Park, J.W., and Zhu, H. (1998). Erythropoietin: a model system for studying oxygen-dependent gene regulation. *The Journal of experimental biology* 201, 1197-1201.
68. Wang, F., Zhang, R., Wu, X., and Hankinson, O. (2010). Roles of coactivators in hypoxic induction of the erythropoietin gene. *PloS one* 5, e10002.
69. Haase, V.H. (2010). Hypoxic regulation of erythropoiesis and iron metabolism. *American journal of physiology Renal physiology* 299, F1-13.
70. Blanchard, K.L., Acquaviva, A.M., Galson, D.L., and Bunn, H.F. (1992). Hypoxic induction of the human erythropoietin gene: cooperation between the promoter and enhancer, each of which contains steroid receptor response elements. *Molecular and cellular biology* 12, 5373-5385.
71. Fandrey, J., Pagel, H., Frede, S., Wolff, M., and Jelkmann, W. (1994). Thyroid hormones enhance hypoxia-induced erythropoietin production in vitro. *Experimental hematology* 22, 272-277.
72. Kambe, T., Tada-Kambe, J., Kuge, Y., Yamaguchi-Iwai, Y., Nagao, M., and Sasaki, R. (2000). Retinoic acid stimulates erythropoietin gene transcription in embryonal carcinoma cells through the direct repeat of a steroid/thyroid hormone receptor response element half-site in the hypoxia-response enhancer. *Blood* 96, 3265-3271.
73. Hedley, B.D., Allan, A.L., and Xenocostas, A. (2011). The role of erythropoietin and erythropoiesis-stimulating agents in tumor progression. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 17, 6373-6380.
74. Komatsu, N., Adamson, J.W., Yamamoto, K., Altschuler, D., Torti, M., Marzocchini, R., and Lapetina, E.G. (1992). Erythropoietin rapidly induces tyrosine phosphorylation in the human erythropoietin-dependent cell line, UT-7. *Blood* 80, 53-59.
75. Mulcahy, L. (2001). The erythropoietin receptor. *Seminars in oncology* 28, 19-23.
76. Barbone, F.P., Johnson, D.L., Farrell, F.X., Collins, A., Middleton, S.A., McMahon, F.J., Tullai, J., and Jolliffe, L.K. (1999). New epoetin molecules and novel therapeutic approaches. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* 14 Suppl 2, 80-84.
77. Klingmuller, U., Wu, H., Hsiao, J.G., Toker, A., Duckworth, B.C., Cantley, L.C., and Lodish, H.F. (1997). Identification of a novel pathway important for proliferation and differentiation of primary erythroid progenitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94, 3016-3021.
78. Chen, C., and Sytkowski, A.J. (2001). Erythropoietin activates two distinct signaling pathways required for the initiation and the elongation of c-myc. *J Biol Chem* 276, 38518-38526.
79. Eilers, M., and Eisenman, R.N. (2008). Myc's broad reach. *Genes & development* 22, 2755-2766.
80. Boudot, C., Petitfrere, E., Kadri, Z., Chretien, S., Mayeux, P., Haye, B., and Billat, C. (1999). Erythropoietin induces glycosylphosphatidylinositol hydrolysis. Possible involvement of phospholipase c-gamma(2). *The Journal of biological chemistry* 274, 33966-33972.
81. Solar, P., Feldman, L., Jeong, J.Y., Busingye, J.R., and Sytkowski, A.J. (2008). Erythropoietin treatment of human ovarian cancer cells results in enhanced signaling and a paclitaxel-resistant phenotype. *International journal of cancer Journal international du cancer* 122, 281-288.

82. Solar, P., Koval, J., Mikes, J., Kleban, J., Solarova, Z., Lazur, J., Hodorova, I., Fedorocko, P., and Sytkowski, A.J. (2008). Erythropoietin inhibits apoptosis induced by photodynamic therapy in ovarian cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* 7, 2263-2271.
83. Jacobs-Helber, S.M., Roh, K.H., Bailey, D., Dessypris, E.N., Ryan, J.J., Chen, J., Wickrema, A., Barber, D.L., Dent, P., and Sawyer, S.T. (2003). Tumor necrosis factor-alpha expressed constitutively in erythroid cells or induced by erythropoietin has negative and stimulatory roles in normal erythropoiesis and erythroleukemia. *Blood* 101, 524-531.
84. Digicaylioglu, M., and Lipton, S.A. (2001). Erythropoietin-mediated neuroprotection involves cross-talk between Jak2 and NF-kappaB signalling cascades. *Nature* 412, 641-647.
85. Wen, T.C., Sadamoto, Y., Tanaka, J., Zhu, P.X., Nakata, K., Ma, Y.J., Hata, R., and Sakanaka, M. (2002). Erythropoietin protects neurons against chemical hypoxia and cerebral ischemic injury by up-regulating Bcl-xL expression. *Journal of neuroscience research* 67, 795-803.
86. Chong, Z.Z., Kang, J.Q., and Maiese, K. (2003). Apaf-1, Bcl-xL, cytochrome c, and caspase-9 form the critical elements for cerebral vascular protection by erythropoietin. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 23, 320-330.
87. Chong, Z.Z., Kang, J.Q., and Maiese, K. (2002). Erythropoietin is a novel vascular protectant through activation of Akt1 and mitochondrial modulation of cysteine proteases. *Circulation* 106, 2973-2979.
88. Chong, Z.Z., Lin, S.H., Kang, J.Q., and Maiese, K. (2003). Erythropoietin prevents early and late neuronal demise through modulation of Akt1 and induction of caspase 1, 3, and 8. *Journal of neuroscience research* 71, 659-669.
89. Carvalho, G., Lefaucheur, C., Cherbonnier, C., Metivier, D., Chapel, A., Pallardy, M., Bourgeade, M.F., Charpentier, B., Hirsch, F., and Kroemer, G. (2005). Chemosensitization by erythropoietin through inhibition of the NF-kappaB rescue pathway. *Oncogene* 24, 737-745.
90. Phillips, T.M., Kim, K., Vlashi, E., McBride, W.H., and Pajonk, F. (2007). Effects of recombinant erythropoietin on breast cancer-initiating cells. *Neoplasia* 9, 1122-1129.
91. Brines, M., Grasso, G., Fiordaliso, F., Sfacteria, A., Ghezzi, P., Fratelli, M., Latini, R., Xie, Q.W., Smart, J., Su-Rick, C.J., et al. (2004). Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 14907-14912.
92. Ludwig, H., Van Belle, S., Barrett-Lee, P., Birgegard, G., Bokemeyer, C., Gascon, P., Kosmidis, P., Krzakowski, M., Nortier, J., Olmi, P., et al. (2004). The European Cancer Anaemia Survey (ECAS): a large, multinational, prospective survey defining the prevalence, incidence, and treatment of anaemia in cancer patients. *European journal of cancer* 40, 2293-2306.
93. Bormanis, J., Quirt, I., Chang, J., Kouroukis, C.T., MacDonald, D., Melosky, B., Verma, S., and Couture, F. (2013). Erythropoiesis-stimulating agents (ESAs): do they still have a role in chemotherapy-induced anemia (CIA)? *Critical reviews in oncology/hematology* 87, 132-139.

94. Aapro, M., Jelkmann, W., Constantinescu, S.N., and Leyland-Jones, B. (2012). Effects of erythropoietin receptors and erythropoiesis-stimulating agents on disease progression in cancer. *British journal of cancer* 106, 1249-1258.
95. Rodgers, G.M., 3rd, Becker, P.S., Blinder, M., Cella, D., Chanan-Khan, A., Cleeland, C., Coccia, P.F., Djulbegovic, B., Gilreath, J.A., Kraut, E.H., et al. (2012). Cancer- and chemotherapy-induced anemia. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN* 10, 628-653.
96. Mercadante, S., Ferrera, P., Villari, P., David, F., Giarratano, A., and Riina, S. (2009). Effects of red blood cell transfusion on anemia-related symptoms in patients with cancer. *Journal of palliative medicine* 12, 60-63.
97. Klein, H.G., Spahn, D.R., and Carson, J.L. (2007). Red blood cell transfusion in clinical practice. *Lancet* 370, 415-426.
98. Bennett, C.L., Silver, S.M., Djulbegovic, B., Samaras, A.T., Blau, C.A., Gleason, K.J., Barnato, S.E., Elverman, K.M., Courtney, D.M., McKoy, J.M., et al. (2008). Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *Jama* 299, 914-924.
99. Glaspy, J., Crawford, J., Vansteenkiste, J., Henry, D., Rao, S., Bowers, P., Berlin, J.A., Tomita, D., Bridges, K., and Ludwig, H. (2010). Erythropoiesis-stimulating agents in oncology: a study-level meta-analysis of survival and other safety outcomes. *British journal of cancer* 102, 301-315.
100. Henke, M., Laszig, R., Rube, C., Schafer, U., Haase, K.D., Schilcher, B., Mose, S., Beer, K.T., Burger, U., Dougherty, C., et al. (2003). Erythropoietin to treat head and neck cancer patients with anaemia undergoing radiotherapy: randomised, double-blind, placebo-controlled trial. *Lancet* 362, 1255-1260.
101. Overgaard, J., Hansen, H.S., Overgaard, M., Bastholt, L., Berthelsen, A., Specht, L., Lindelov, B., and Jorgensen, K. (1998). A randomized double-blind phase III study of nimorazole as a hypoxic radiosensitizer of primary radiotherapy in supraglottic larynx and pharynx carcinoma. Results of the Danish Head and Neck Cancer Study (DAHANCA) Protocol 5-85. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology* 46, 135-146.
102. Smith, R.E., Jr., Aapro, M.S., Ludwig, H., Pinter, T., Smakal, M., Ciuleanu, T.E., Chen, L., Lillie, T., and Glaspy, J.A. (2008). Darbepoetin alpha for the treatment of anemia in patients with active cancer not receiving chemotherapy or radiotherapy: results of a phase III, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 26, 1040-1050.
103. Wright, J.R., Ung, Y.C., Julian, J.A., Pritchard, K.I., Whelan, T.J., Smith, C., Szechtman, B., Roa, W., Mulroy, L., Rudinskas, L., et al. (2007). Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of erythropoietin in non-small-cell lung cancer with disease-related anemia. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 25, 1027-1032.
104. Leyland-Jones, B., Semiglazov, V., Pawlicki, M., Pienkowski, T., Tjulandin, S., Manikhas, G., Makhson, A., Roth, A., Dodwell, D., Baselga, J., et al. (2005). Maintaining normal hemoglobin levels with epoetin alfa in mainly nonanemic patients with metastatic breast cancer receiving first-line chemotherapy: a survival study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23, 5960-5972.

105. Thomas, G., Ali, S., Hoebbers, F.J., Darcy, K.M., Rodgers, W.H., Patel, M., Abulafia, O., Lucci, J.A., 3rd, and Begg, A.C. (2008). Phase III trial to evaluate the efficacy of maintaining hemoglobin levels above 12.0 g/dL with erythropoietin vs above 10.0 g/dL without erythropoietin in anemic patients receiving concurrent radiation and cisplatin for cervical cancer. *Gynecologic oncology* 108, 317-325.
106. Untch, M., Fasching, P.A., Konecny, G.E., von Koch, F., Conrad, U., Fett, W., Kurzeder, C., Luck, H.J., Stickeler, E., Urbaczyk, H., et al. (2011). PREPARE trial: a randomized phase III trial comparing preoperative, dose-dense, dose-intensified chemotherapy with epirubicin, paclitaxel and CMF versus a standard-dosed epirubicin/cyclophosphamide followed by paclitaxel +/- darbepoetin alfa in primary breast cancer--results at the time of surgery. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 22, 1988-1998.
107. Untch, M., von Minckwitz, G., Konecny, G.E., Conrad, U., Fett, W., Kurzeder, C., Luck, H.J., Stickeler, E., Urbaczyk, H., Liedtke, B., et al. (2011). PREPARE trial: a randomized phase III trial comparing preoperative, dose-dense, dose-intensified chemotherapy with epirubicin, paclitaxel, and CMF versus a standard-dosed epirubicin-cyclophosphamide followed by paclitaxel with or without darbepoetin alfa in primary breast cancer--outcome on prognosis. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology* 22, 1999-2006.
108. Mohyeldin, A., Dalgard, C.L., Lu, H., McFate, T., Tait, A.S., Patel, V.C., Wong, K., Rushing, E., Roy, S., Acs, G., et al. (2007). Survival and invasiveness of astrocytomas promoted by erythropoietin. *Journal of neurosurgery* 106, 338-350.
109. Yin, D., Kawabata, H., Tcherniamtchouk, O., Huynh, T., Black, K.L., and Koeffler, H.P. (2007). Glioblastoma multiforme cells: expression of erythropoietin receptor and response to erythropoietin. *International journal of oncology* 31, 1193-1198.
110. Hassouna, I., Sperling, S., Kim, E., Schulz-Schaeffer, W., Rave-Frank, M., Hasselblatt, M., Jelkmann, W., Giese, A., and Ehrenreich, H. (2008). Erythropoietin augments survival of glioma cells after radiation and temozolomide. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 72, 927-934.
111. Cao, Y., Lathia, J.D., Eyler, C.E., Wu, Q., Li, Z., Wang, H., McLendon, R.E., Hjelmeland, A.B., and Rich, J.N. (2010). Erythropoietin Receptor Signaling Through STAT3 Is Required For Glioma Stem Cell Maintenance. *Genes & cancer* 1, 50-61.
112. Nico, B., Annese, T., Guidolin, D., Finato, N., Crivellato, E., and Ribatti, D. (2011). Epo is involved in angiogenesis in human glioma. *Journal of neuro-oncology* 102, 51-58.
113. Kondyli, M., Gatzounis, G., Kyritsis, A., Varakis, J., and Assimakopoulou, M. (2010). Immunohistochemical detection of phosphorylated JAK-2 and STAT-5 proteins and correlation with erythropoietin receptor (EpoR) expression status in human brain tumors. *Journal of neuro-oncology* 100, 157-164.
114. Peres, E.A., Valable, S., Guillamo, J.S., Marteau, L., Bernaudin, J.F., Roussel, S., Lechapt-Zalcman, E., Bernaudin, M., and Petit, E. (2011). Targeting the erythropoietin receptor on glioma cells reduces tumour growth. *Experimental cell research* 317, 2321-2332.
115. Peres, E.A., Gerault, A.N., Valable, S., Roussel, S., Toutain, J., Divoux, D., Guillamo, J.S., Sanson, M., Bernaudin, M., and Petit, E. (2015). Silencing erythropoietin receptor on glioma cells reinforces efficacy of temozolomide and X-rays through senescence and mitotic catastrophe. *Oncotarget* 6, 2101-2119.

116. Brunotte, J., Bock, H.C., Bruck, W., Hemmerlein, B., and Strik, H. (2011). High expression levels of erythropoietin and its receptor are not correlated with shorter survival in human glioblastoma. *Experimental and therapeutic medicine* 2, 295-299.



8 EKLER

8.1 Etik Kurul Onayı

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

u: Karar hk.

23.12.2016

yı: 1027

Sayın Prof.Dr.Şermin GENÇ,

Kurulumuz tarafından 22.12.2016 tarih ve 3035-GOA protokol numaralı 2016/32-26 karar numarası ile görüşülen **"Glioblastoma Multiforme Hücre Hatlarında Var Olan Eritropoetin Reseptörlerinin Tayini ve Eritropoetin Bu Hücre Hatlarında Proliferasiyona, Migrasyona, İnvazyona ve Angiogeneze Etkilerinin Araştırılması"** konulu araştırmanıza ilişkin Kurulumuz kararı ekte sunulmuştur.

Bilgilerinizi ve gereğini rica ederim.


Prof.Dr.Banu ÖNVURAL
Başkan

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Yerleşkesi İnciraltı 35340 İZMİR-TÜRKİYE
Tel:0 232 4122254 - 0 232 4122258 Faks: 0232 4122243 Elektronik posta:etikkurul@deu.edu.tr

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU
AÇIK ADRES	Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı 2. 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:	3035-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ ☐ AKADEMİK AMAÇLI ☐
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Glioblastoma Multiforme Hücre Hatlarında Var Olan Eritropoetin Reseptörlerinin Tayini ve Eritropoetin Bu Hücre Hatlarında Proliferasyona, Migrasyona, İnvazyona ve Angiogeneze Etkilerinin Araştırılması
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Şermin GENÇ
	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	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe ☒ İngilizce ☐ Diğer ☐

ARAR BİLGİLERİ	Karar No:2016/32-26	Tarih:22.12.2016
	Prof.Dr.Şermin GENÇ 'in sorumlusu olduğu "Glioblastoma Multiforme Hücre Hatlarında Var Olan Eritropoetin Reseptörlerinin Tayini ve Eritropoetin Bu Hücre Hatlarında Proliferasyona, Migrasyona, İnvazyona ve Angiogeneze Etkilerinin Araştırılması" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş, etik açıdan çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	
ETİK KURUL BİLGİLERİ		
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İyi Klinik Uygulamaları Kılavuzu	
ETİK KURUL ÜYELERİ		

Unvanı/Adı/Soyadı	Uzmanlık Alanı	Kurumu	Cinsi yet	Araştırma ile ilişkili mi?		İmza
Prof.Dr.Banu ÖNVURAL (Başkan)	Tıbbi Biyokimya	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU (Başkan Yardımcısı)	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Vesile ÖZTÜRK	Nöroloji	DEU Tıp Fakültesi Nöroloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevinç ERASLAN	Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Mukaddes GÜMÜŞTEKİN	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Tıbbi Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Bilge KARA	Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksek Okulu	Kadın	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Müge KIRAY	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Şeyda SERENİNTEPELER	Hemşirelik Yönetimi	DEU Hemşirelik Fakültesi Hemşirelik Yönetimi A.D	Kadın	E ☐	H ☒	
Doç.Dr.Sefa KIZILDAĞ	Tıbbi Biyoloji ve Genetik	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji ve Genetik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Prof.Dr.Sevda ÖZKARDEŞLER	Anesteziyoloji	DEU Tıp Fakültesi Anesteziyoloji ve Reanimasyon A.D.	Kadın	E ☐	H ☒	
Uzm.Dr.Ahmet Can BİLGİN	Hukuk	DEU Tıp Tarihi ve Etik A.D	Erkek	E ☐	H ☒	
Mehmet Erhan ÖZKUL	Sağlık mensubu olmayan üye	D.E.U Tıp Fakültesi İdari Mali İşler	Erkek	E ☐	H ☒	

8.2 Arbis Formatında Özgeçmiş

T.C. Kimlik No / Pasaport No:	32923626418
Doğum Yılı:	1986
Yazışma Adresi :	Şükrü Tunar sok. Umut Apt. No:5/3 Eğitim Mahallesi Balçova/İZMİR 35330 İzmir/Türkiye
Telefon :	+905302477065
e-posta :	zeynepozgeayyildiz@gmail.com

EĞİTİM BİLGİLERİ

Ülke	Üniversite	Fakülte/Enstitü	Öğrenim Alanı	Derece	Mezuniyet Yılı
Türkiye	Dokuz Eylül Üniversitesi	SAĞLIK BİLİMLERİ	Temel Sinirbilimler	Yüksek Lisans	Devam Ediyor
Türkiye	İhsan Doğramacı Bilkent Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	Moleküler Biyoloji ve Genetik	Yüksek Lisans	2014
Türkiye	Hacettepe Üniversitesi	FEN FAKÜLTESİ	Biyoloji	Lisans	2010

PROJE DENEYİMİ

Proje Adı	Kurum	Bütçe	Tarih	Görev	Proje Türü
Santral Sinir Sistemi Hücrelerinde İnflamazom Aktivasyonuna ve İnflamazom Aktivasyonu İle İndüklenen Hücre Ölümüne Sülfurafan'ın		200488	15.04.2015-15.04.2017	Bursiyer	Ulusal
Sünede Faydalı Genlerin Belirlenmesi		307000	01.11.2010-01.11.2013	Bursiyer	Ulusal

YAYINLARI

SCI, SSCI, AHCI indekslerine giren dergilerde yayınlanan makaleler

Lotem, Michal; Merims, Sharon; Frank, Stephen; Hamburger, Tamar; Nissan, Aviram; Kadouri, Luna; Cohen, Jonathan; Straussman, Ravid; Eisenberg, Galit; Frankenburg, Shoshana; Carmon, Einat; Alaiyan, Bilal; Shneibaum, Shlomo; Ayyildiz, Zeynep Ozge; Isbilen, Murat; Senses, KeremMert; Ron, Ilan; Steinberg, Hanna; Smith, Yoav; Shiloni, Eitan; Gure, Ali Osmay; Peretz, Tamar,Adjuvant Autologous Melanoma Vaccine for Macroscopic Stage III Disease: Survival, Biomarkers, and Improved Response to CTLA-4 Blockade, 2016, JOURNAL OF IMMUNOLOGYRESEARCH