

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERİTROPOETİN'İN SHSY-5Y HÜCRELERİNDE
SİNYALLEME MEKANİZMASININ PROTEOMİK
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

Doç.Dr. ZÜBEYDE ERBAYRAKTAR

SİNİRBİLİMLER DOKTORA PROGRAMI

DOKTORA TEZİ

İZMİR-2014

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970221

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**ERİTROPOETİN'İN SHSY-5Y HÜCRELERİNDE
SİNYALLEME MEKANİZMASININ PROTEOMİK
YÖNTEMİ İLE İNCELENMESİ**

SİNİRBİLİMLER DOKTORA PROGRAMI

Doç.Dr. ZÜBEYDE ERBAYRAKTAR

Danışman Öğretim Üyesi: Prof. Dr. Şermin GENÇ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 2009 KB SAG 077 sayı ile desteklenmiştir.

TEZ KODU: DEU.HSI.PhD-2009970221

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler Anabilim Dalı, Temel Sinirbilimler Doktora programı öğrencisi Doç.Dr. Zübeyde Erbayraktar “Eritropoetin’in SHSY-5Y Hücrelerinde Sinyalleme Mekanizmasının Proteomik Yöntemi İle İncelenmesi” başlıklı Doktora tezini 23.12.2014 tarihinde **BAŞARILI** olarak tamamlamıştır.



BAŞKAN

Prof.Dr. Şermin GENÇ

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE

Prof.Dr. Görsev YENER

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı



ÜYE

Prof.Dr. İbrahim ÖZTURA

Dokuz Eylül Üniversitesi

Sinirbilimler Anabilim Dalı

ÜYE

Prof.Dr. Pınar AKAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı



ÜYE
Prof.Dr. Ahmet KOÇ

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

ÜYE (Yedek)

Prof.Dr. Barış BAKLAN

Dokuz Eylül Üniversitesi

Nöroloji Anabilim Dalı

ÜYE (Yedek)

Doç.Dr. Bünyamin AKGÜL

İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü

Moleküler Biyoloji ve Genetik Anabilim Dalı

İÇİNDEKİLER

	Sayfa No
İÇİNDEKİLER.....	i
TABLO DİZİNİ.....	iii
ŞEKİL DİZİNİ.....	iv
KISALTMALAR.....	v
TEŞEKKÜR.....	vii
ÖZET.....	1
ABSTRACT.....	2
1. GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Eritropoetin.....	4
2.2. Eritropoetin Reseptörü.....	4
2.3. Eritropoetin'in Anti-oksidan Etkisi	5
2.4. Eritropoetin'in Anti-inflamatuar Etkisi.....	5
2.5. Eritropoetin'in Anti-apoptotik Etkisi.....	6
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....	7
3.1. Araştırmanın tipi.....	7
3.2. Araştırmanın yeri ve zamanı.....	7
3.3. Araştırmanın evreni ve örnekleme.....	7
3.4. Çalışma materyali.....	7
3.5. Araştırmanın değişkenleri.....	7
3.6. Veri toplama araçları	7
3.6.1. Hücre Kültürü.....	.8
3.6.2. İn vitro Deney.....	8
3.6.3. Potein İzolasyonu.....	.8
3.6.4. Proteomik Analizi.....	9
3.6.5. Hücre içi Yolak Analizi.....	9
3.6.6. Verilerin Analizi.....	9
3.7. Araştırma planı ve Takvimi.....	10
3.8. Verilerin Değerlendirilmesi.....	10
3.9. Araştırmanın Sınırlılıkları	10

	Sayfa No
3.10. Etik Kurul Onayı.....	10
4. BULGULAR.....	11
4.1. Proteomik Analizinde Eritropoetin Uygulaması ile Ekspresyonu Değişen Proteinlerin Belirlenmesi.....	11
4.2. Anlamlı değişim gösteren mRNA'ların yer aldığı yolaklar.....	14
5. TARTIŞMA.....	19
6. SONUÇ VE ÖNERİLER.....	21
7. KAYNAKLAR.....	22
8. EKLER.....	29
EK-1 Özgeçmiş.....	29
EK-2 Etik Kurul Onayı.....	46
EK-3 Tezin Konusuyla İlişkili Yayınlar.....	49
EK-4 Tezin Makale Taslağı.....	60

TABLULAR DİZİNİ

	Sayfa No
Tablo 1: Sadece 24 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu artan proteinler	11
Tablo 2: Sadece 24 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu azalan proteinler	12
Tablo 3: Sadece 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu değişen proteinler	12
Tablo 4: Hem 24 saat hem de 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu artan proteinler	13
Tablo 5: Hem 24 saat hem de 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu azalan proteinler	13
Tablo 6: 24 saat EPO uyarımı ile SHSY-5Y hücrelerinde ekspresyonu değişen proteinlerin yer aldığı alt yollar	15
Tablo 7: 48 saat EPO uyarımı ile SHSY-5Y hücrelerinde ekspresyonu değişen proteinlerin yer aldığı alt yollar	16

ŞEKİLLER DİZİNİ

	Sayfa No
Şekil 1: 24 saat için “reactome” analiz sonucu	14
Şekil 2: 48 saat için “reactome” analiz sonucu	14
Şekil 3: EPO’nun 24 saat uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinde 24 saatte % olarak en fazla protein değişiminin görüldüğü protein katlanma yolağının grafiği	17
Şekil 4: EPO’nun 48 saat uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinde 24 saatte % olarak en fazla protein değişiminin görüldüğü nörotransmitter temizlenme yolağının grafiği	17

KISALTMALAR

EPO: Eritropoetin
qPCR: Kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu
HIFs: Hipoksi ile indüklenebilir faktörler
FDA: Food and Drug Administration)
EPOR: Eritropoetin reseptörü
CRM: Sitokin reseptör homoloji bölgesi
Jak-2: Janus Tirozin Kinaz 2
MAPK: Ras/ Mitojen Aktivated Protein Kinaz
STAT: Signal Transducers and Activators of Transcription
PI3K: Fosfiditilinositol 3 Kinaz
©c Reseptör: Beta Common Reseptör
GM-CSF: granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
IL-3: İnterlökin 3
IL-5: İnterlökin 5
NO: Nitrik oksit
HIE: Hipoksik iskemik ensefalopati
PVL: periventriküler lökomalasi
Mpred: Metilprednisolon
ROP: Prematür retinopatisi
NEC: Nekrotize edici enterokolit
SAH: Subaraknoid hemoraji
AsialoEPO: Asialo Eritropoetin
CEPO: Karbamile Eritropoetin
Neuro-EPO: Nöro Eritropoetin
rHu-EPO: Rekombinant eritropoetin
SNAP25: Synaptosome-associated protein 25
ERK: Extracellular signal regulated kinase
NMDA: N-metil-D- aspartat
MOG: Miyelin oligodendrosit glikoprotein
FBS: Fetal bovine serum
PBS: Phosphate buffered sali
Ct: Threshold cycle- siklus eşik değeri
MEV4: Multi Experiment View

TEŞEKKÜR

Eritropoetin ile ilgili bilimsel çalışmalarımı daha derinlemesine irdeleyebilmek ve konuyla ilişkili bilgi ve deneyimlerimi arttırmak üzere başladığım Temel Sinirbilimler Doktora programı süresince desteğini esirgemeyen ve motivasyonumu güçlendiren sevgili arkadaşım ve danışmanım Prof. Dr. Şermin GENÇ'e ve Prof. Dr. Kürşad GENÇ'e,

Bilim insanlığı yolunda bizlere her zaman rol model olarak önderlik görevini mükemmel bir şekilde yerine getiren, bizleri daima canlı tutan ve her zaman yanımızda olan saygıdeğer hocam Prof.Dr. İbrahim ASTARCIOĞLU'na,

Deneylerin gerçekleştirilmesi için gerekli koşulları sağlayan Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi ARLAB çalışma arkadaşlarıma,

Yaşamamın anlamını oluşturan, her koşulda beni gönülden destekleyen biricik eşim Prof.Dr. Serhat ERBAYRAKTAR'a ve muhteşem ikiz mücevherlerimiz canım kızım Duygu ERBAYRAKTAR ile canım oğlum Fadıl Alp ERBAYRAKTAR'a sonsuz teşekkürlerimi bir borç biliyorum.

Doç.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR

ÖZET

Eritropoetin'in SHSY-5Y Hücrelerinde Sinyalleme Mekanizmasının Proteomik Yöntemi İle İncelenmesi

Doç.Dr. Zübeyde Erbayraktar, Dokuz Eylül Üniversitesi
Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Sinir Bilimler Anabilim Dalı, 35340 İnciraltı, İzmir

Eritropoetin (EPO), eritropoezi uyaran hematopoetik büyüme faktörü ve sitokindir. Son 20 yılda EPO'nun hematopoetik etkileri dışında farklı organ ve sistemler üzerine etkileri olduğu ortaya konmuştur. Örneğin beyindeki nöronal ve glial hücrelerde kendisinin ve reseptörünün varlığı ortaya konmuş, sinir sisteminin gelişiminde, nöronal canlılığın devamında nöronal hasarın tamirinde kritik roller üstlendiği gösterilmiştir. EPO'nun nöroprotektif etkisinin olası bir mekanizması hücre içi pek çok proteinin ekspresyonunu etkilemesidir.

Bu çalışmanın amacı, EPO'nun SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında protein ekspresyonuna etkisinin incelenmesidir. Bu sayede EPO'nun etkilediği hücre içi yolların bulunmasıdır. Projemizde proteomik yaklaşım ile EPO'in protein düzeyinde yaptığı değişiklikler incelenmiştir. Bu amaçla nöronal bir hücre hattı olan SHSY-5Y hücre hattına EPO indüksiyonu uygulanıp bunun sonucunda ekspresyonu değişen proteinler 2D jel elektroforez ile ayırmış, ardından ekspresyon farkı bulunan proteinlerin analizi kütle spektroskopisi yöntemi ile yapılmıştır. Araştırmanın sonuçlarına göre toplam 74 proteinin ekspresyonu EPO uygulaması ile değiştiği saptanmıştır. Ekspresyon değişimi 40 protein ekspresyonunda artış, 34 protein için azalma şeklindedir. Ekspresyon değişimi gösteren proteinlerin 35'i sadece 24 saat EPO uygulaması ile değişim gösterirken, 17'si sadece 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyon değişimi göstermiştir. 22 proteinin ekspresyonu ise hem 24 saat hem 48 saat EPO uygulaması ile değişim göstermiştir. Ekspresyon değişimi gösteren proteinler için "reactome programı" kullanılarak yolak analizi yapılmıştır. Bu analiz sonrası EPO'nun hücre metabolizmasını, protein metabolizmasını, gen ekspresyonunu, RNA metabolizmasını ve mRNA işlenmesi ile ilgili yolları etkilediği gösterilmiştir.

Anahtar Sözcükler: Eritropoetin, SHSY-5Y Hücre Hattı, Protein Ekspresyonu, Proteomik

ABSTRACT

The Investigation of The Effect of Erythropoietin on The Signaling Mechanism of SHSY-5Y Cell Line by Proteomic Method

Assoc.Prof. Zübeyde Erbayraktar, Dokuz Eylul University
The Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience, 35340 Izmir

Erythropoietin (EPO) is a hematopoietic growth factor and cytokine which stimulates erythropoiesis. In recent 20 years it's been shown that EPO affects other systems. For instance, its receptor is expressed in the brain, neurons and the glial cells. EPO has a critical role in the development, maintenance, protection and repairment of the nervous system. A possible mechanism of EPO is alternation of protein expression.

In this study, our aim is to investigate effect of EPO on protein expression in SHSY-5Y neuroblastoma cell line for finding intracellular pathways affected by EPO. For this purpose neuronal cell line SHSY-5Y has been induced by EPO and protein expression changes has been detected by 2D Gel electrophoresis and mass spectroscopy.

According to results, EPO alters 74 protein expression (40 were increased, 34 were decreased). The levels of 35 proteins were changed by 24 EPO incubation, whereas 17 protein expressions were altered by 48 hours EPO incubation. Twenty two protein expressions were altered by both of incubation periods (24 and 48 hours). Altered proteins pathways analysed with "reactome software".

This analysis showed that EPO affects metabolism, protein metabolism, gene expression, RNA metabolism and mRNA processing pathways.

Key Words: Erythropoietin, SHSY-5Y Cell line, Protein expression, Proteomic

1. GİRİŞ VE AMAÇ

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

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

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

Bu çalışmanın amacı, EPO'nun SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattında post-transkripsiyonel düzeyde yaptığı değişikliklerin incelenmesidir. Bu amaçla nöronal bir hücre hattı olan SHSY-5Y hücre hattına EPO indüksiyonu uygulanıp bunun sonucunda ekspresyonu değişen proteinler proteomik yöntemleriyle incelenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ERITROPOETİN

Glikoprotein yapıda bir hormon olan EPO'nun primer fonksiyonu hematopoetik dokularda eritrosit öncüsü hücrelerin apoptotik ölümünü baskılayarak eritrosit üretimini (eritropoez) uyarmaktır (1, 2). Rekombinan EPO'nun sentez edilmesinin ardından EPO kronik böbrek yetmezliği, yenidoğan prematüritesi, miyeloproliferatif hastalıklar, talasemi, kanser, kemik iliği transplantasyonu ve AIDS tablolarında görülen aneminin tedavisi amacıyla klinik kullanıma girmiştir (2). Ardından hematopoetik dokular dışındaki dokularda da fonksiyonel EPO reseptörlerinin bulunması bu maddenin eritropoez dışında başka fonksiyonları da olabileceğini düşündürmüştür (3-11).

2.2. ERITROPOETİN RESEPTÖRÜ

Sinir sisteminde EPO ve reseptörünün ekspresyonu hipoksi ve metabolik hasar ile uyarılmaktadır (3). EPO reseptörü (EPOR) aracılığıyla gerçekleşen sinyalleme normal beyin gelişimi için gereklidir (12). EPO'nun erişkin kemirgenlerde beyin ve omurilik iskemi modellerinde koruyucu olduğu gösterilmiştir (13-18). EPO in vivo yenidoğan kemirgen hipoksik-iskemik beyin hasarı modelinde de koruyucu etki göstermektedir (19-20). Deneysel parkinsonizm, etanol nörotoksitesi, deneysel otoimmün ansefalomyelit, subaraknoid kanama, intraserebral hematoma, epilepsi, travmatik omurilik hasarı, periferik sinir hasarı, kafa travması, amiloid beta, haloperidol, glutamat, nitrik oksid (NO), hipoksi ve 6-hidroksidopamin (6-OHDA) gibi çeşitli nörotoksinlerle oluşturulan nörotoksite gibi birçok in vivo ve in vitro modelde EPO'nun nöronal hasara karşı koruyucu ya da hasarı azaltıcı etkisi son yıllarda gösterilmiştir (13, 21- 43). EPO deneysel iskemik stroke modelinde hasarın oluşumundan 2 hafta sonra verildiğinde bile uzun süreli değerlendirmede beyin dokusunda iyileşme sağlamaktadır (44). Son yıllarda gelişmiş ve gelişmekte olan ülkelerde stroke, Alzheimer Hastalığı, Parkinson Hastalığı, Multiple Skleroz, kafa travması, şizofreni gibi nörolojik ve nöropsikiyatrik hastalıklarda artış gözlenmektedir. Henüz etkin tedavileri bulunmayan bu hastalıklarda hastalık süreçlerinin temel mekanizmaları da kesin olarak aydınlatılamamıştır. EPO bu hastalıkların deneysel modellerinde etkili bulunmuştur. Stroke hastalarında yapılan sınırlı bir çalışmada

(Götingen EPO-stroke çalışması) EPO'in stroke tedavisinde etkin ve güvenilir olduğunu gösteren bulgular elde edilmiştir (45).

EPO'in nöron koruyucu etkilerinin kesin mekanizması tam olarak bilinmese de hücre canlılığını arttırıcı yolları uyardığı, antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı, hücre içi kalsiyum metabolizmasını düzenlediği, nitrik oksid üretimini azalttığı, glutamat salınımını baskıladığı, anjiyogenez ve nörojenesis uyardığı, nörotrofik faktör sentezini arttırdığı, antiapoptotik, antioksidatif ve anti-inflammatuar etki gösterdiği bildirilmiştir (3, 8, 9, 46 - 52). Ancak EPO'in bu etkilerinin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

2.3. ERİTROPOETİN'İN ANTI-OKSİDAN ETKİSİ

Yukarıda değinilen ve EPO'in antioksidan etkisini destekleyen çalışmaların yanı sıra deneysel kafa travması ve hipoksik-iskemik hasar modellerinde EPO artmış lipid peroksidasyonunu ve NO düzeyini azaltmaktadır (35, 53). Ayrıca EPO preterm bebeklerde lipid peroksidasyonunu azaltmaktadır (54). Rat eritrositlerinde de EPO'in antioksidan etkisi bildirilmiştir (55).

2.4. ERİTROPOETİN'İN ANTI-İNFLAMMATUVAR ETKİSİ

Deneysel intraserebral hemoraji modelinde EPO'in hematom çevresinde inflammatuar hücre infiltrasyonunu ve proinflammatuar sitokin (TNF alfa) gen ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (31). Deneysel omurilik hasarı modelinde EPO'in mikroglial infiltrasyonu ve proinflammatuar sitokin düzeyini azalttığı gösterilmiştir (56). Farelerde oluşturulan deneysel travmatik beyin hasarı modelinde EPO'in apoptotik hücre ölümüyle birlikte inflamasyonu azalttığı saptanmıştır (34). Yenidoğan rat hipoksi/iskemi modelinde EPO'in beyinde proinflammatuar bir sitokin olan IL1beta düzeyini ve lökosit infiltrasyonunu azalttığı bildirilmiştir (51). Deneysel otoimmün ansefalomyelit modelinde EPO'in inflamasyonu azaltarak yarar sağladığı gösterilmiştir (27). Bu modelde EPO omurilikte inflammatuar hücre infiltrasyonunu ve proinflammatuar sitokin (TNF ve IL6) düzeylerini azaltmaktadır (26). Deneysel fare otoimmün ansefalomyelit modelinde EPO ve non-eritropoetik EPO türevleri klinik tabloyu düzeltmekte, omurilikte TNF, IL1beta ve IL1Ra düzeylerini, periferik kan mononükleer hücrelerinde interferon gamma düzeyini azaltmaktadır (29).

EPO deneysel stroke modelinde infarkt hacmini, apoptotik hücre ölümünü ve inflamasyonu azaltmaktadır, in vitro EPO hipoksi ile indüklenen hipokampal nöron ölümüne karşı koruma sağlamaktadır (18). EPO deneysel stroke, otoimmün ansefalomyelit, kafa travması ve kainat toksisitesi modellerinde tedavi edici etkili bulunmuştur. EPO kafa travması ve otoimmün ansefalomyelit modelinde inflamasyonu azaltıcı etki de göstermiştir (13). MSS dışında başka dokuların hasar modellerinde ya da in vivo çalışmalarda da EPO'nun anti-inflamatuvar etkisi gösterilmiştir. Deneysel kollajen ile indüklenen artrit modelinde EPO apoptotik kondrosit ölümünü, TNF alfa düzeyini, oksidatif hasarı ve inflamasyonu azaltmaktadır (57). Siklosporin ile oluşturulan deneysel nefropati modelinde EPO'nun makrofaj infiltrasyonunu ve proinflamatuvar sitokin düzeyini azalttığı gösterilmiştir (58). EPO dializ hastalarından alınan polimorfonükleer lökositlerde in vitro phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) ile uyarılan süperoksid salınımını azaltmaktadır (59).

2.5. ERİTROPOETİN'İN ANTI-APOPTOTİK ETKİSİ

EPO eritroid öncüsü hücrelerde Fas-FasL aracılı apoptozu ve Fas ve FasL gen ve yüzey ekspresyonunu baskılamaktadır (52). EPO'nun birçok in vivo ve in vitro nöronal hasar modelinde apoptotik hücre ölümünü azaltıcı etki gösterdiği bildirilmiştir (13, 15, 18, 19, 23, 24, 26). EPO yenidoğan rat beyin iskemisi modelinde apoptotik hücre ölümünü ve buna eşlik eden kaspaz aktivasyonu ve sitokrom c salınımını ve infarkt hacmini baskılamaktadır. Bu etkilere STAT-5 aktivasyonu ve Bcl-2 artışı eşlik etmektedir (50). İskemik stroke hasta beyinlerinin otopsi incelemesinde infarkt çevresinde en fazla yoğunlaşan apoptotik hücrelerin Fas ve FasL ekspresyonu ile birlikteliği saptanmıştır. Nöronal EPOR ekspresyonu ise iskemik nöronal nekrozun şiddetiyle ters orantılı bir dağılım göstermektedir (60). Deneysel kapalı kafa travması modelinde EPO tedavisinin nöronal apoptozu ve kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir (34).

Bu çalışmanın amacı, SHSY-5Y hücrelerinde EPO'nun meydana getirdiği protein ekspresyon değişimlerinin geniş ölçekli belirlenmesi, bu ekspresyon değişimlerinden yola çıkarak EPO uygulamasının etkilediği hücre içi yollarının ortaya konmasıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3.1. ARAŞTIRMANIN TIPI

Deneysel nitelikte bir araştırmadır.

3.2. ARAŞTIRMANIN YERİ VE ZAMANI

Bu araştırmanın deneyleri, Haziran 2012 ile Aralık 2013 tarihleri arasında Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakóltesi Araştırma Laboratuvarları (AR-LAB)'da gerçekleştirilmiştir.

3.3. ARAŞTIRMA EVRENİ VE ÖRNEKLEMİ/ ÇALIŞMA GRUPLARI

Araştırmamız insan üzerinde yapılan bir çalışma değildir.

Çalışmamızın grupları řu şekildedir:

- Kontrol grubu (n:6)
- 24 saat Eritropoetin uygulanan grup (n:8)
- 48 saat Eritropoetin uygulanan grup (n:8)

3.4. ÇALIŞMA MATERYALI

Çalışmamızda pasaj 17'deki SHSY-5Y nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır. Almanyada bulunan, kısa adı DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen & Zellkulturen) olan "Biyolojik Materyal İçin Kaynak Merkezi"nden 2006'da alınmıştır.

Alım süreci firmalar aracılığı ile olmuştur.

3.5. ARAŞTIRMANIN DEğİŞKENLERİ

Bu araştırmanın değişkenleri:

- Protein ekspresyon seviyeleri (bağımlı değişken)
- Eritropoetin (bağımsız değişken)

3.6. VERİ TOPLAMA ARAÇLARI

3.6.1. Hücre Kültürü

Pasaj 15'deki SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri -80°C'deki dondurucudan alınarak 37°C'deki su banyosunda çözüldü. Ardından içindeki hücre süspansiyonu 6 ml besiyeri içeren falkon tüpe yavaşça aktarıldı. Tüp 1500 rpm'de 5 dk santrifüj edildikten sonra üst sıvı atıldı ve pelete 2 ml ortam eklendi. Hücreler iyice suspense edildikten sonra karışımdan örnek alınarak hücrelerin canlılığına bakıldı. % 90 canlılık yeterli kabul edildi. Tüpe 3 ml daha besiyeri eklendi. 5 ml'lik hücre süspansiyonu, içinde 5 ml ortam bulunan flaska aktarıldı. Ertesi gün ortam değiştirildi. Kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edildi, hücreler konfluent oldukları gün tripsin kullanılarak pasajlandılar.

3.6.2. İn vitro Deney

Pasaj 15'deki SHSY-5Y nöroblastoma hücreleri 75 cm²'lik hücre flasklarına (Greiner,USA) 3x10⁶ hücre/flask yoğunlukta olacak şekilde %89 DMEM/F12 (Sigma Aldrich, USA), %10 FBS ve %1 L-Glutamin içeren ortamla ekildi. Flasklar 24 saat süreyle 37°C'de, %5 CO₂'li ve nemli hava içeren etüvde (Revco, USA) inkübe edildi. İnkübasyonun ardından kontrol grubu (n:3) Optimem (serumsuz ortam) ortamına geçildi. 24 saatlik EPO indüksiyonu uygulanacak grup (n:3), 48 saatlik EPO indüksiyonu uygulanacak grup (n:3) da Optimem ortamına geçildi. EPO indüksiyonu 1 U/ml dozda, 24 ve 48 saat süreyle uygulandı.

3.6.3. Protein İzolasyonu

İn vitro deney sonrasında hücreler hücre kültür kaplarından hücre kazıyıcı kullanılarak kaldırıldı. 150g'de 5 dk santrifüj ile hücre peleti elde edildi. Soğuk 1 ml PBS ile hücreler resüspande edildi. 700 g'de 5 dk süren santrifüj ile hücre peleti elde edildi. Hücre lizisi proteaz inhibitörü içeren hücre lizis solüsyonu ile gerçekleştirildi. Örnek başına 100 µl hücre lizis solüsyonu eklendi. 15 dk'lık buz üzeri enkübasyon sırasında, 2-3 dk aralıklarla örnekler vortekslendi. Son aşamada 15.000 g'de 15 dk santrifüj ile örneklerden protein lizati elde edildi. Analize kadar örnekler -80 °C'de saklandı.

3.6.4. Proteomik Analizi

Proteomik analizi için AROS (Danimarka) firmasından hizmet alımı yapılmıştır. Proteomik analizi 2D jel elektroforezi ve kütle spektroskopisi ile yapılmıştır. Bu yöntemde protein örnekleri 2 boyutlu jel elektroforezi ile ayrıldı. Sonrasında gümüş boyama ile jeller boyandı. Koşullar arası fark dansitometrik ölçüm sonuçlarının istatistiksel analizi ile gerçekleştirildi. Koşullararası fark gözlenen protein spotları jelden çıkartıldı. Kütle spektroskopisi analizi ile peptid sekanslar belirlendi. Spotların peptid sekans verileri Mascot programı kullanılarak insan protein verileri ile karşılaştırıldı. Böylece gruplararası ekspresyon farklılığı gösteren proteinlerin hangileri olduğu belirlendi.

3.6.5. Hücre İçi Yolak Analizi

Bu amaçla reactome programı kullanılmıştır (<http://www.reactome.org/>). Bu programda “pathways analysis” bölümünde protein ekspresyonlarının hangi yolları etkilediği, hangi proteinlerin bu süreçte yer aldığı, bu yolda yer alan proteinlerin ne kadarını (%) etkilediği belirlenmiştir. Programın “analyse expression data” bölümünde ise ekspresyon değişimi gözlenen yolların haritalanması yapılmıştır. Bu analizler için öncelikle 24 saatte ve 48 saatte EPO uygulaması ile ekspresyonu değişen proteinler ve kat değişim oranları girilmiştir.

3.7. ARAŞTIRMANIN PLANI VE TAKVİMİ

İnvitro Deneyler	Haziran 2012 - Eylül 2012
Proteomiks Analizi	Ekim 2012 - Aralık 2012
Proteomiks Verilerinin Analizi	Ocak 2013 - Haziran 2013
Hücre İçi Yolların Analizi	Temmuz 2013 - Aralık 2013
Verilerin Analizleri	Ocak 2014 - Mart 2014
Tez Yazım	Nisan 2014 - Aralık 2014

3.8. VERİLERİN DEĞERLENDİRİLMESİ

Proteomik analizde jel dansitometrik analiz sonuçları gruplar arası karşılaştırmada Mann Whitney U testi kullanılmıştır. Tüm analitik değerlendirmelerde $p < 0.05$ anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

3.9. ARAŞTIRMANIN SINIRLILIKLARI

Bu araştırmada, nöron benzeri bir kanser hücre dizisi olan SHSY-5Y hücre hattı kullanılmıştır. EPO'nun nöron hücrelerindeki proteinlerin ekspresyon değişimlerine olan etkisinin “primer nöron kültürü” veya “diferansiye nöron hücre kültürü” gibi hücreler üzerinde incelenmesi sonucunda daha ayrıntılı bilgilerin elde edilebileceği öngörülmektedir.

3.10. ETİK KURUL ONAYI

Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu tarafından 21 Haziran 2012 tarih, 562-GOA protokol numaralı ve 2012/22-17 sayılı karar ile bu araştırma, etik açıdan uygun görülmüştür.

4. BULGULAR

4.1. PROTEOMİK ANALİZİNDE EPO UYGULAMASI İLE EKSPRESYONU DEĞİŞEN PROTEİNLER

Araştırmamızın sonuçlarına göre toplam 74 proteinin ekspresyonu EPO uygulaması ile değiştiği saptandı. Ekspresyon değişimi 40 protein ekspresyonunda artış, 34 protein için azalma şeklindeydi. Ekspresyon değişimi gösteren proteinlerin 35'i sadece 24 saat EPO uygulaması ile değişim gösterirken (Tablo 1 ve 2), 17'si sadece 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyon değişimi gösteriyordu (Tablo 3). 22 proteinin ekspresyonu ise hem 24 saat hem 48 saat EPO uygulaması ile değişim gösterdi (Tablo 4 ve 5).

Tablo 1: Sadece 24 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu **artan** proteinler

PROTEİN ADI	Uniprot no	Kontrol ort	EPO 24h ort	Kat değişimi
neuroleukin [Homo sapiens]	P06744	0,246	0,784	3,186992
WD repeat domain 1 [Homo sapiens]	Q75083	0,181	0,439	2,425414
40S ribosomal protein S12 [Homo sapiens]	P25398	0,376	0,864	2,297872
DBH protein [Homo sapiens]	P09172	0,271	0,605	2,232472
aralar2 [Homo sapiens]	Q9UJS0	0,204	0,453	2,220588
zinc finger protein 207 isoform a [Homo sapiens]	Q43670	0,136	0,299	2,198529
ATP synthase subunit gamma, mitochondrial isoform H (heart) precursor [Homo sapiens]	P36542	0,172	0,375	2,180233
growth regulated nuclear 68 protein	P17844	0,114	0,241	2,114035
non-POU domain-containing octamer-binding protein isoform 1 [Homo sapiens]	Q15233	0,509	0,994	1,952849
Chain A, Crystal Structure Of Human Paics, A Bifunctional Carboxylase And Synthetase In Purine Biosynthesis	P22234	0,352	0,657	1,866477
hnRNP 2H9B [Homo sapiens]	P31942	0,132	0,246	1,863636
elongation factor Tu [Homo sapiens]	P49411	0,537	0,999	1,860335
Coiled-coil domain containing 51 [Homo sapiens]	Q96ER9	0,114	0,211	1,850877
prelamin-A/C isoform 2 [Homo sapiens]	P02545	0,11	0,203	1,845455
Phosphoserine aminotransferase 1 [Homo sapiens]	Q9Y617	0,313	0,577	1,84345
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B isoform a [Homo sapiens]	Q99729	0,255	0,468	1,835294
non-POU domain containing, octamer-binding [Homo sapiens]	Q15233	0,199	0,365	1,834171
GMP synthase [glutamine-hydrolyzing] [Homo sapiens]	P49915	0,13	0,238	1,830769

Tablo 2: Sadece 24 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu **azalan** proteinler

PROTEİN ADI	Uniprot no	Kontrol ort	EPO 24h ort	Kat değişimi
pyruvate kinase [Homo sapiens]	P14618	0,25	0,047	0,188
heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1 [Homo sapiens]	P11142	0,255	0,049	0,192157
glutathione S-transferase-P1c [Homo sapiens]	P09211	0,211	0,045	0,21327
gamma subunit of CCT chaperonin [Homo sapiens]	P49368	0,112	0,024	0,214286
chaperonin containing TCP1, subunit 5 (epsilon) [Homo sapiens]	P48643	0,148	0,033	0,222973
elongation factor 1-alpha 1 [Homo sapiens]	P68104	0,154	0,037	0,24026
MTHSP75 [Homo sapiens]	P38646	0,14	0,04	0,285714
L-lactate dehydrogenase A chain isoform 1 [Homo sapiens]	P00338	0,083	0,024	0,289157
heat shock cognate 71 kDa protein isoform 1 [Homo sapiens]	P11142	0,079	0,023	0,291139
polypyrimidine tract-binding protein 1 isoform a [Homo sapiens]	P26599	0,098	0,031	0,316327
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]	P04406	0,383	0,129	0,336815
polyadenylate binding protein II [Homo sapiens]	P11940	0,106	0,043	0,40566
Hsp89-alpha-delta-N [Homo sapiens]	P07900	0,201	0,084	0,41791
Chain A, Human Glyoxalase I With Benzyl-Glutathione Inhibitor	Q04760	0,256	0,107	0,417969
KH domain-containing, RNA-binding, signal transduction-associated protein 1 [Homo sapiens]	Q07666	0,087	0,038	0,436782
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	P25705	0,107	0,047	0,439252
HNRPF protein [Homo sapiens]	P52597	0,066	0,035	0,530303

Tablo 3: Sadece 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu **değişen** proteinler

PROTEİN ADI	Uniprot no	Kontrol ort	EPO 48h ort	Kat değişimi
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R isoform 2 [Homo sapiens]	Q99729	0,069	0,162	2,347826
CDC10 homolog [Homo sapiens]	Q16181	0,166	0,384	2,313253
ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F1 complex, alpha subunit 1, cardiac muscle [Homo sapiens]	P25705	0,424	0,96	2,264151
S3 ribosomal protein [Homo sapiens]	P23396	0,616	1	2,146104
aconitate hydratase, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	Q99798	0,093	0,198	2,129032
aldehyde dehydrogenase [Homo sapiens]	P05091	0,191	0,386	2,020942
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B isoform a [Homo sapiens]	Q99729	0,149	0,299	2,006711
MLL septin-like fusion protein [Homo sapiens]	Q9UHD8	0,118	0,225	1,90678
peroxiredoxin-4 [Homo sapiens]	Q13162	0,122	0,039	0,319672
actin, cytoplasmic 1 [Homo sapiens]	P60709	0,291	0,101	0,347079
prohibitin-2 isoform 2 [Homo sapiens]	Q99623	0,157	0,055	0,350318
cytochrome c oxidase subunit 5A, mitochondrial precursor [Homo sapiens]	P20674	0,307	0,109	0,355049
keratin 1 [Homo sapiens] / PEA-15 [Homo sapiens]	P04264	0,282	0,113	0,400709
thioredoxin domain-containing protein 12 precursor [Homo sapiens]	Q95881	0,152	0,066	0,434211
small nuclear ribonucleoprotein F [Homo sapiens]	P62306	0,775	0,375	0,483871
Mutant Human Thioredoxin And A Peptide Target Site In Human Nfkb		0,192	0,1	0,520833
prelamin-A/C isoform 2 [Homo sapiens]	P02545	0,157	0,085	0,541401

Tablo 4: Hem 24 saat hem de 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu **artan** proteinler

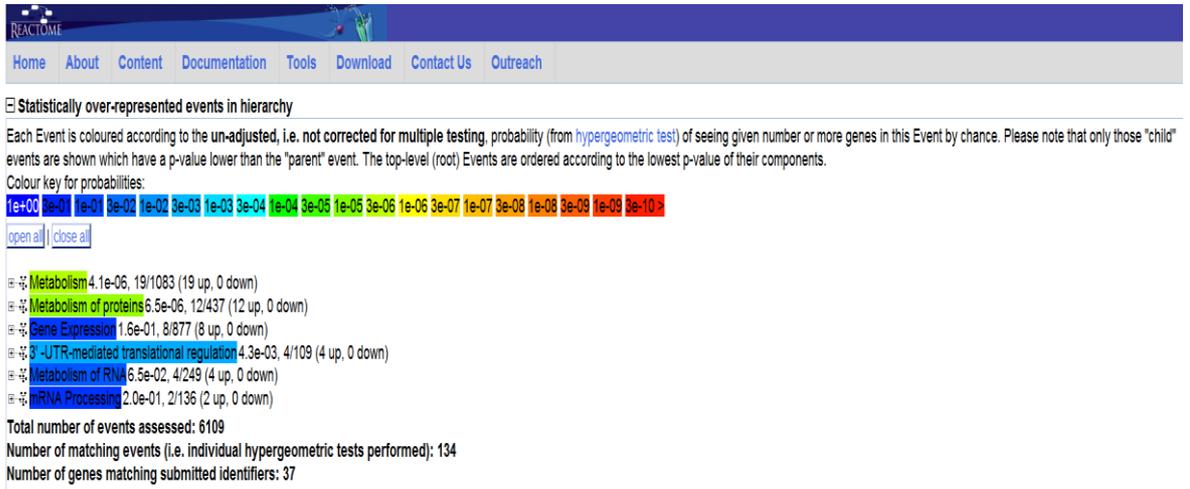
PROTEİN ADI	Uniprot no	Kontrol ort	24 h ort	48 h ort	24 h kat değişimi	48 h kat değişimi
sideroflexin-3 [Homo sapiens]	Q9BWM7	0,099	0,344	0,399	3,474747	4,030303
cyclophilin [Homo sapiens]	P23284	0,054	0,15	0,137	2,777778	2,537037
Chain A, Human Mitochondrial Nad(P)-Dependent Malic Enzyme	Q16798	0,061	0,157	0,125	2,57377	2,04918
78 kDa gastrin-binding protein [Homo sapiens]	P40939	0,505	1,117	1,197	2,211881	2,370297
2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase [Homo sapiens]	P06733	0,099	0,218	0,156	2,20202	1,575758
lamin A/C [Homo sapiens]	P02545	0,084	0,177	0,159	2,107143	1,892857
ATP:citrate lyase [Homo sapiens]	P53396	0,039	0,079	0,085	2,025641	2,179487
RecName: Full=ES1 protein homolog, mitochondrial; AltName: Full=Protein GT335; AltName: Full=Protein KNP-I; Flags: Precursor	P30042	0,119	0,24	0,24	2,016807	2,016807
laminin-binding protein [Homo sapiens]	P08865	0,557	1,055	0,934	1,894075	1,67684
actin-related protein [Homo sapiens]	P61163	0,348	0,657	0,569	1,887931	1,635057
translation initiation factor eIF3 p40 subunit [Homo sapiens]	Q15372	0,142	0,261	0,263	1,838028	1,852113
PAPS sunthetase [Homo sapiens]	Q43252	0,143	0,258	0,267	1,804196	1,867133
aldolase A [Homo sapiens]	P04075	0,208	0,373	0,518	1,793269	2,490385
poly(ADP-ribose) polymerase [Homo sapiens]	P09874	0,142	0,232	0,372	1,633803	2,619718

Tablo 5: Hem 24 saat hem de 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyonu **azalan** proteinler

PROTEİN ADI	Uniprot no	Kontrol ort	24 h ort	48 h ort	24 h kat değişimi	48 h kat değişimi
actin, alpha skeletal muscle [Homo sapiens]	P68133	0,584	0,087	0,108	0,148973	0,184932
mutant beta-actin (beta'-actin) [Homo sapiens]	P60709	0,344	0,063	0,122	0,18314	0,354651
chaperonin (HSP60) [Homo sapiens]	P10809	0,389	0,126	0,168	0,323907	0,431877
eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 [Homo sapiens]	P68104	0,205	0,067	0,073	0,326829	0,356098
Chain A, Structure Of Rho Guanine Nucleotide Dissociation Inhibitor	P52565	0,242	0,082	0,094	0,338843	0,38843
stathmin isoform a [Homo sapiens]	P16949	0,63	0,314	0,081	0,498413	0,128571
acireductone dioxygenase 1 [Homo sapiens]	Q9BV57	0,114	0,069	0,039	0,605263	0,342105
calcium-regulated heat stable protein CRHSP-24 [Homo sapiens]	Q9Y2V2	0,122	0,098	0,061	0,803279	0,5

4.2. ANLAMLI DEĞİŞİM GÖSTEREN mRNA'LARIN YER ALDIĞI YOLAKLAR

24 ve 48 saatte ekspresyonu değişen proteinler için “reactome programında” analiz yapıldığında EPO'nun hücre metabolizmasını, protein metabolizmasını, gene ekspresyonunu, RNA metabolizmasını ve mRNA işlenmesi ile ilgili ana yolları etkilediği gösterildi (Şekil 1 ve 2). EPO uyarımı ile bu ana yollarda yer alan alt yollar ve bu yolaktaki değişen proteinler Tablo 6 ve 7'de verilmiştir.



Şekil 1: 24 saat için reactome analiz sonucu: Bu pencerede 24 saatte ekspresyonu değişen proteinlerin hangi ana yolda yer aldığı gösterilmektedir.



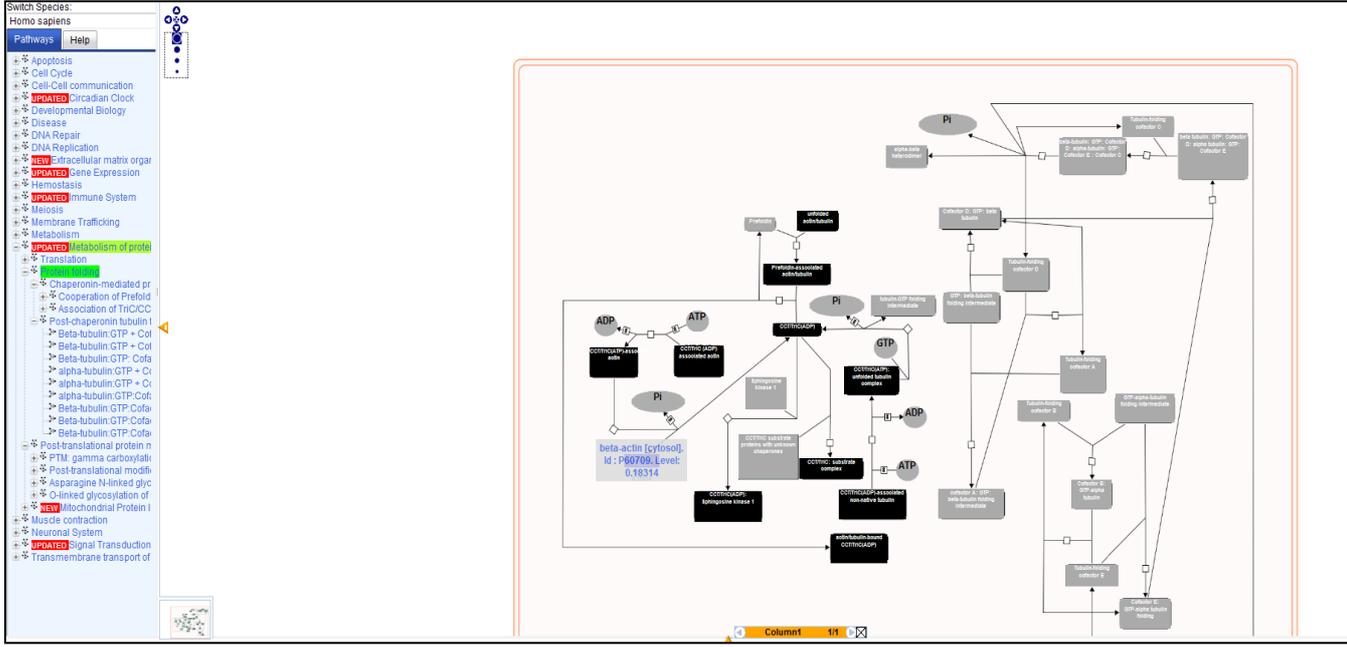
Şekil 2: 48 saat için reactome analiz sonucu: Bu pencerede 48 saatte ekspresyonu değişen proteinlerin hangi ana yolda yer aldığı gösterilmektedir.

Tablo 6: 24 saat EPO uyarımı ile SHSY-5Y hücrelerinde ekspresyonu değişen proteinlerin yer aldığı alt yollar

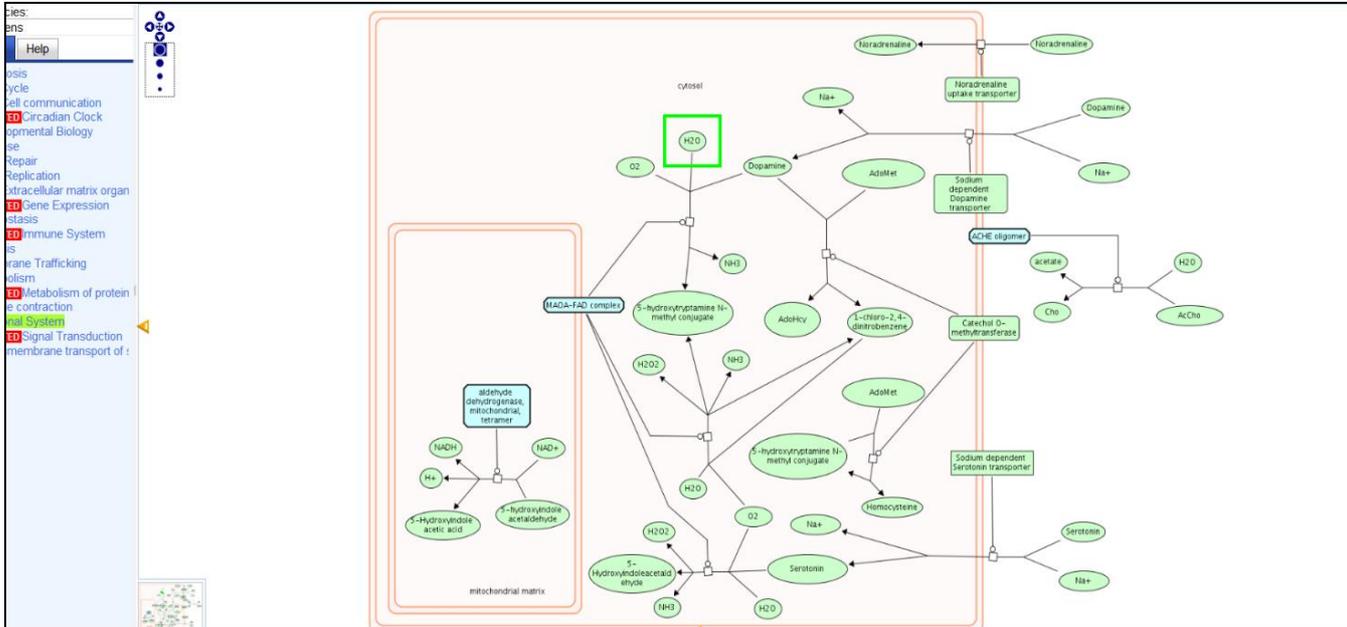
Number of genes in your query which map to this Event	Total number of genes involved in this Event	Identifier of this Event	Name of this Event	Submitted identifiers mapping to this Event
5	27	REACT_1383	Glycolysis	P14618, P04406, P04075, P06733, P06744
5	31	REACT_1520	Gluconeogenesis	P04406, P04075, P06733, Q9UJS0, P06744
6	62	REACT_723	Glucose metabolism	P14618, P04406, P04075, P06733, Q9UJS0, P06744
19	1083	REACT_111217	Metabolism	P14618, P09211, P00338, P04406, P07900, P25705, Q9BV57, P04075, O43252, P49915, Q9Y617, P22234, P53396, P36542, P06733, P40939, Q9UJS0, P09172, P06744
12	437	REACT_17015	Metabolism of proteins	P60709, P49368, P48643, P38646, P10809, P68104, P11940, P25705, O15372, P08865, Q9UJS0, P25398
3	9	REACT_17050	Folding of actin by CCT/TriC	P60709, P49368, P48643
3	9	REACT_16915	Hydrolysis of ATP and release of folded actin from CCT/TriC	P60709, P49368, P48643
3	9	REACT_17011	Exchange of ADP for ATP in CCT/TriC:actin complex	P60709, P49368, P48643
6	126	REACT_474	Metabolism of carbohydrates	P14618, P04406, P04075, P06733, Q9UJS0, P06744
3	19	REACT_118675	TOMM40 Complex Transports Proteins Across the Outer Mitochondrial Membrane	P38646, P10809, P25705
4	52	REACT_118595	Mitochondrial Protein Import	P38646, P10809, P25705, Q9UJS0
4	57	REACT_1979	Translation initiation complex formation	P11940, O15372, P08865, P25398
4	57	REACT_1515	Formation of translation initiation complexes yielding circularized Ceruloplasmin mRNA in a 'closed-loop' conformation	P11940, O15372, P08865, P25398
4	58	REACT_1258	Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	P11940, O15372, P08865, P25398
4	58	REACT_1595	Association of phospho-L13a with GAIT element of Ceruloplasmin mRNA	P11940, O15372, P08865, P25398
2	6	REACT_25267	Association of AUF1 with Translation and Heat Shock Proteins	P11142, P11940
3	27	REACT_16936	Prefoldin mediated transfer of substrate to CCT/TriC	P60709, P49368, P48643
3	27	REACT_16961	Actin/tubulin:prefoldin complex associates with CCT/TriC	P60709, P49368, P48643
3	28	REACT_17029	Cooperation of Prefoldin and TriC/CCT in actin and tubulin folding	P60709, P49368, P48643
2	9	REACT_16980	Association of CCT/TriC with sphingosine kinase 1	P49368, P48643
2	10	REACT_25315	Ubiquitination of AUF1 (hnRNP D0)	P11142, P11940
2	11	REACT_1776	Purine ribonucleoside monophosphate biosynthesis	P49915, P22234
5	151	REACT_1014	Translation	P68104, P11940, O15372, P08865, P25398
3	46	REACT_608	eIF3 and eIF1A bind to the 40S subunit	O15372, P08865, P25398
2	14	REACT_118696	TIMM23 PAM Imports Proteins to Mitochondrial Matrix	P38646, P10809
2	14	REACT_118832	Precursor Proteins Enter TIMM23 PAM	P38646, P10809
3	49	REACT_1354	Formation of the 43S pre-initiation complex	O15372, P08865, P25398
3	49	REACT_1079	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	O15372, P08865, P25398
3	49	REACT_17004	Chaperonin-mediated protein folding	P60709, P49368, P48643
2	15	REACT_6759	Formation of ATP by chemiosmotic coupling	P25705, P36542
2	21	REACT_16909	ADP is exchanged for ATP in the (ADP:CCT/TriC):tubulin complex	P49368, P48643
2	28	REACT_16984	Association of CCT/TriC with other substrates during biosynthesis (unknown chaperone)	P49368, P48643
2	29	REACT_16907	Association of TriC/CCT with target proteins during biosynthesis	P49368, P48643
2	32	REACT_522	Purine metabolism	P49915, P22234
3	88	REACT_2075	Aminoacyl-tRNA binds to the ribosome at the A-site	P68104, P08865, P25398
3	88	REACT_552	Hydrolysis of eEF1A:GTP	P68104, P08865, P25398
3	89	REACT_1404	Peptide chain elongation	P68104, P08865, P25398
3	89	REACT_1937	Translocation of ribosome by 3 bases in the 3' direction	P68104, P08865, P25398
2	34	REACT_1877	Formation of pre-mRNPs	P26599, P25297
3	92	REACT_1477	Eukaryotic Translation Elongation	P68104, P08865, P25398
3	93	REACT_75917	Formation of UPF1:eRF3 Complex on mRNA with a Premature Termination Codon and No Exon Junction Complex	P11940, P08865, P25398
3	93	REACT_75768	Nonsense Mediated Decay Independent of the Exon Junction Complex	P11940, P08865, P25398
3	98	REACT_1797	Formation of a pool of free 40S subunits	O15372, P08865, P25398
3	104	REACT_75753	UPF1 Binds an mRNP with a Termination Codon Preceding an Exon Junction Complex	P11940, P08865, P25398
3	104	REACT_75910	SMG1 Phosphorylates UPF1 (Enhanced by Exon Junction Complex)	P11940, P08865, P25398
3	107	REACT_75787	SMG6 Cleaves mRNA with Premature Termination Codon	P11940, P08865, P25398
3	110	REACT_2085	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	O15372, P08865, P25398
3	110	REACT_75886	Nonsense-Mediated Decay	P11940, P08865, P25398
3	110	REACT_75891	Phosphorylated UPF1 Recruits SMG5, SMG7, SMG6, and PP2A	P11940, P08865, P25398
3	110	REACT_75822	Nonsense Mediated Decay Enhanced by the Exon Junction Complex	P11940, P08865, P25398
2	54	REACT_25325	Destabilization of mRNA by AUF1 (hnRNP D0)	P11142, P11940
3	130	REACT_111083	The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	P00338, P25705, P36542
4	224	REACT_20605	Metabolism of mRNA	P11142, P11940, P08865, P25398

Tablo 7: 48 saat EPO uyarımı ile SHSY-5Y hücrelerinde ekspresyonu değişen proteinlerin yer aldığı alt yollar

Number of genes in your query which map to this Event	Total number of genes involved in this Event	Identifier of this Event	Name of this Event	Submitted identifiers mapping to this Event
3	19	REACT_118675	TOMM40 Complex Transports Proteins Across the Outer Mitochondrial Membrane	P10809, Q99798, P25705
8	437	REACT_17015	Metabolism of proteins	P60709, P68104, P10809, P08865, O15372, Q99798, P23396, P25705
3	46	REACT_608	eIF3 and eIF1A bind to the 40S subunit	P08865, O15372, P23396
3	49	REACT_1354	Formation of the 43S pre-initiation complex	P08865, O15372, P23396
3	49	REACT_1079	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	P08865, O15372, P23396
3	52	REACT_118595	Mitochondrial Protein Import	P10809, Q99798, P25705
3	56	REACT_1516	Ribosomal scanning	P08865, O15372, P23396
3	56	REACT_1904	Formation of translation initiation complexes containing mRNA that does not circularize	P08865, O15372, P23396
3	57	REACT_1060	eIF2.GTP is hydrolyzed, eIFs are released	P08865, O15372, P23396
3	57	REACT_1979	Translation initiation complex formation	P08865, O15372, P23396
3	57	REACT_656	Start codon recognition	P08865, O15372, P23396
3	57	REACT_931	Ribosomal scanning and start codon recognition	P08865, O15372, P23396
3	57	REACT_1515	Formation of translation initiation complexes yielding circularized Ceruloplasmin mRNA in a 'closed-loop' conformation	P08865, O15372, P23396
3	58	REACT_1258	Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, and subsequent binding to 43S	P08865, O15372, P23396
3	58	REACT_1595	Association of phospho-L13a with GAIT element of Ceruloplasmin mRNA	P08865, O15372, P23396
10	1083	REACT_111217	Metabolism	Q9BV57, P20674, P06733, O43252, P05091, Q99798, P53396, P25705, P40939, P04075
4	151	REACT_1014	Translation	P68104, P08865, O15372, P23396
3	88	REACT_2075	Aminoacyl-tRNA binds to the ribosome at the A-site	P68104, P08865, P23396
3	88	REACT_552	Hydrolysis of eEF1A.GTP	P68104, P08865, P23396
3	89	REACT_1404	Peptide chain elongation	P68104, P08865, P23396
3	89	REACT_1937	Translocation of ribosome by 3 bases in the 3' direction	P68104, P08865, P23396
3	92	REACT_1477	Eukaryotic Translation Elongation	P68104, P08865, P23396
2	27	REACT_1383	Glycolysis	P06733, P04075
3	98	REACT_1797	Formation of a pool of free 40S subunits	P08865, O15372, P23396
2	31	REACT_1520	Gluconeogenesis	P06733, P04075
3	109	REACT_79	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	P08865, O15372, P23396
3	109	REACT_1762	3' -UTR-mediated translational regulation	P08865, O15372, P23396
3	110	REACT_2085	GTP hydrolysis and joining of the 60S ribosomal subunit	P08865, O15372, P23396
3	117	REACT_2159	Eukaryotic Translation Initiation	P08865, O15372, P23396
3	117	REACT_2099	Cap-dependent Translation Initiation	P08865, O15372, P23396
3	130	REACT_111083	The citric acid (TCA) cycle and respiratory electron transport	P20674, Q99798, P25705
2	62	REACT_723	Glucose metabolism	P06733, P04075
2	87	REACT_928	Release of 40S and 60S subunits from the 80S ribosome	P08865, P23396
2	87	REACT_1227	Peptide transfer from P-site tRNA to the A-site tRNA	P08865, P23396
2	87	REACT_115572	Synthesis of nascent polypeptide containing signal sequence	P08865, P23396
2	88	REACT_3	eIF5B.GTP is hydrolyzed and released	P08865, P23396
2	88	REACT_198	The 60S subunit joins the translation initiation complex	P08865, P23396
2	88	REACT_9524	Synthesis of PB1-F2	P08865, P23396
2	89	REACT_1986	Eukaryotic Translation Termination	P08865, P23396
2	89	REACT_389	Polypeptide release from the eRF3-GDP:eRF1:mRNA:80S Ribosome complex	P08865, P23396
2	89	REACT_1654	GTP Hydrolysis by eRF3 bound to the eRF1:mRNA:polypeptide:80S Ribosome complex	P08865, P23396
2	89	REACT_227	GTP bound eRF3:eRF1 complex binds the peptidyl tRNA:mRNA:80S Ribosome complex	P08865, P23396
2	93	REACT_75917	Formation of UPF1:eRF3 Complex on mRNA with a Premature Termination Codon and No Exon Junction Complex	P08865, P23396
2	93	REACT_75768	Nonsense Mediated Decay Independent of the Exon Junction Complex	P08865, P23396
2	94	REACT_6305	Respiratory electron transport, ATP synthesis by chemiosmotic coupling, and heat production by uncoupling proteins.	P20674, P25705
2	95	REACT_115921	Association of a nascent polypeptide:mRNA ribosome complex with a signal recognition particle (SRP)	P08865, P23396
2	97	REACT_116124	The SRP receptor binds the SRP:nascent peptide:ribosome complex	P08865, P23396
2	104	REACT_9514	Viral Protein Synthesis	P08865, P23396
2	104	REACT_75753	UPF1 Binds an mRNP with a Termination Codon Preceding an Exon Junction Complex	P08865, P23396
2	104	REACT_75910	SMG1 Phosphorylates UPF1 (Enhanced by Exon Junction Complex)	P08865, P23396
2	104	REACT_115742	Signal peptide cleavage from ribosome-associated nascent protein	P08865, P23396
2	105	REACT_9491	Viral mRNA Translation	P08865, P23396
2	107	REACT_75787	SMG6 Cleaves mRNA with Premature Termination Codon	P08865, P23396



Şekil 3: EPO'nun 24 saat uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinde 24 saatte % olarak en fazla protein değişiminin görüldüğü protein katlanma yolağının grafiği: Bu yolakta % 8 oranında protein değişimi saptanmıştır.



Şekil 4: EPO'nun 48 saat uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinde 24 saatte % olarak en fazla protein değişiminin görüldüğü nörotransmitter temizlenme yolağının grafiği: Bu yolakta % 16 oranında protein değişimi saptanmıştır.

5. TARTIŞMA

Bu çalışmada nöronal bir hücre hattı olan SHSY-5Y hücrelerinde EPO uygulaması ile değişen proteinler proteomik gibi global bir yaklaşımla ilk kez incelenmiş oldu. Araştırmamızın sonuçlarına göre EPO'nun genel hücre metabolizmasını, protein metabolizmasını, gene ekspresyonunu, RNA metabolizmasını ve mRNA işlenmesi ana yollarında yer alan toplam 74 proteinin ekspresyonunu değiştirdiği saptandı. Ekspresyon değişimi 40 protein ekspresyonunda artış, 34 protein için azalma şeklindeydi. Ekspresyon değişimi gösteren proteinlerin 35'i sadece 24 saat EPO uygulaması ile değişim gösterirken, 17'si sadece 48 saat EPO uygulaması ile ekspresyon değişimi gösteriyordu. 22 proteinin ekspresyonu ise hem 24 saat hem 48 saat EPO uygulaması ile değişim gösterdi.

Neuroleukin 24 saat EPO uygulaması ile en fazla ekspresyon artışı gösteren proteindi. Kontrole göre EPO uygulaması Neuroleukin protein ekspresyonunu 3 kat arttırdı. Neuroleukin ilk kez 1998 yılında fare tükrük bezinde varlığı keşfedilen bir nörotrofik faktördür (61). Spinal kord nöronlarını ve kas hücrelerinin yaşamının devamını destekleyici fonksiyon görür. EPO'nun nöronal hücrelerde nöron koruyucu etkilerine aracılık etmesi olası bir proteindir.

Pyruvate kinase, glikoliz ve glikoneogenezde rol oynayan enzim yapıda bir proteindir (62). Çalışmamızda SHSY-5Y hücrelerinde EPO uygulaması ile ekspresyonu 24 saatte en fazla azalan proteindir. Literatürde EPO'nun bu protein ekspresyonunu etkilediğine dair bir yayına rastlanmamıştır. Bununla birlikte reactome analizi EPO'nun 24 saatte glukoz metabolizması ile ilgili 16 proteinin ekspresyonunu, 48 saatte ise 6 proteinin ekspresyonunu değiştirdiğini göstermiştir.

Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R, nükleer yerleşimli ve mRNA taşınmasında ve stabilitesinin sağlanmasında görevli bir proteindir (63). SHSY-5Y hücrelerine 48 saat EPO uygulaması ile en fazla ekspresyonu artan protein idi. EPO'nun bu protein ekspresyonuna etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiş bir bulgudur.

Sideroflexin-3, EPO'nun hem 24 hemde 48 saat uygulaması ile SHSY-5Y hücrelerinde ekspresyonu en fazla artan proteindir. Bu protein anemi ilişkili, iyon

taşınmasında görevli sideroflexin ailesinin bir üyesidir (64). EPO'nun bu protein ekspresyonuna etkisi ilk kez bu çalışmada gösterilmiş bir bulgudur.

Aktin hücre iskelet protein ailesinin bir üyesidir. Çalışmamızda SHSY-5Y hücrelerinde hem 24 hem de 48 saat EPO ile ekspresyonu en fazla azalan proteindir. Kortikal nöron kültüründe 12 saat 0.5 U/ml EPO preconditioning uygulaması ile bu proteinin ekspresyonunda artış bildirilmiştir (65). Bu çalışma ile bulgularımızın uyuşmamasının nedeni EPO uygulamasındaki farklardan kaynaklanıyor olabilir. Bu çalışmamızdaki EPO dozu 1 U/ml, enkübasyon süresi 24 ve 48 saat idi.

Çalışmamızda SHSY-5Y hücrelerinde EPO uygulaması ile ekspresyon azalışı saptanan Statmin proteini nöronal gelişimde de rolü olan hücre iskelet proteindir (66). Kortikal nöron kültüründe EPO preconditioning uygulaması ile de çalışmamızın sonuçları ile benzer bir şekilde bu proteinin ekspresyonunda azalma olduğu bildirilmiştir (65). Ayrıca tek doz intraperitoneal 10.000 U/kg dozda EPO uygulanan fare beyinlerinde de statmin proteininde azalma saptandığı bildirilmiştir (67).

Çalışmamızda SHSY-5Y hücrelerinde EPO uygulaması ile ekspresyon değişimi gösteren Hsp 70, ATP sythetase, eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1 proteinlerinde kortikal nöron kültüründe EPO preconditioning uygulaması ile ekspresyon değişimi bildirilmiştir (65). Translation elongation factor 1 alpha 1 düzeyi hem bizim hem de Meloni ve arkadaşlarının çalışmasında EPO uygulaması ile azalma gösterirken; ATP synthetase ekspresyonunda azalma saptandı. Çalışmamızda SHSY-5Y hücrelerinde EPO uygulaması ile ekspresyonu azalan Hsp 70 proteini kortikal nöron kültürü çalışmasında 3 spotta artış 1 spotta ise azalma şeklinde değişim göstermiştir (65).

SHSY-5Y hücrelerinde EPO uygulamasının etkilediği sinyal alt yolları incelediğimizde öne çıkanlar glukoz metabolizması, protein ve mRNA metabolizması olduğunu görüyoruz. Ayrıca EPO uygulaması ile ekspresyonu değişen proteinlerin hücre iskeleti ve mitokondrial kökenli proteinler olması da diğer önemli bir bulgudur.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Araştırmamızın sonuçlarına göre EPO, SHSY-5Y hücre hattında 74 proteinin ekspresyonunu değiştirmektedir. Bu protein ekspresyon değişimlerinden 35'i sadece 24 saatte, 17'si sadece 48 saatte ve 22'si her iki sürede değişim göstermiştir. SHSY-5Y hücre hattında EPO uygulaması ile ekspresyonu değişen proteinlerin yolak analizi sonuçları da EPO'nun glukoz metabolizması, protein ve mRNA metabolizmasını, hücre iskelet ve mitokondrial proteinleri etkilediğini göstermiştir.

Bu projenin kapsamı dışında olmakla birlikte EPO'nun etki mekanizmasında araştırılması gereken noktalardan birisi epigenetik değişikliklerdir. Eritropoetin'in epigenetik mekanizmalardan birisi olan mikroRNA ekspresyonunu etkilediği bilinmektedir (68). Ancak metilasyona olan etkisi az çalışılan konulardan birisidir. Çalışmamızda saptadığımız EPO uygulaması ortaya çıkan protein ekspresyon değişimleri EPO'nun metilasyona yaptığı etki ile ortaya çıkabilir. İleriki çalışmalarda EPO'nun metilasyona etkileri incelenebilir.

Gelecekte yapılabilecek bir başka çalışma ise EPO türevleri ile proteomik çalışmalarının yapılmasıdır. EPO'nun hematopoetik sistemde varolan yan etkileri nedeniyle geliştirilen non-eritropoetik EPO türevleri, nöroprotektif etkili moleküllerdir. Onların etki mekanizmalarının belirlenmesi oldukça önem taşımaktadır. Bu EPO türevlerinden birisi olan asialoEPO'nun 80 ng/gr dozda Wistar sıçanlara uygulanmasından 4 saat sonra elde edilen beyin örneklerinden proteomik analizi gerçekleştirilmiştir (69). In vivo asialoEPO'nun sinaptik nöromediatör salınımlarında görevli olan SNAP-25 isimli proteinin ekspresyonunu azalttığı saptanmıştır. Diğer EPO türevleri ile de benzer çalışmalar gelecekte yapılabilir.

6. KAYNAKLAR

1. Genc S, Zadeoglulari Z, Oner MG, Genc K, Digicaylioglu M. Intranasal erythropoietin therapy in nervous system disorders. *Expert Opin Drug Deliv.* 2011 Jan;8(1):19-32.
2. Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. *Ann Hematol* 2004;83:673-86.
3. Genc S, Koroglu TF, Genc K. Erythropoietin and the nervous system. *Brain Res* 2004;1000:19–31.
4. Buemi M, Cavallaro E, Floccari F, Sturiale A, Aloisi C, Trimarchi M, Corica F, Frisina N. The pleiotropic effects of erythropoietin in the central nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62:228-36.
5. Chong ZZ, Kang JQ, Maiese K. Hematopoietic factor erythropoietin fosters neuroprotection through novel signal transduction cascades. *J Cereb Blood Flow Metab* 2002;22:503-14.
6. Juul S. Recombinant erythropoietin as a neuroprotective treatment: in vitro and in vivo models. *Clin Perinatol* 2004;31:129-42.
7. Ehrenreich H, Aust C, Krampe H, Jahn H, Jacob S, Herrmann M, Siren AL. Erythropoietin: novel approaches to neuroprotection in human brain disease. *Metab Brain Dis* 2004;19:195-206.
8. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. *JAMA* 2005;293:90–95.
9. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci* 2004;25:577-83.
10. Ghezzi P, Brines M. Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 2004;11 Suppl 1:S37-44.
11. Juul SE, Yachnis AT, Rojiani AM, Christensen RD. Immunohistochemical localization of erythropoietin and its receptor in the developing human brain. *Pediatr Dev Pathol* 1999;2:148-58.
12. Yu X, Shacka JJ, Eells JB, Suarez-Quian C, Przygodzki RM, Beleslin-Cokic B, Lin CS, Nikodem VM, Hempstead B, Flanders KC, Costantini F, Noguchi CT. Erythropoietin receptor signalling is required for normal brain development,

- Development 2002;129:505–516.
13. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, de Lanerolle NC, Cerami C, Itri LM, Cerami A. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10526-31.
 14. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, MacKenzie ET, Petit E. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 1999;19:643-51.
 15. Celik M, Gokmen N, Erbayraktar S, Akhisaroglu M, Konakci S, Ulukus C, Genc S, Genc K, Sagiroglu E, Cerami A, Brines M. Erythropoietin prevents motor neuron apoptosis and neurologic disability in experimental spinal cord ischemic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:2258–2263.
 16. Zhang F, Signore AP, Zhou Z, Wang S, Cao G, Chen J. Erythropoietin protects CA1 neurons against global cerebral ischemia in rat: Potential signaling mechanisms. *J Neurosci Res* 2006 83(7):1241-51.
 17. Sakanaka M, Wen TC, Matsuda S, Masuda S, Morishita E, Nagao M, Sasaki R. In vivo evidence that erythropoietin protects neurons from ischemic damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:4635-40.
 18. Siren AL, Fratelli M, Brines M, Goemans C, Casagrande S, Lewczuk P, Keenan S, Gleiter C, Pasquali C, Capobianco A, Mennini T, Heumann R, Cerami A, Ehrenreich H, Ghezzi P. Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4044-9.
 19. Kumral A, Ozer E, Yilmaz O, Akhisaroglu M, Gokmen N, Duman N, Ulukus C, Genc S, Ozkan H. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic–ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 2003;83:224–228.45.
 20. Solaroglu I, Solaroglu A, Kaptanoglu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, Kilinc K. Erythropoietin prevents ischemia–reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. *Child's Nerv Syst* 2003;19:19–22.
 21. Genc S, Akhisaroglu M, Kuralay F, Genc K. Erythropoietin restores glutathione peroxidase activity in 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine-induced neurotoxicity in C57BL mice and stimulates murine astroglial glutathione peroxidase production in vitro. *Neurosci Lett* 2002;321:73-6.

22. Kanaan NM, Collier TJ, Marchionini DM, McGuire SO, Fleming MF, Sortwell CE. Exogenous erythropoietin provides neuroprotection of grafted dopamine neurons in a rodent model of Parkinson's disease. *Brain Res* 2006;1068:221-9.
23. Signore AP, Weng Z, Hastings T, Van Laar AD, Liang Q, Lee YJ, Chen J. Erythropoietin protects against 6-hydroxydopamine-induced dopaminergic cell death. *J Neurochem* 2006;96:428-43.
24. Kumral A, Tugyan K, Gonenc S, Genc K, Genc S, Sonmez U, Yilmaz O, Duman N, Uysal N, Ozkan H. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegeneration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. *Brain Res Dev Brain Res* 2005;160:146-56.
25. Genc S, Aykan S, Kinik HE, Bozdag M, Kilic RK, Guner G, Genc K. Erythropoietin-conditioned-astrocyte-conditioned medium decreases ethanol neurotoxicity *in vitro*. 31. Congress of Federation of European Biochemical Societies (FEBS), Istanbul, 2006.
26. Agnello D, Bigini P, Villa P, Mennini T, Cerami A, Brines ML, Ghezzi P. Erythropoietin exerts an anti-inflammatory effect on the CNS in a model of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 2002;952:128-34.
27. Diem R, Sattler MB, Merkler D, Demmer I, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bahr M. Combined therapy with methylprednisolone and erythropoietin in a model of multiple sclerosis. *Brain* 2005;128:375-85.
28. Zhang J, Li Y, Cui Y, Chen J, Lu M, Elias SB, Chopp M. Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Brain Res* 2005;1034:34-9.
29. Savino C, Pedotti R, Baggi F, Ubiali F, Gallo B, Nava S, Bigini P, Barbera S, Fumagalli E, Mennini T, Vezzani A, Rizzi M, Coleman T, Cerami A, Brines M, Ghezzi P, Bianchi R. Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 2006;172:27-37.
30. Sattler MB, Merkler D, Maier K, Stadelmann C, Ehrenreich H, Bahr M, Diem R. Neuroprotective effects and intracellular signaling pathways of erythropoietin in a rat model of multiple sclerosis. *Cell Death Differ* 2004;11 Suppl 2:S181-92.

31. Lee ST, Chu K, Sinn DI, Jung KH, Kim EH, Kim SJ, Kim JM, Ko SY, Kim M, Roh JK. Erythropoietin reduces perihematomal inflammation and cell death with eNOS and STAT3 activations in experimental intracerebral hemorrhage. *J Neurochem* 2006;96:1728-39.
32. Kaptanoglu E, Solaroglu I, Okutan O, Surucu HS, Akbiyik F, Beskonakli E. Erythropoietin exerts neuroprotection after acute spinal cord injury in rats: effect on lipid peroxidation and early ultrastructural findings. *Neurosurg Rev* 2004;27:113–120.
33. Campana WM, Misasi R, O'Brien JS. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. *Int J Mol Med* 1998;1:235-41.
34. Yatsiv I, Grigoriadis N, Simeonidou C, Stahel PF, Schmidt OI, Alexandrovitch AG, Tsenter J, Shohami E. Erythropoietin is neuroprotective, improves functional recovery, and reduces neuronal apoptosis and inflammation in a rodent model of experimental closed head injury. *FASEB J* 2005;19:1701-3.
35. Ozturk E, Demirbilek S, Kadir But A, Saricicek V, Gulec M, Akyol O, Ozcan Ersoy M. Antioxidant properties of propofol and erythropoietin after closed head injury in rats. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2005;29:922-7.
36. Chong ZZ, Li F, Maiese K. Erythropoietin requires NF-kappaB and its nuclear translocation to prevent early and late apoptotic neuronal injury during beta-amyloid toxicity. *Curr Neurovasc Res* 2005;2:387-99.
37. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, Behe M, Hasselblatt M, Woldt H, Falkai P, Knerlich F, Jacob S, von Ahsen N, Maier W, Bruck W, Ruther E, Cerami A, Becker W, Siren AL. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. *Mol Psychiatry* 2004;9:42-54.
38. Morishita E, Masuda S, Nagao M, Yasuda Y, Sasaki R. Erythropoietin receptor is expressed in rat hippocampal and cerebral cortical neurons, and erythropoietin prevents in vitro glutamate-induced neuronal death. *Neuroscience* 1997;76:105–116.
39. Liu R, Suzuki A, Guo Z, Mizuno Y, Urabe T. Intrinsic and extrinsic erythropoietin enhances neuroprotection against ischemia and reperfusion injury in vitro. *J Neurochem* 2006;96:1101-10.

40. Lewczuk P, Hasselblatt M, Kamrowski-Kruck H, Heyer A, Unzicker C, Siren AL, Ehrenreich H. Survival of hippocampal neurons in culture upon hypoxia: effect of erythropoietin. *NeuroReport* 2000;11:3485-8.
41. Sinor AD, Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. *Neurosci Lett* 2000;290:213-5.
42. Yamasaki M, Mishima HK, Yamashita H, Kashiwagi K, Murata K, Minamoto A, Inaba T. Neuroprotective effects of erythropoietin on glutamate and nitric oxide toxicity in primary cultured retinal ganglion cells. *Brain Res* 2005;1050:15-26.
43. Dzierżko M, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Krutz B, Bittigau P, Thor F, Heumann R, Bührer C, Ikonomidou C, Hansen HH. Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. *Neurobiol Dis* 2004;15:177-87.
44. Siren AL, Radyushkin K, Boretius S, Kammer D, Riechers CC, Natt O, Sargin D, Watanabe T, Sperling S, Michaelis T, Price J, Meyer B, Frahm J, Ehrenreich H. Global brain atrophy after unilateral parietal lesion and its prevention by erythropoietin. *Brain* 2006;129:480-9.
45. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, Lewczuk P, Stiefel M, Rustenbeck HH, Breiter N, Jacob S, Knerlich F, Bohn M, Poser W, Ruther E, Kochen M, Gefeller O, Gleiter C, Wessel TC, De Ryck M, Itri L, Prange H, Cerami A, Brines M, Siren AL. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. *Mol Med* 2002;8:495-505.
46. Assandri R, Egger M, Gassmann M, Niggli E, Bauer C, Forster I, Grolach A. Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line. *J Physiol* 1999;516:343-52.
47. Kretz A, Happold CJ, Marticke JK, Isenmann S. Erythropoietin promotes regeneration of adult CNS neurons via Jak2/Stat3 and PI3K/AKT pathway activation. *Mol Cell Neurosci* 2005;29:569-79.
48. Viviani B, Bartesaghi S, Corsini E, Villa P, Ghezzi P, Garau A, Galli CL, Marinovich M. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 2005;93:412-21.
49. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M. Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological

- function in rats. *Stroke* 2004;35:1732-7.
50. Wei L, Han BH, Li Y, Keogh CL, Holtzman DM, Yu SP. Cell death mechanism and protective effect of erythropoietin after focal ischemia in the whisker-barrel cortex of neonatal rats. *J Pharmacol Exp Ther* 2006;317:109-16.
 51. Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 2005;36:1672-8.
 52. Liu Y, Pop R, Sadegh C, Brugnara C, Haase VH, Socolovsky M. Suppression of Fas-FasL co-expression by erythropoietin mediates erythroblast expansion during the erythropoietic stress-response in vivo. *Blood* 2006 Mar 9; [Epub ahead of print]
 - Abraham NG, Nelson JC, Ahmed T, Konwalinka G, Levere RD. Erythropoietin controls heme metabolic enzymes in normal human bone marrow culture. *Exp Hematol* 1989;17:908-13.
 53. Kumral A, Gonenc S, Acikgoz O, Sonmez A, Genc K, Yilmaz O, Gokmen N, Duman N, Ozkan H. Erythropoietin increases glutathione peroxidase enzyme activity and decreases lipid peroxidation levels in hypoxic–ischemic brain injury in neonatal rats. *Biol Neonate* 2005;87:15–18.
 54. Akisu M, Tuzun S, Arslanoglu S, Yalaz M, Kultursay N. Effect of recombinant human erythropoietin administration on lipid peroxidation and antioxidant enzyme(s) activities in preterm infants. *Acta Med Okayama* 2001;55:357–362.
 55. Chakraborty M, Ghosal J, Biswas T, Datta AG. Effect of erythropoietin on membrane lipid peroxidation, superoxide dismutase, catalase, and glutathione peroxidase of rat RBC. *Biochem Med Metab Biol* 1988;40:8-18.
 56. Gorio A, Madaschi L, Di Stefano B, Carelli S, Di Giulio AM, De Biasi S, Coleman T, Cerami A, Brines M. Methylprednisolone neutralizes the beneficial effects of erythropoietin in experimental spinal cord injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:16379-84.
 57. Cuzzocrea S, Mazzon E, di Paola R, Genovese T, Patel NS, Britti D, de Majo M, Caputi AP, Thiemermann C. Erythropoietin reduces the degree of arthritis caused by type II collagen in the mouse. *Arthritis Rheum* 2005;52:940-50.
 58. Lee SH, Li C, Lim SW, Ahn KO, Choi BS, Kim YS, Moon IS, Kim J, Bang BK, Yang CW. Attenuation of interstitial inflammation and fibrosis by recombinant

- human erythropoietin in chronic cyclosporine nephropathy. *Am J Nephrol* 2005;25:64-76.
59. Shurtz-Swirski R, Kristal B, Shasha SM, Shapiro G, Geron R, Sela S. Interaction between erythropoietin and peripheral polymorphonuclear leukocytes in continuous ambulatory dialysis patients. *Nephron* 2002;91:759-61.
 60. Sairanen T, Karjalainen-Lindsberg ML, Paetau A, Ijas P, Lindsberg PJ. Apoptosis dominant in the periinfarct area of human ischaemic stroke--a possible target of antiapoptotic treatments. *Brain* 2006;129:189-99.
 61. Gurney ME, Heinrich SP, Lee MR, Yin HS. Molecular cloning and expression of neuroleukin, a neurotrophic factor for spinal and sensory neurons. *Science*. 1986 Oct 31;234(4776):566-74.
 62. Gupta V, Bamezai RN. Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein. *Protein Sci*. 2010 Nov;19(11):2031-44.
 63. Swanson MS. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein complexes. *Mol Biol Rep*. 1990;14(2-3):79-82.
 64. Yoshikumi Y, Mashima H, Ueda N, Ohno H, Suzuki J, Tanaka S, Hayashi M, Sekine N, Ohnishi H, Yasuda H, Iiri T, Omata M, Fujita T, Kojima I. Roles of CTPL/Sfxn3 and Sfxn family members in pancreatic islet. *J Cell Biochem*. 2005 Aug 15;95(6):1157-68.
 65. Meloni BP, Tilbrook PA, Boulos S, Arthur PG, Knuckey NW. Erythropoietin preconditioning in neuronal cultures: signaling, protection from in vitro ischemia, and proteomic analysis. *J Neurosci Res*. 2006 Mar;83(4):584-93.
 66. Grenningloh G, Soehrman S, Bondallaz P, Ruchti E, Cadas H. Role of the microtubule destabilizing proteins SCG10 and stathmin in neuronal growth. *J Neurobiol*. 2004 Jan;58(1):60-9.
 67. Kaindl AM, Sifringer M, Koppelstaetter A, Genz K, Loeber R, Boerner C, Stuwe J, Klose J, Felderhoff-Mueser U. Erythropoietin protects the developing brain from hyperoxia-induced cell death and proteome changes. *Ann Neurol*. 2008 Nov;64(5):523-34.
 68. Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, Ochiya T, Kato T. Identification of erythropoietin-induced microRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. *Br J Haematol*. 2008 Jun;142(2):293-300.

69. Wang X, Zhu C, Wang X, Gerwien JG, Schrattenholz A, Sandberg M, Leist M, Blomgren K. The nonerythropoietic asialoerythropoietin protects against neonatal hypoxia-ischemia as potently as erythropoietin. *J Neurochem*. 2004 Nov;91(4):900-10.

8.EKLER

EK-1 ÖZGEÇMİŞ

DEÜ AKADEMİK PERSONEL AKADEMİK ÖZGEÇMİŞ FORMU

Doç.Dr.Z.Erbayraktar: 1 / 17
24/11/2014 14:24

Adı Soyadı	: Doç.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR
Doğum Yeri/Tarihi	: ALMANYA 18/07/1970
Kadro Ünvanı ve Aldığı Tarih	: Doçent 02/03/2012
Kadrosunun Bulunduğu Birim	: Tıp Fakültesi
Görev Yaptığı Birim	: Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Bölüm,Anabilim/Anasanat Dalı	: Temel Tıp Bilimleri Bölümü Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı
Yabancı Dil	: İngilizce (ÜDS : 75 / 2008 Yılı)
Lisans	: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi , Şubat 1994
Tıpta Uzmanlık	: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya ve Klinik Biyokimya, Temmuz 2002
Doktora	: Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Onkoloji Anabilim Dalı, Ocak 2010
Yardımcı Doçent	: Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu, Kasım 2010
Doçent	: Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi (Ünvan: Haziran 2011)
Doçentlik alanı	: Biyokimya

Lisansüstü öğrenimlerdeki Tez Bilgileri

Doktora Tezi : p14Arf Metilasyonunun Nöroblastom Minimal Rezidüel Hastalığıdaki Rolü
Tezin Danışmanı, Başlama-Bitiş Tarihleri : Prof.Dr. H.Nur OLGUN , Eylül 2006 - Aralık 2009

Doktora Tezi : Eritropoetin in SHSY-5Y Hücrelerinde sinyalleme mekanizmasının proteomik analizi ile incelenmesi
Tezin Danışmanı, Başlama-Bitiş Tarihleri : Doç.Dr. Kemal Kürşad GENÇ , Eylül 2009 -Devam ediyor

Tıpta Uzmanlık Tezi : Deneysel Diabetes Mellitus'ta Selenyum Katkılı Beslenmenin Oksidatif Hasarı Önleyici ve Glukoz Homeostazını Düzenleyici Etkisi
Tezin Danışmanı, Başlama-Bitiş Tarihleri : Prof.Dr. Canan ÇOKER , Ocak 1999 - Temmuz 2002

Yönetimi Devam eden -Tez Danışmanı- olarak Görev Alınan Tez Bilgileri

Yönetimi Devam eden Yüksek Lisans Tezleri

1. Tezin Adı, Tezin Öğrencisi, Başlama-Bitiş Tarihleri : Kuersetin ve Kalsiyum'un Glioblastom Hücre Hattında Apoptoz Üzerine Etkisi, Derya Murat Özgün, Şubat 2012 -Devam ediyor

Makale Yayınları**Doçentlik sonrası Makaleleri**

1. Ulusu NN, Yılmaz G, **Erbayraktar Z**, Yener G,"A Turkish Three-Centre Study Evaluation of Serum Folic Acid and Vitamin B12 Levels in Alzheimer's Disease", Turkish J of Med. Sci, , 2014, Araştırma Makale,SCI-Expanded, Doçentlik sonrası
2. **Erbayraktar Z**, Gökmen AN, Yılmaz O, Erbayraktar RS,"Experimental Traumatic Spinal Cord Injury", Methods in Molecular Biology, 982/103-112/2013, 2013, Araştırma Makale,SCI, Doçentlik sonrası
3. Manuela Mengozzi, Ilaria Cervellini, Pia Villa, **Zübeyde Erbayraktar**, Necati Gökmen, Osman Yılmaz, Serhat Erbayraktar, Mathini Manohasandra, Paul Van Hummelen, Peter Vandenabeele, Yuti Chernajovsky, Alexander Annenkov, Pietro Ghezzi,"Erythropoietin-induced changes in brain gene expression reveal induction of synaptic plasticity genes in experimental stroke", PNAS, 109(24):9617-22, 2012, Araştırma Makale,SCI, Doçentlik sonrası
4. Ösün A, **Erbayraktar Z**, Erbayraktar RS, Samancıoğlu A, Zadeoğulları Z, Akhisaroğlu S, Özgün DM,"The Effect of Temozolomide Doses and Erythropoietin Combination on Survivin Gene Expression in Human Glioblastoma Cell Lines", Journal of Neurological Sciences, 29:(3),32:518-526, 2012, 2012, Araştırma Makale,SCI-Expanded, Doçentlik sonrası
5. **Zübeyde Erbayraktar**, Zeynep Zadeoğulları, Safiye Aktaş, Hülya Ellidokuz, Güldal Kırkalı, Nur Olgun,"The Role of P14ARF Methylation in Neuroblastoma Minimal Residual Disease", Turkish Journal of Biochemistry, 37(2);283-289, 2012, Araştırma Makale,SCI-Expanded, Doçentlik sonrası
6. **Zübeyde Erbayraktar**, Safiye Aktaş, Zekiye Altun, Nur Olgun,"Nöroblastomda Survivin'in İlaç Direncinin Belirlenmesindeki Rolü", Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 31(5):1087-93, 2011, Araştırma Makale,SCI-Expanded, Doçentlik sonrası
7. Özkan Karaman, Burçak Tatlı Güneş, **Zübeyde Erbayraktar**, Zeynep Arıkan Ayyıldız, Arzu Babayigit Hocaoglu, Duygu Ölmez, Nevin Uzuner,"Recurrence of Wheezing Episodes in Children with Respiratory Syncytial Virus and Non-Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis", Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 31(6):1507-13, 2011, Araştırma Makale,SCI-Expanded, Doçentlik sonrası

Tıpta Uzmanlık sonrası Makaleleri

8. Gunes D, Kırkım G, Kolatan E, Güneri A, Özoğul C, Altun Z, Şerbetçioğlu B, Yılmaz O, Aktaş S, Mutafoğlu K, Tüfekçi Ö, **Erbayraktar Z**, Olgun N,"Evaluation Of The Effect Of Acetyl L-Carnitine On Experimental Cisplatin Ototoxicity And Neurotoxicity", Chemotherapy, 57(3):186-94, 2011, Araştırma Makale,SCI, (13 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
9. Ghezzi P, Bernaudinb M, Bianchic R, Blomgren K, Brines M, Campana W, Cavaletti G, Cerami A, Chopp M, Coleman T, Digicaylioglu M, Ehrenreich H, Erbayraktar S, **Erbayraktar Z**, Gassmann M, Genç S, Gökmen N, Grasso G, Juul S, Lipton SA, Hand CC, Latini R, Lauria G, Leist M, Newton SS, Petit E, Probert L, Sfacteria A, Siren AL, Talan M, Thiernermann C, Westenbrink D, Yaqoob M, Zhu C,"Erythropoietin: not just about erythropoiesis.", Lancet, 375(9732):2142, 2010, Editöre Mektup,SCI, Tıpta Uzmanlık sonrası
10. Aktaş S, Altun Z, **Erbayraktar Z**, Aygün N, Olgun H,"Effect of Cytotoxic Agents and Retinoic Acid on Myc-N Protein Expression in Neuroblastoma", Appl Immunohistochem Mol Morphol, 18(1):86-9, 2010, Araştırma Makale,SCI, (5 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
11. Aktaş S, Altun Z, **Erbayraktar Z**, Olgun N,"Nöroblastomda Retinoik Asit ve Sitotoksik Ajanların Kombinasyonlarının Hücre Siklus Proteinlerinden Siklin D1 ve P21 Ekspresyonu Üzerine Etkileri", Türkiye Klinikleri Tıp Bilimleri Dergisi, 30(3):947-51, 2010, Araştırma Makale,SCI-Expanded, Tıpta Uzmanlık sonrası
12. Zekiye Sultan Altun, Dilek Güneş, Safiye Aktaş, **Zübeyde Erbayraktar**, Nur Olgun,"Protective Effects of Acetyl-L-Carnitine on Cisplatin Cytotoxicity and Oxidative Stress in Neuroblastoma.", Neurochemical Research, 35(3):437-43, 2010, Araştırma Makale,SCI, (14 eserde atf), Tıpta

Makale Yayınları**Tıpta Uzmanlık sonrası Makaleleri**

Uzmanlık sonrası

13. Ozlem Tufekci, Dilek Gunes, Candan Özoğul, Efsun Kolatan, Zekiye Altun, Osman Yılmaz, Safiye Aktaş, **Zübeyde Erbayraktar**, Günay Kırkım, Kamer Mutafoğlu, Alper Soylu, Bülent Şerbetçiöğlü, Enis Alpin Güneri, Nur Olgun,"Evaluation of the Effect of Acetyl L -Carnitine on Experimental Cisplatin Nephrotoxicity", Chemotherapy, 55:451-459;2009, 2009, Araştırma Makale,SCI, (22 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
14. Tüfekçi Ö, Güneş D, Özoğul C, Kolatan E, Altun Z, Yılmaz O, Aktaş S, **Erbayraktar Z**, Kırkım G, Mutafoğlu K, Soylu A, Şerbetçiöğlü M, Güneri E, Olgun H,"Evaluation of the effect of acetyl-L-carnitine on experimental cisplatin nephrotoxicity.", Chemotherapy, 55(6):451-9, 2009, Araştırma Makale,SCI, Tıpta Uzmanlık sonrası
15. **Zübeyde ERBAYRAKTAR**,"Adoptive T-cell therapy of cancer", Journal of Balkan Union of Oncology, 14(1):193-201, 2009, Review Makale,SCI-Expanded, Tıpta Uzmanlık sonrası
16. **Erbayraktar Z**, Erbayraktar R, Yılmaz O, Cerami A, Coleman T, Brines M,"Nonerythropoietic Tissue Protective Compounds Are Highly Effective Facilitators of Wound Healing", Molecular Medicine, 15(7-8):235-41, 2009, Araştırma Makale,SCI, (9 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
17. Brines M, Patel NSA, Villa P, Brines C, Mennini T, De Paola M, **Erbayraktar Z**, Erbayraktar S, Sepodes B, Thiernemann C, Ghezzi P, Yamin M, Hand CC, Xie Q, Coleman T, Cerami A,"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(31):10925-30, 2008, Araştırma Makale,SCI, (44 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
18. **Erbayraktar Z**, Yılmaz O, Artmann AT, Çehrelı R, Çoker C,"Effects of selenium supplementation on antioxidant defense and glucose homeostasis in experimental diabetes mellitus.", Biol Trace Elem Res, 118(3):217-26, 2007, Araştırma Makale,SCI, (10 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
19. Erbayraktar S, de Lanerolle N, de Lotbiniere A, Knisely JP, **Erbayraktar Z**, Yılmaz O, Cerami A, Coleman TR, Brines M,"Carbamylated erythropoietin reduces radiosurgically-induced brain injury", Molecular Medicine, 12(4-6):74-80, 2006, Araştırma Makale,SCI, (23 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
20. Özge Altan, İ. Oguz, **Zübeyde Erbayraktar**, O. Yılmaz, H. Bayraktar, Banu Sis,"The effect of prolonged fasting and refeeding on GSH-Px activity, plasma glucose and cholesterol levels and welfare of older hens from different genotypes", Archiv Für Geflügelkunde, 69(4):185-91, 2005, Araştırma Makale,SCI, (2 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
21. Yıldız A, Sachs GS, Demopoulos CM, Moore CM, Tunca Z, **Erbayraktar Z**, Renshaw PF,"Lithium-induced alterations in nucleoside triphosphate levels in human brain: A proton-decoupled 31P magnetic resonance spectroscopy study", Psychiatry Research Neuroimaging, 138(1):51-59, 2005, Araştırma Makale,SCI, (3 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
22. Leist M, Ghezzi P, Grasso G, Bianchi R, Villa P, Fratelli M, Savino C, Bianchi M, Nielsen J, Gerwien J, Kallunki P, Larsen AK, Helboe L, Christensen S, Pedersen LO, Nielsen M, Torup L, Sager T, Sfacteria A, Erbayraktar S, **Erbayraktar Z**, Gökmen N, Yılmaz O, Cerami-Hand C, Xie QW, Coleman T, Cerami A, Brines M,"Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic", Science, 305(5681):239-42, 2004, Araştırma Makale,SCI, (340 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
23. Hekimsoy Z, Biberoglu S, Kirkali G, Bicer N, **Erbayraktar Z**,"Plasma selenium and urinary iodine in patients with goiter", Trace Elements and Electrolytes, 21(3):145-9, 2004, Araştırma Makale,SCI-Expanded, (1 eserde atf), Tıpta Uzmanlık sonrası
24. S Yalçın, S Özkan, Oktay G, M Çabuk, **Erbayraktar Z**, SF Bilgili,"Age-Related Effects of Catching, Crating, and Transportation at Different Seasons on Core Body Temperature and Physiological Blood

Makale Yayınları**Tıpta Uzmanlık sonrası Makaleleri**

- Parameters in Broilers.", Journal of Applied Poultry Research,, 13(4):549-60, 2004, Araştırma Makale,SCI-Expanded, (34 eserde atıf), Tıpta Uzmanlık sonrası
25. Karaman O, Sünneli L, Uzuner N, Islekel G, Turgut CS, Köse S, Tezcan D, Coker C, **Erbayraktar Z**,"Evaluation of montelukast in 8 to 14 year old children with mild persistent asthma and compared with inhaled corticosteroids.", Allergol Immunopathol, 32(1):21-7, 2004, Araştırma Makale,SCI-Expanded, Tıpta Uzmanlık sonrası
26. Erbayraktar S, Grasso G, Sfactoria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, **Erbayraktar Z**, Gökmen N, Yılmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M,"Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo", PNAS, 100(11):6741-6, 2003, Araştırma Makale,SCI, (192 eserde atıf), Tıpta Uzmanlık sonrası

Öğrenim Sırasında Makaleler

27. **Erbayraktar Z**, Çoker C, Örmən M, Tuncel P, Kırkalı Z, Fadıloğlu M,"CK-MB İzoenzim Aktivitesi Total CK Aktivitesinden Yüksek Ölçülebilir mi?", Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi, 4(2):56-9, 2000, Vaka Takdimi,Ulusal Hakemli

Bilimsel Etkinliklerde Sunulmuş Bildirileri**Doçentlik sonrası Bildirileri**

- Demirci F, Peker E, Karadağ N, Küme T, Şişman A, **Erbayraktar Z**, Akan P, Sevinç S,"Biyokimyasal Tetkik Sonuçlarının Onayında Machine Learning Yaklaşımı : Artificial Neural Network Uygulaması",14. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, ANTALYA, Nisan 2014, Hakemli organizasyon, Doçentlik sonrası
- Çımrın D, Akan P, **Erbayraktar Z**, Kızıldağ S, Çoker ŞÇ,"TIBBİ LABORATUVARLARDA PNÖMOTİK TAŞIMA SİSTEMİNİN KAN ÖRNEKLERİ ÜZERİNE HEMOLİTİK ATKİSİNİN İZLENMESİ",1. ULUSAL LABORATUVAR AKREDİTASYONU VE GÜVENLİĞİ, İSTANBUL, Mayıs 2013, Hakemli organizasyon, Doçentlik sonrası
- Kızıldağ S, Çımrın D, **Erbayraktar Z**, Akan P, Tuncel EP,"İMMUN YÖNTEM İLE ÇALIŞAN BİR KLİNİK LABORATUVARDA DIŞ KALİTE DEĞERLENDİRME SÜRECİ",1. ULUSAL LABORATUVAR AKREDİTASYONU VE GÜVENLİĞİ, İSTANBUL, Mayıs 2013, Hakemli organizasyon, Doçentlik sonrası
- Akan P, **Erbayraktar Z**, Çımrın D, Kızıldağ S, Özkütük AA,"TIBBİ LABORATUVARLARDA ÖRNEK GÜVENLİĞİ",1. ULUSAL LABORATUVAR AKREDİTASYONU VE GÜVENLİĞİ, İSTANBUL, Mayıs 2013, Hakemli organizasyon, Doçentlik sonrası
- Özkütük AA, Doğan Y, Akan P, **Erbayraktar Z**,"Hasta örneklerinin taşınmasında pnömotik tüp taşıma sistemlerinin biyolojik bulaş riski açısından değerlendirilmesi",1. ULUSAL LABORATUVAR AKREDİTASYONU VE GÜVENLİĞİ, İSTANBUL, Mayıs 2013, Hakemli organizasyon, Doçentlik sonrası
- Doğan Y, Özkütük AA, Doğan Ö, Akan P, **Erbayraktar Z**, Çımrın D,"Laboratuvar Güvenliğinin Oluşturulmasında 5S Uygulaması ve Çalışan Memnuniyeti Etkisi",1.Ulusal Laboratuvar Akreditasyonu ve Güvenliği Sempozyumu ve Sergisi, İSTANBUL, Mayıs 2013, Doçentlik sonrası
- Harmancı D, **Erbayraktar Z**, Güner Akdoğan G," Seleno-L-Methionine Plays Role In Glioblastoma Multiforme Cells GMS-10 and DBTRG-05MG Cell Proliferation and Cell Death",1. Ulusal Moleküler

Bilimsel Etkinliklerde Sunulmuş Bildirileri**Doçentlik sonrası Bildirileri**

Biyoloji Kongresi, İSTANBUL, Kasım 2012, Uluslararası organizasyon, Doçentlik sonrası

8. Harmancı D, **Erbayraktar Z**, Sayın O, Güner Akdoğan G," Sodium Selenite Influences Cell Proliferation and Cell Cycle of SF4433 Human Meningioma Cells",XXIV Ulusal Biyokimya Kongresi, KONYA, Eylül 2012, Hakemli organizasyon, Doçentlik sonrası
9. Harmancı D, **Erbayraktar Z**, Güner Akdoğan G," In Vitro Effects of Seleno-L-Methionine on Glioblastoma Multiforme Cell Proliferation and Death",Congress 22nd IUBMB-37th FEBS, İSPANYA, Eylül 2012, Uluslararası organizasyon, Doçentlik sonrası
10. Harmancı D, **Erbayraktar Z**, Güner Akdoğan G,"Detrimental and Cell Cycle Arresting Effects of Sodium Selenite Treatment on Glioblastoma Multiforme Cell Lines and Primary Cells",FEBS3+ Meeting From Molecules to life and back, HIRVATİSTAN, Haziran 2012, Uluslararası organizasyon, Doçentlik sonrası

Tıpta Uzmanlık sonrası Bildirileri

11. Sayın O, **Erbayraktar Z**, Safari R, Kırkalı F, Genç Ş, Güner Akdoğan G, Astarçioğlu İ,"The PhD Model of Dokuz Eylül University Graduate School of Health Sciences",6th ORPHEUS Conference, İZMİR, Nisan 2011, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
12. Güneri E, Güneş D, Kırkım G, Özoğul C, Şerbetçioğlu B, Yılmaz O, Tüfekçi Ö, Kolatan E, Mutafoğlu K, Altun Z, Aktaş S, **Erbayraktar Z**, Olgun N,"Audiological, Immunohistochemical and Ultrastructural Analysis and Evaluation of the Effect of Acetyl-L-Carnitine on Experimental Cisplatin induced Ototoxicity",Sixth International Symposium on Meniere's Disease and Inner Ear Disorders, JAPONYA, Kasım 2010, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
13. Dilek Güneş, Günay Kırkım, Efsun Kolatan, Enis Alpin Güneri, Candan Özoğul, Bülent Şerbetçioğlu, Osman Yılmaz, Özlem Tüfekçi, Kamer Mutafoğlu, Zekiye Altun, Safiye Aktaş, **Zübeyde Erbayraktar**, Nur Olgun,"Evaluation of the effect of acetyl L-carnitine on experimental cisplatin ototoxicity and neurotoxicity",Advances in Neuroblastoma Research, İSVEÇ, Haziran 2010, Uluslararası organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
14. Güneş D, Kırkım G, Kolatan E, Güneri A, Özoğul C, Altun Z, Şerbetçioğlu B, Yılmaz O, Aktaş S, Mutafoğlu K, Tüfekçi Ö, **Erbayraktar Z**, Olgun N,"Asetil L Karnitinin sisplatin Ototoksitesite ve Nörotoksitesite Üzerine Etkileri",XVI. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, SAMSUN, Mayıs 2010, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
15. **Erbayraktar Z**, Zadeoğulları Z, Aktaş S, Ellidokuz H, Kırkalı G, Olgun N,"Nöroblastomda P14ARF Metilasyonunun Minimal Rezidüel Hastalığıdaki Rolü",X. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, FETHİYE, Nisan 2010, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
16. Serpil Tanrıverdi-Akhisaroğlu, Ergün Kuşku, **Zübeyde ERBAYRAKTAR**, Zeynep Zadeoğulları, Hülya Ellidokuz, Şebnem Aktan,"Psoriyazis Hastalarında Long Pentraxin3'ün (PTX3) Hastalık Aktivasyon Belirteci Olarak Önemi",Turkish Journal of Biochemistry, 2009;34,S240-241",21.Ulusal Biyokimya Kongresi, İSTANBUL, Ekim 2009, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
17. Serpil Tanrıverdi-Akhisaroğlu, Zeynep Zadeoğulları, Didem Keleş, **Zübeyde Erbayraktar**, Aras Emre Canda, Cem Terzi, Hülya Ellidokuz, Mehmet Füzün, Gülgün Oktay,"Kolonorektal Kanserde MMP-2, MMP-9 ve İnhibitörleri TIMP-1, TIMP-2 ve RECK Gen Ekspresyonlarının Klinik Önemi",Turkish Journal of Biochemistry, 2009 Vol34,S137",21.Ulusal Biyokimya Kongresi, İSTANBUL, Ekim 2009, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
18. **Erbayraktar Z**, Zadeoğulları Z, Serpil Tanrıverdi-Akhisaroğlu, Erbayraktar S,"Glioblastoma Multiforme'de Temozolomid ve Eritropoetin'in Survivin Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri",Turkish Journal of Biochemistry, 2009;34,S126-127",21.Ulusal Biyokimya Kongresi, İSTANBUL, Ekim 2009,

Bilimsel Etkinliklerde Sunulmuş Bildirileri**Tıpta Uzmanlık sonrası Bildirileri**

Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası

19. Safiye Aktaş, Zübeyde Erbayraktar, Zekiye Altun, Nur Olgun,"Questioning Of Notch As A Therapeutic Target In Neuroblastoma",40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, ALMANYA, Ekim 2008, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
20. Safiye Aktaş, Zekiye Altun, Zübeyde Erbayraktar, Nevim Aygün, Nur Olgun,"The Effect of Cytotoxic Agents and Retinoic Acid on N-Myc Protein Expression in Neuroblastoma",40th Congress of the International Society of Paediatric Oncology, ALMANYA, Ekim 2008, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
21. Zekiye Altun, Dilek Güneş, Safiye Aktaş, Zübeyde Erbayraktar, Ataş Sönmez, Nur Olgun,"L-karnitin nöroblastomda sisplatinin hücre sitotoksitesine üzerine koruyucu mu?",XV. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, ÇEŞME, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
22. Safiye Aktaş, Zekiye Altun, Zübeyde Erbayraktar, Nevim Aygün, Nur Olgun,"Nöroblastomda Sitotoksik Ajanların ve Retinoik Asidin N-myc Üzerine Etkisi.",XV. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, ÇEŞME, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
23. Zübeyde Erbayraktar, Safiye Aktaş, Zekiye Altun, Nur Olgun,"Nöroblastomda Apoptoz İlişkili Proteinler: Survivin İlaç Direnci Belirleyicisi mi?",XV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, ÇEŞME, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
24. Safiye Aktaş, Zekiye Altun, Zübeyde Erbayraktar, Nur Olgun,"Nöroblastomda Retinoik Asit ve Sitotoksik Ajanların Hücre Siklus Proteinleri Siklin D1 ve p21 Üzerine Etkileri.",XV. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, ÇEŞME, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
25. Zekiye Altun, Safiye Aktaş, Zübeyde Erbayraktar, Zeynep Zadeoğulları, Gülden Diniz, Ayşe Erbay, Nur Olgun,"Nöroblastomda Kemoterapotiklerle Ubikitin Ekspresyonu İlişkisi.",XV. Türk Pediatrik Onkoloji Grubu (TPOG) Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, ÇEŞME, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
26. Altun Z, Aktaş S, Erbayraktar Z, Olgun N,"Pediatrik Onkolojide Temel Onkolojinin Açtığı Yeni Ufuklar.",XV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, ÇEŞME, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
27. Serpil Tanrıverdi Akhisaroğlu, Safiye Aktaş, Zübeyde Erbayraktar, Erçetin AP, Ataş Sönmez, Ayfer Yalçın, Nur Olgun,"Nöroblastomun Sisplatin ile İndüklenen Sitotoksikite Modelinde Gamma-Glutamilsisteinil Etil Esteri'nin in vitro Potansiyel Sitoprotektan Etkisi",XV. TPOG Ulusal Pediatrik Kanser Kongresi, ÇEŞME, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
28. Zübeyde Erbayraktar, Serpil Tanrıverdi Akhisaroğlu, Zekiye Sultan Altun, Ahmet Uğur Yılmaz,"Onkolojide Biyokimya ve Klinik Biyokimya'nın Yeri",VIII. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi., BODRUM, Mayıs 2008, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
29. Tanrıverdi Akhisaroğlu S, Sercan O, Altun Z, Erbayraktar Z, Yılmaz A,"Hematopoetik Kimerizmin Real-Time Quantitative PCR ile Değerlendirilmesi",II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, BURSA, Şubat 2008, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
30. Altun Z, Tercan Avcı S, Tanrıverdi Akhisaroğlu S, Erbayraktar Z, Yılmaz A,"İnsan Kolon Kanseri SW480 Hücre Hattında 5-Fluorourasil, Oksaliplatin, İrinotekan ve Raltitreded ve Çeşitli Kombinasyonlarının Kemosensitivitesilerinin Belirlenmesi",II. Multidisipliner Kanser Araştırma Sempozyumu, BURSA, Şubat 2008, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası

Bilimsel Etkinliklerde Sunulmuş Bildirileri**Tıpta Uzmanlık sonrası Bildirileri**

31. Aktaş S, Erbayraktar Z, Ortaç R, Erbay A, Vergin C, Olgun N,"Nöroblastik tümörlerde notch sinyal yolağının diferansiyasyonla ilişkisi",2. Multidisipliner kanser araştırma sempozyumu, BURSA, Şubat 2008, Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
32. Z. Erbayraktar, O. Yılmaz, A. Temiz, R. Çehreli, Çoker C,"Effects Of Selenium Supplementation On Antioxidant Defense And Glucose Homeostasis In Experimental Diabetes Mellitus",Selenium In Health And Disease, ANKARA, Ekim 2006, Biol Trace Elem Res,2007/118 (217-226), Uluslararası Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
33. Karaçancı c, Arkan A, Küçükgüçlü S, Kuvaki B, Konakçı s, Erbayraktar Z, Altun Z,"Tavşan pnömoperitoneum modelinde genel anestezi ve epidural anestezinin intestinal perfüzyon üzerine etkilerinin karşılaştırılması",XXXVII. Türk Anesteziyoloji ve Reanimasyon Kongresi, ANTALYA, Kasım 2003, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
34. Grasso G, Sfacteria A, Erbayraktar S, Erbayraktar Z, Torup L, Sager T, Cerami A, Coleman T, Brines M,"Preconditioning With A Nonerythropoietic Erythropoietin Ameliorates Spinal Cord Compressive Injury",Society for Neuroscience, AMERİKA BİRLEŞİK DEVLETLERİ, Mayıs 2003, Uluslararası organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası
35. Canan Çoker, Zübeyde Erbayraktar, Ali Rıza Şişman,"Diyabetik Ratlarda Lenste Selenyum, Çinko, Bakır, Demir Düzeyleri Ve Selenyum Katkısının Etkisi",3. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, İZMİR, Nisan 2003, Hakemli organizasyon, Tıpta Uzmanlık sonrası

Öğrenim Sırasında Bildirileri

36. Canan Çoker, Ali Rıza Şişman, Zübeyde Erbayraktar, Memduh Bülbül,"Serum Selenyum Düzeyinin Ölçümünde Grafit Fırın Atomik Absorpsiyon Spektrofotometri ile Spektroflorometrinin Karşılaştırılması",2. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, KUŞADASI, Ekim 2001, Hakemli organizasyon
37. Mert Özgönül, Zübeyde Erbayraktar, Memduh Bülbül, Canan Çoker, Biltan Ersöz,"Bakır, Çinko ve Selenyumda Yaşa Bağlı Değişiklikler",2. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, KUŞADASI, Ekim 2001, Hakemli organizasyon
38. Hüray İşlekel, Canan Çoker, Zübeyde Erbayraktar, Banu Önvural, Lerzan Sunneli, Nevin Uzuner, Dilek Tezcan, Canan Şule Turgut, Suna Köse, Özkan Karaman,"Montelukast Sodyum ve İnhalasyon Kortikosteroidlerle Tedavi Edilen Hafif Persistan Astmalı Çocuklarda İdrarda Lökotrien E4 Atılımı",2. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, KUŞADASI, Ekim 2001, Allergol et Immunopathol,21-27, Hakemli organizasyon
39. Resmi H, Oktay G, Özkan E, Altekin E, Erbayraktar Z, Argun L, Gündüz K, Güner G,"Üç Aşamalı Hemoglobin Elektrofrezisi Uygulaması",İkibinli Yıllarda Biyokimya Eğitimi-II Sorunları ve Çözümleri, İZMİR, Ekim 2001, Hakemli organizasyon
40. Resmi H, Akhunlar H, Erbayraktar Z, Tas G, Güner G,"Bilinenin Deney Tüpünde Gösterilmesi: Sıfır Tuzları Lipid Sindiriminde Etkilidir",İkibinli Yıllarda Biyokimya Eğitimi-II Sorunları ve Çözümleri, İZMİR, Ekim 2001, Hakemli organizasyon
41. Yalcın S, Ozkan S, Oktay G, Cabuk M, Erbayraktar Z, Bilgili SF,"Effect of Catching, Crating And Transportation On Core Body Temperature And Blood Parameters Of Broilers At Different Market Ages Under Summer-Time Conditions",Program and Abstract Book of XV. European Symposium on the Quality of Poultry Meat, İZMİR, Eylül 2001, Uluslararası organizasyon
42. Ozgonul M, Erbayraktar Z, Coker C, Bulbul M, Fadiloğlu M,"Age Related Changes In Copper, Zinc and Selenium.",14th IFCC-FESCC European Congress of Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, ÇEK CUMHURİYETİ, Mayıs 2001, Uluslararası organizasyon

Bilimsel Etkinliklerde Sunulmuş Bildirileri**Öğrenim Sırasında Bildirileri**

43. Hekimsoy Z, Biberoglu S, Kirkali G, Bicer N, Erbayraktar Z, "Plasma Selenium Concentration And Urinary Iodine Excretion In Patients With Goiter", The 24th Congress Of Endocrinology And Metabolic Diseases Of Turkey Joint Meeting With The American Association Of Clinical Endocrinologists, AMERİKA BİRLEŞİK DEVLETLERİ, Mayıs 2001, Uluslararası organizasyon
44. Zübeyde Erbayraktar, Canan Çoker, Murat Örmən, Pınar Tuncel, Ziya Kırkalı, Meral Fadiloğlu, "CK-MB İzoenzim Aktivitesi Total CK Aktivitesinden Yüksek Ölçülebilir mi?", 1. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, KUŞADASI, Nisan 2000, Klinik Laboratuvar Araştırma Dergisi, 4/2/2000 (56-59), Hakemli organizasyon

Kitap ya da Kitap içinde Bölüm/Makale Yazarlığı**Doçentlik sonrası Kitap ya da Kitap içinde Bölüm/Makale Yazarlığı**

1. "Doç.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR, "Referans Aralıkları: Giriş", "Referans Aralıkları Hesaplama", Yeşim Özarda, Diler Aslan, 978-6-05-872290-3, TBD, İzmir, (2012), Syf.3-12, Ders Kitabı, Kitap içi bölüm/Makale, Doçentlik sonrası
2. "Doç.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR, "Santral Sinir Sistemi Tümörlerinde MikroRNA", "MikroRNA ve Sinir Sistemi", Şermin Genç, Kürşad Genç, 978-9944-252-54-6, TUBA, Ankara, (2011), Syf.208-225, Ders Kitabı, Kitap içi bölüm/Makale, Doçentlik sonrası

Tıpta Uzmanlık sonrası Kitap ya da Kitap içinde Bölüm/Makale Yazarlığı

3. "Doç.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR, "Referans Aralıkları: Giriş", "Referans Aralıkları Hesaplama", Yeşim Özarda, 978-975-98085-7-0, TBD, Ankara, (2010), Syf.3-11, Ders Kitabı, Kitap içi bölüm/Makale, Tıpta Uzmanlık sonrası
4. "Uzm.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR, "Effects of Selenium Supplementation", "Selenium In Health And Disease", Ayhan Çavdar, 978-975-01584-0-7, Pozitif, Ankara, (2007), p.157-164, Bilimsel kitap, Kitap içi bölüm/Makale, Tıpta Uzmanlık sonrası

Görev Aldığı Projeler

1. "Bilimle Eğlen, Bilimi Sev ve Bilimi Yaşa", Hizmet Projesi Koordinatörü : Doç.Dr. Bülent ÇAVAŞ, Münferit Proje, "Avrupa Birliği" destekli proje, Proje Çalışanı, Katılımcı görevinde, Mayıs 2012 - Ekim 2012
2. "Pankreas Kanserinde DNA Hasarının ve Programlanmış hücre ölüm yolaklarının belirlenmesi", Araştırma Projesi Koordinatörü : Doç.Dr. Zeynep SERCAN, Münferit Proje, "DEÜ BAP Koordinasyon Birimi" destekli proje, Proje Danışmanı görevinde, Ekim 2009 - Ekim 2012
3. "p14ARF Metilasyonunun Nöroblastom Minimal Rezidüel Hastalığıdaki Rolü", Yarışma Projesi Koordinatörü : Uzm.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR, "TPOG" destekli proje, Nisan 2009 - Eylül 2009, 1.lik Ödülü
4. "Psoriasis hastalarında Long Pentraxin3 ün (PTX3) hastalık aktivasyon belirteci olarak öneminin araştırılması", Araştırma Projesi Koordinatörü : Prof.Dr. Şebnem AKTAN, Münferit Proje, "DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü" destekli proje, Proje Çalışanı,

Görev Aldığı Projeler

Katılımcı görevinde, Ekim 2008 - Ekim 2011

5. "Glioblastoma Multiforme'de Temozolomid ve Eritropoetin'in Survivin Ekspresyonu Üzerindeki Etkileri", Araştırma Projesi Koordinatörü : Uzm.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR, Münferit Proje, , "Kendi olanaklarımızla" destekli proje, Ekim 2008 - Mayıs 2009
6. "Malign Melanomda Regülatör T Hücrelerinin Yeri", Araştırma Projesi Koordinatörü : Prof.Dr. Can KARACA, Münferit Proje, , "DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü" destekli proje, Proje Çalışanı, Katılımcı görevinde, Eylül 2008 - Eylül 2011
7. "İzmir'de Pediatrik Onkoloji Hastalarında Herbal Ürün Kullanımının Sıklığı ve İn Vitro Etkileşimleri", Araştırma Projesi Koordinatörü : Doç.Dr.Kamer UYSAL, Münferit Proje, , Proje Çalışanı, Katılımcı görevinde, Ekim 2007 - Ekim 2008
8. "Kolonrektal Kanser Tedavisinde İlaç Direnci ve Timidin Kinazın Prognostik Önemi", Araştırma Projesi Koordinatörü : Prof.Dr.Ahmet Uğur YILMAZ, Doktora Tezi Projesi, , "DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü" destekli proje, Proje Çalışanı, Katılımcı görevinde, Ekim 2007 - Ekim 2010
9. "Hepatosellüler Kanser Hastalarının Patoloji Materyallerinde Peritümöral ve İntratümöral Lenfosit İnfiltrasyonunun ve Lenfosit Subpopülasyonlarının Belirlenmesi", Araştırma Projesi Koordinatörü : Prof.Dr.Ahmet Uğur YILMAZ, Münferit Proje, , "İlaç Firması" destekli proje, Proje Yürütücüsü görevinde, Ekim 2007 - Nisan 2009
10. "Sıçanlarda L-Karnitin Uygulamasının Sisplatin Nefrotoksitesisi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi", Araştırma Projesi Koordinatörü : Prof.Dr. H.Nur OLGUN, Tıpta Uzmanlık Tezi Projesi, , Proje Çalışanı, Katılımcı görevinde, Mayıs 2007 - Nisan 2008
11. "Sıçanlarda L-Karnitin Uygulamasının Sisplatin Toksikitesisi Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi", Araştırma Projesi Koordinatörü : Prof.Dr. H.Nur OLGUN, Münferit Proje, , Proje Çalışanı, Katılımcı görevinde, Mayıs 2007 - Nisan 2008
12. "Hepatosellüler Kanserde Tümör İnfiltr Edici Lenfositlerin Elde Edilmesi ve Çoğaltılması", Araştırma Projesi Koordinatörü : Prof.Dr.Ahmet Uğur YILMAZ, Doktora Tezi Projesi, , "DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü" destekli proje, Proje Yürütücüsü görevinde, Aralık 2006 - Aralık 2010

Bilimsel Yayınlarda Hakemlikleri

1. Turkish Journal of Biochemistry
2. Dumlupınar Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi

Katıldığı / Görev aldığı Mesleki / Bilimsel / Sanatsal Etkinlikler

1. International Congress Of Clinical Chemistry And Laboratory Medicine And 26th National Congress, İstanbul, Haziran 2014(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
2. Tıbbi Laboratuvarlarda Tam Zamanlı Eşit İş Yüküne Dayalı Kadro Planlanması Toplantısına Katılmak Üzere, Ankara, Mart 2013(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
3. Bilim ve Eğlence Günü İzmir 2012 Fuarına Katılmak Üzere, İzmir, Eylül 2012(Eğitimci Olarak Düzenleyici)

Katıldığı / Görev aldığı Mesleki / Bilimsel / Sanatsal Etkinlikler

4. XXIV Ulusal Biyokimya Kongresine Katılmak Üzere, Konya, Eylül 2012(Davetli Konuşmacı Olma)
5. Olan Febs Workshop On Biyochemistry And Molecular Biology Education Workshopuna Katılmak Üzere, İzmir, Mart 2012(Düzenleme Kurulu Üyesi Olarak Düzenleyici)
6. XXIII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Adana, Kasım 2011(Diğer)
7. Orpheus, İzmir, Nisan 2011(Eğitimci Olarak Düzenleyici)
8. Ts En Iso 15189 ve Klinik Laboratuvarlarda Akreditasyon, Konak, Mart 2011(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
9. Klinik Laboratuvarlarda Analitik Kalite Yönetimi ve Referans Aralıkları Hesaplama Kursu, İzmir, Aralık 2010(Eğitimci Olarak Düzenleyici)
10. XXII. Ulusal Biyokimya Kongresi, Eskişehir, Ekim 2010(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
11. VI Ulusal Tıp Eğitimi Kongresi, Aydın, Haziran 2010(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
12. X. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Fethiye, Nisan 2010(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
13. Orpheus Avrupa Sisteminde Biotıp ve Sağlık Bilimleri Alanında Doktora Eğitimi Kuruluşu Toplantısına Poster Bildirisi İle Katılmak Üzere, Avusturya, Nisan 2010(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
14. XXI. Ulusal Biyokimya Kongresi, İstanbul, Ekim 2009(Davetli Konuşmacı Olma)
15. Etik Kurul Görev ve İşleyişi, İzmir, Eylül 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
16. Immunotherapy And Gene Therapy In Cancer, VOLOS, Yunanistan, Eylül 2009(Davetli Konuşmacı Olma)
17. Deney Hayvanları Kullanımı Sertifika Kurs Programı, İzmir, Mayıs 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
18. Cancer Immunotherapy Immunomonitoring Kongresi, Ukrayna, Mayıs 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
19. School Of Molecular Medicine, İstanbul, Mayıs 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
20. Genetics And Statistics, Quality Control, İstanbul, Mayıs 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
21. Reproductive Medicine, İstanbul, Mayıs 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
22. Stem Cells: From Analysis To Clinical Applications, İstanbul, Mayıs 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
23. III. International Congree Of Molekuler Medicine Kongresi, İstanbul, Mayıs 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
24. Klinik Araştırmalarda Etik Yaklaşım Kursu, İzmir, Nisan 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
25. Kavram Haritaları, İzmir, Mart 2009(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
26. Klinik İlaç Araştırmalarının Etik Kurullarca Değerlendirilmesi, İzmir, Aralık 2008(İzlenimci

Katıldığı / Görev aldığı Mesleki / Bilimsel / Sanatsal Etkinlikler

- Katılımcı Olarak)

27. "2nd Asco-Semco Multidisciplinary Cancer Management Course And Conference (Mcmc)", Çeşme, Kasım 2008(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
28. Probleme Dayalı Öğrenim, İzmir, Ekim 2008(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
29. Oksidatif Stres, Dna Hasarı, Onarımı ve Hastalıklarla İlişkisi, İzmir, Ekim 2008(Düzenleme Kurulu Üyesi Olarak Düzenleyici)
30. Kenneth S.Warren Enstitüsü, NEW YORK, Amerika Birleşik Devletleri, Ekim 2008(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
31. Tez Çalışmasının Değerlendirilmesi, İzmir, Mayıs 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
32. Tez Danışmanlığı Becerileri, İzmir, Mayıs 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
33. Yaşlıda Sık Görülen Nörolojik Hastalıkların Epidemiyolojisi, İzmir, Nisan 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
34. Antijenik Kanser Proteinleri: On Yılı Aşkın Tanımlama Çalışmalarından Öğrendiklerimiz ve Beliren Hedefler, İzmir, Nisan 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
35. Enhanced Gene Annotation By Mass Spectrometry Proteomics, İzmir, Nisan 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
36. Patent Hakları ve Patent Alım Süreçleri, İzmir, Mart 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
37. Tarihi, Şimdisi ve Geleceği İçinde Bilim-Kültür İlişkisi, İzmir, Mart 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
38. Tez Danışmanlığı, İzmir, Mart 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
39. Kardiyovasküler Hastalıklara Yönelik Damar Cidarında Adenovirüslerle Gen Tedavisi, İzmir, Şubat 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
40. Ab 7. Çerçeve Programı Bilgi Günü, İzmir, Ocak 2007(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
41. Apoptosis, Hastalıklarla İlişkisi ve Güncel Belirleme Yöntemleri, İzmir, Aralık 2006(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
42. Satın Alma Süreci Kursu, Marmaris, Eylül 2004(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
43. Moleküler Kanser Sempozyumu, İzmir, Nisan 2004(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
44. Deep Impact Mission, Maryland, Amerika Birleşik Devletleri, Mayıs 2003(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
45. The Development Of New Medical Therapies, New York, Amerika Birleşik Devletleri, Ocak 2003(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
46. Elektroforez Kursu, İzmir, Aralık 2002(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
47. Hasta-Başı Analizleri (Point Of Care Testing-Poct), İzmir, Nisan 2002(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
48. Cellular Therapeutics, Kentucky, Amerika Birleşik Devletleri, Ocak 2002(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
49. Deneysel Araştırma Kursu, İzmir, Kasım 2001(İzlenimci - Katılımcı Olarak)

Katıldığı / Görev aldığı Mesleki / Bilimsel / Sanatsal Etkinlikler

50. 11. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Kuşadası, Ekim 2001(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
51. Bilimsel Araştırma Projelerinin Planlanması, Hazırlanması ve Desteklenmesi, İzmir, Ocak 2001(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
52. Klinik Laboratuvarlarda Yöntem Seçimi, Değerlendirilmesi ve Laboratuvara Uygulanması, İzmir, Mayıs 2000(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
53. Temel Genetik Kursu, İzmir, Mayıs 2000(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
54. 1. Ulusal Klinik Biyokimya Kongresi, Kuşadası, Nisan 2000(Tebliğ / Bildiri Sunma (Poster, Sözlü v.b.))
55. Klinik Laboratuvarlarda Analitik Kalite Yönetimi, İzmir, Şubat 2000(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
56. Free Radicals, Nitric Oxide And Antioxidants In Health And Disease, Antalya, Eylül 1999(İzlenimci - Katılımcı Olarak)
57. Ateroskleroz Sempozyumu, İzmir, Mart 1999(İzlenimci - Katılımcı Olarak)

Çeviri Çalışmaları

1. İngilizce'den Türkçe'ye Kitap Çevirisi : Biochemistry, Doç.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR (SAĞTAŞ), 2012
2. İngilizce'den Türkçe'ye Kitap içi Bölüm Çevirisi : Harper' ın Biyokimyası, Uzm.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR (SAĞTAŞ), 2010
3. İngilizce'den Türkçe'ye Kitap içi Bölüm Çevirisi : Harper' ın Biyokimyası, Uzm.Dr. Zübeyde ERBAYRAKTAR (SAĞTAŞ), 2010

Kazanılan Ödül Bilgileri

1. "TPOG Özgün Araştırma Ödülü", Türk Pediatrik Onkoloji Grubu, Bilim Ödülü, Maddi Ödül, Özel Ödül, Ulusal Yarışma Ödülü, Bilim Alanında, Grup Ödülü, 2010
2. "Araştırma Projesi Destek Ödülü", Türk Pediatrik Onkoloji Grubu Araştırma Projeleri Destek Programı, Proje Ödülü, Maddi Ödül, Özel Ödül, Ulusal Yarışma Ödülü, Bilim Alanında, Bireysel Ödül, 2008
3. "Pediatrik Onkoloji Araştırma Poster Ödülü", Türk Kanser Araştırma ve Savaş Kurumu, Birincilik Ödülü, Maddi Ödül, Özel Ödül, Ulusal Yarışma Ödülü, Bilim Alanında, Bireysel Ödül, 2008
4. "Bilimsel Araştırmaları Teşvik Ödülü", Dokuz Eylül Üniversitesi, Teşvik Ödülü, Maddi Ödül, Resmi Ödül, Ulusal Düzeyde Ödül, Bilim Alanında, Grup Ödülü, 2004
5. "Bilimsel Yayınları Teşvik Ödülü", TÜBİTAK, Yayın Teşvik Ödülü, Maddi Ödül, Resmi Ödül, Ulusal Düzeyde Ödül, Bilim Alanında, Grup Ödülü, 2004

Son 2 Yıl Verilen Ders/Modül Bilgileri (Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Planning, Applying and Evaluating
Experimental Research (Teorik)

2010-2011 Bahar

Aldığı Sertifikalar

1. "deney hayvanları kursu", Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi, 2009

Üye olunan Mesleki Bilimsel Sanatsal Kuruluşlar

1. Türk İmmunoloji Derneği, 2009
2. TASSA, 2006
3. Uluslararası Soroptimist Derneği, 2004
4. Türk Biyokimya Derneği, 1999
5. Türk Klinik Biyokimya Derneği, 1999

DEÜ Birimlerinde Komisyon ve Kurullarda Görev

1. Sokrates-Erasmus Kurulu, Sağlık Bilimleri Enstitüsü,2009-Devam ediyor
2. AR-GE Komisyonu, Rektörlük,2009-Devam ediyor
3. , Tıp Fakültesi,2009-Devam ediyor

DEÜ Haricinde Kamu Yararına Oluşturulmuş Birimlerde Komisyon ve Kurullarda Görev

1. , 2009-Devam ediyor

Görev Yerleri

1. Doçent : -DEÜ, Tıp Fakültesi Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı Mart 2012-Devam ediyor
2. Yardımcı Doçent : -DEÜ, Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu Kasım 2010-Devam ediyor
3. Öğretim Görevlisi : -DEÜ, İzmir Meslek Yüksekokulu Sağlık Programları Bölümü Temmuz 2009-Devam ediyor
4. Araştırma Görevlisi : -DEÜ, Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eylül 2007-Temmuz 2009
5. UZMAN TABİP : İzmir Bölge Hıfzıssıhha Enstitüsü Müdürlüğü Klinik Biyokimya Laboratuvarları Mayıs 2004-Temmuz 2006
6. Araştırma Görevlisi : -DEÜ, Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Ocak 1999-Mart 2003
7. Tabip : İZMİR KONAK MİTHATPAŞA SAĞ.OC. Eylül 1996-Ocak 1999
8. Tabip : İZMİR KARŞIYAKA SÜHEYL KOCABEY SAĞ.OC. Mart 1996-Eylül 1996
9. Tabip : AFYON SANDIKLI DEVLET HAST. Şubat 1995-Mart 1996
10. Tabip : AFYON SANDIKLI MERK.1 NOLU SAĞ.OCAĞI Aralık 1994-Şubat 1995

Görev Yerleri

11. Tabip : AFYON EVCİLER MERK.SAĞ.OC. Haziran 1994-Aralık 1994

Yönetim - İdari Görevleri

1. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Enstitü Müdür Yardımcısı, Mart 2014-Devam ediyor
2. Uygulama ve Araştırma Hastanesi Başhekim Yardımcısı, Ocak 2013- Aralık 2013

Son 2 Yıl Verilen Ders/Modül Bilgileri (Sağlık Bilimleri Enstitüsü)

Deneysel Araştırmaların Planlanması, Yürütülmesi ve Değerlendirilmesi (Teorik) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2010-2011 Bahar 2011-2012 Güz
Deneysel Araştırma Projelerinin Hazırlanması Değerlendirilmesi (Teorik) Deneysel Araştırmaların Planlanması, Yürütülmesi ve Değerlendirilmesi (Teorik) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2011-2012 Güz 2011-2012 Güz 2011-2012 Bahar
Tez Çalışması (Uygulama) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2011-2012 Yaz okul 2011-2012 Yaz okul
Tez Çalışması (Uygulama) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2012-2013 Güz 2012-2013 Güz
Deneysel Araştırma Projelerinin Hazırlanması Değerlendirilmesi (Teorik) Tez Çalışması (Uygulama) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2012-2013 Güz 2012-2013 Bahar 2012-2013 Bahar
Tez Çalışması (Uygulama) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2012-2013 Yaz okul 2012-2013 Yaz okul
Tez Çalışması (Uygulama) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2013-2014 Güz 2013-2014 Güz
Tez Çalışması (Uygulama) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2013-2014 Bahar 2013-2014 Bahar
Tez Çalışması (Uygulama) Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2013-2014 Yaz okul 2013-2014 Yaz

DEÜ AKADEMİK PERSONEL AKADEMİK ÖZGEÇMİŞ FORMUDoç.Dr.Z.Erbayraktar: 15 / 17
24/11/2014 14:24**Son 2 Yıl Verilen Ders/Modül Bilgileri (Sağlık Bilimleri Enstitüsü)**

	Yüksek Lisans	okul
Tez Çalışması (Uygulama)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2014-2015 Güz
Uzmanlık Alanı (Teorik)	Moleküler Tıp Anabilim Dalı Moleküler Tıp Yüksek Lisans	2014-2015 Güz

Son 2 Yıl Verilen Ders/Modül Bilgileri (Sağlık Hizmetleri Meslek Yüksekokulu)

Örnek Olay Analizi (Teorik)	Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	2010-2011 Bahar
Örnek Olay Analizi (Uygulama)	Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	2010-2011 Bahar
Klinikte Eğitim ve Uygulama I (Teorik)	Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	2011-2012 Güz
Klinikte Eğitim ve Uygulama I (Uygulama)	Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	2011-2012 Güz
Klinikte Eğitim ve Uygulama II (Uygulama)	Tıbbi Laboratuvar Teknikleri	2011-2012 Bahar

Son 2 Yıl Verilen Ders/Modül Bilgileri (Tıp Fakültesi)

DONEM 2 BLOK 1- Sinir bilimleri bloğu (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2010-2011 Güz
DONEM 2 BLOK 1 2009-2010- Sinir bilimleri bloğu (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2010-2011 Güz
DONEM 2 BLOK 1- SİNİR BİLİMLERİ BLOĞU (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2010-2011 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Laboratuvar Uygulaması)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2011-2012 Güz
DONEM 2 BLOK 1 2009-2010- Sinir bilimleri bloğu (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2011-2012 Güz
DONEM 2 BLOK 1- Sinir bilimleri bloğu (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2011-2012 Güz
DONEM 2 BLOK 1- SİNİR BİLİMLERİ BLOĞU (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2011-2012 Güz
DONEM 2 BLOK 3 2009-2010- Tıp bilimlerine giriş 2 kan enfeksiyon Bağışıklık (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2011-2012 Güz
DONEM 2 BLOK 3- Tıp bilimlerine giriş 2 kan enfeksiyon Bağışıklık (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2011-2012 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (TUÖ Dersi)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2012-2013 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Seminer)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2012-2013 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Olgu Tartışması)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2012-2013 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI-	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2012-2013 Güz

Son 2 Yıl Verilen Ders/Modül Bilgileri (Tıp Fakültesi)

BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Laboratuvar Uygulaması)		
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Laboratuvar Saatleri)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2012-2013 Güz
1.BLOK D3- ÜGE201-SBL201 (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2012-2013 Güz
1.BLOK D3- ÜROGENİTAL- ENDOKRİN SİSTEM201-SİNİR BİLİMLERİ BLOGU201 (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2012-2013 Güz
2.BLOK- Lmd101+bya201 (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2012-2013 Güz
3.BLOK- Tbg201+kıb201 (Özel Çalışma Modülü (ÖÇM))	Tıp Doktorluğu	2012-2013 Güz
1. BLOK- sbl101 (Özel Çalışma Modülü (ÖÇM))	Tıp Doktorluğu	2012-2013 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Laboratuvar Saatleri)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2013-2014 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Laboratuvar Uygulaması)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2013-2014 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Olgu Tartışması)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2013-2014 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (TUÖ Dersi)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2013-2014 Güz
SBL2303-SD2304- SBL 201+SD 201 (Uygulama)	Tıp Doktorluğu	2013-2014 Güz
SBL2303-SD2304- SİNİR BİLİMLERİ 201+SOLUNUM DOLAŞIM 201 (Uygulama)	Tıp Doktorluğu	2013-2014 Güz
GBM 1103+BYA 1101 Blok 3- Gis, Beslenme, Metabolizma, Bilgi Yönetimi Araştırma (Uygulama)	Tıp Doktorluğu	2013-2014 Bahar
SBL2303-SD2304- SİNİR BİLİMLERİ 201+SOLUNUM DOLAŞIM 201 (Uygulama)	Tıp Doktorluğu	2013-2014 Bahar
SDK 1104 Blok 4- Solunum, Dolaşım, Kan (Uygulama)	Tıp Doktorluğu	2013-2014 Bahar
GBM 1103+BYA 1101 Blok 3- Gis, Beslenme, Metabolizma, Bilgi Yönetimi Araştırma (Probleme Dayalı Öğrenme (PDÖ))	Tıp Doktorluğu	2013-2014 Bahar
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (Laboratuvar Saatleri)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2014-2015 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI (TUÖ Dersi)	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2014-2015 Güz
BIYOKİMYA ANABİLİM DALI- BIYOKİMYA ANABİLİM DALI	Temel Tıp Bilimleri Biyokimya	2014-2015 Güz

Son 2 Yıl Verilen Ders/Modül Bilgileri (Tıp Fakültesi)

(Laboratuvar Uygulaması)

TBG 1101 Blok 1 2014-2015- Tıp Bilimlerine Giriş 101 (Uygulama)	Tıp Doktorluğu	2014-2015 Güz
SİNİR BİLİMLERİ BLOĞU 2014-2015- SİNİR BİLİMLERİ BLOĞU 101 (Özel Çalışma Modülü (ÖÇM))	Tıp Doktorluğu	2014-2015 Güz

EK-2 ETİK KURUL ONAYI

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURULU

Konu: Karar hk.- 447

25.06.2012

Sayın Prof.Dr.Kürşad GENÇ

Kurulunuz tarafından 21.06.2012 tarih ve 562-GOA protokol numarahı 2012/22-17 karar numarahı ile görüşülen "Eritropoetin'in SHSY-5Y Hücrelerinde Sinyalleme Mekanizmasının Proteomik Yöntemi ile İncelenmesi" 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
GİRİŞİMSEL OLMAYAN ARAŞTIRMALAR ETİK KURUL KARARI

ETİK KOMİSYONUNUN ADI	DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ GİRİŞİMSEL 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:	562-GOA
	ARAŞTIRMA	UZMANLIK TEZİ <input type="checkbox"/> AKADEMİK AMAÇLI <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMANIN AÇIK ADI	Eritropoetin'in SHSY-5Y Hücrelerinde Sinyalleme Mekanizması Üzerine Proteomik Yöntemi ile İncelenmesi
	ARAŞTIRMA PROTOKOL KODU	-
	SORUMLU ARAŞTIRMACI ÜNVANI/ADI/SOYADI ve UZMANLIK ALANI	Prof.Dr.Kürşad GENÇ Sağlık Bilimleri Enstitüsü Sinirbilimler A.D
	DESTEKLEYİCİ VE AÇIK ADRESİ	-
	DESTEKLEYİCİNİN YASAL TEMSİLCİSİ VE ADRESİ	-
	ARAŞTIRMAYA KATILAN MERKEZLER	TEK MERKEZ <input checked="" type="checkbox"/> ÇOK MERKEZLİ <input type="checkbox"/>

DEĞERLENDİRİLEN BELGELER	Belge Adı	Tarihi	Versiyon Numarası	Dili		
	ARAŞTIRMA PROTOKOLÜ	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	ARAŞTIRMA İLE İLGİLİ LİTERATÜR	Mevcut		Türkçe <input type="checkbox"/>	İngilizce <input checked="" type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	BİLGİLENDİRİLMİŞ GÖNÜLLÜ OLUR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>
	OLGU RAPOR FORMU	Mevcut		Türkçe <input checked="" type="checkbox"/>	İngilizce <input type="checkbox"/>	Diğer <input type="checkbox"/>

KARAR BİLGİLERİ	Karar No:2012/22-17	Tarih: 21.06.2012
	Prof.Dr.Kürşad GENÇ'in sorumlusu olduğu "Eritropoetin'in SHSY-5Y Hücrelerinde Sinyal Mekanizmasının Proteomik Yöntemi ile İncelenmesi" isimli klinik araştırmaya ait başvuru dosyası ve ilgili belgeler araştırmanın gerekece, amaç, yaklaşım ve yöntemleri dikkate alınarak incelenmiş ve çalışmanın gerçekleştirilmesinin uygun olduğuna oy birliği ile karar verilmiştir.	

ETİK KURUL BİLGİLERİ	
ÇALIŞMA ESASI	Dokuz Eylül Üniversitesi Girişimsel Olmayan Araştırmalar Etik Kurulu İşleyiş Yönergesi İy 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 <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr..Besti ÜSTÜN (Başkan Yardımcısı)	Ph.D.Yüksek Hemşire	DEU Hemşirelik Fakültesi	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Osman AÇIKGÖZ	Fizyoloji	DEU Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Mehtap MALKOÇ	Ph.D.Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon	DEU Fizik Tedavi ve Rehabilitasyon Yüksekokulu	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ş.Reyhan UÇKU	Halk Sağlığı	DEU Tıp Fakültesi Halk Sağlığı A.D.	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Nejat SARIOSMANOĞLU	Kalp Damar Cerrahisi	DEU Tıp Fakültesi Kalp Damar Cerrahisi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Adnan MENDERES	Plastik Cerrahi	DEU Tıp Fakültesi Plastik Cerrahi Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Ece BÖBER	Pediyatrik Endokrinoloji	DEU Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Hüseyin BASKIN	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Refik MAS	İç Hastalıkları (Geriatri B.D)	DEU Tıp Fakültesi İç Hastalıkları Anabilim Dalı	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Mukaddes GÜNELİ	Tıbbi Farmakoloji	DEU Tıp Fakültesi Tıbbi Farmakoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Ayşe Aydan ÖZKÜTÜK	Mikrobiyoloji	DEU Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Doç.Dr.Işıl TEKMEK	Histoloji ve Embriyoloji	DEU Tıp Fakültesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
Prof.Dr.Meltem Kutlu GÜRSEL	Hukuk	D.E.Ü Hukuk Fakültesi Hukuk Anabilim Dalı	Kadın	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	
İhsan ÇELİKDEMİR	Sağlık mensubu olmayan üye	TE. Mİ. Özel Eğitim Öğretim Müdür Yrd.	Erkek	E <input type="checkbox"/>	H <input checked="" type="checkbox"/>	

Erythropoietin-induced changes in brain gene expression reveal induction of synaptic plasticity genes in experimental stroke

Manuela Mengozzi¹, Ilaria Cervellini², Pia Villa^{3,4}, Zübeyde Erbayraktar⁵, Necati Gökmen⁶, Osman Yilmaz⁶, Serhat Erbayraktar⁵, Mathini Manohasandra³, Paul Van Hummelen^{7,1}, Peter Vandenabeele^{8,9}, Yuti Chernajovsky¹, Alexander Annenkov¹, and Pietro Ghezzi^{1,2}

¹Brighton and Sussex Medical School, Falmer, BN199Y, United Kingdom; ²Istituto Mario Negri, 20157 Milan, Italy; ³Neuroscience Institute, Consiglio Nazionale delle Ricerche, 20129 Milan, Italy; ⁴Dokuz Eylül University, İzmir 35340, Turkey; ⁵MicroArray Facility, Flanders Institute of Biotechnology, 3000 Leuven, Belgium; ⁶Department for Molecular Biomedical Research, Flanders Institute of Biotechnology and ⁷Department of Biomedical Molecular Biology, Ghent University, 9052 Ghent, Belgium; ⁸Bone and Joint Research Unit, William Harvey Research Institute, Barts and The London School of Medicine and Dentistry, Queen Mary University of London, Charterhouse Square, London EC1M 6BQ, United Kingdom

Edited* by Charles A. Dinarello, University of Colorado Denver, Aurora, CO, and approved May 4, 2012 (received for review January 20, 2012)

Erythropoietin (EPO) is a neuroprotective cytokine in models of ischemic and nervous system injury, where it reduces neuronal apoptosis and inflammatory cytokines and increases neurogenesis and angiogenesis. EPO also improves cognition in healthy volunteers and schizophrenic patients. We studied the effect of EPO administration on the gene-expression profile in the ischemic cortex of rats after cerebral ischemia at early time points (2 and 6 h). EPO treatment up-regulated genes already increased by ischemia. Hierarchical clustering and analysis of overrepresented functional categories identified genes implicated in synaptic plasticity—*Arc*, *BDNF*, *Egr1*, and *Egr2*, of which *Egr2* was the most significantly regulated. Up-regulation of *Arc*, *BDNF*, *Dusp5*, *Egr1*, *Egr2*, *Egr4*, and *Nr4a3* was confirmed by quantitative PCR. We investigated the up-regulation of *Egr2/Krox20* further because of its role in neuronal plasticity. Its elevation by EPO was confirmed in an independent in vivo experiment of cerebral ischemia in rats. Using the rat neuroblastoma B104, we found that wild-type cells that do not express EPO receptor (EPOR) do not respond to EPO by inducing *Egr2*. However, EPOR-expressing B104 cells induce *Egr2* early upon incubation with EPO, indicating that *Egr2* induction is a direct effect of EPO and that EPOR mediates this effect. Because these changes occur in vivo before decreased inflammatory cytokines or neuronal apoptosis is evident, these findings provide a molecular mechanism for the neuroreparative effects of cytokines and suggest a mechanism of neuroprotection by which promotion of a plastic phenotype results in decreased inflammation and neuronal death.

microarrays | ischemia-reperfusion injury | neurotrophins | early genes | neuronal cells

Since our first report (1), several studies have documented the neuroprotective effect of erythropoietin (EPO) in models of ischemic and traumatic brain injury (reviewed in refs. 2–4) and the role of endogenous EPO in ischemic preconditioning (5). Multiple mechanisms can account for the action of EPO, including inhibition of neuronal apoptosis (6) and decreased neuroinflammation (7, 8). EPO also activates repair, in particular through promotion of neurogenesis, oligodendrogenesis, and angiogenesis (9, 10), as well as mobilization of endothelial progenitor cells (11). It also improves cognition, long-term potentiation (LTP), and synaptic plasticity (4, 12–14).

However, the early effects of EPO responsible for its neuroprotective activities are not understood, and there even is debate whether the classical EPO receptor (EPOR) alone mediates these effects or an additional tissue-protective coreceptor is required (15–18).

In the study presented here, we investigated the effect of EPO on the gene-expression profile of the brain using the rat model of cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion (MCAO) with which we performed most of the studies on EPO.

To identify early events induced by EPO, experiments were carried out at the time points 2 and 6 h post-MCAO, when ischemic damage is not yet detected by histology. The results obtained show that the early effects of EPO are on genes important for neuronal synaptic plasticity, particularly early growth response 2 (*Egr2*). In vitro experiments using a neuronal cell line show that EPOR is necessary for EPO induction of *Egr2*, clearly demonstrating that EPOR is implicated in the effects of EPO on cells of the nervous system and not just in its erythropoietic activity on erythroid precursors. These results strengthen the evidence of EPO as a tissue-reparative cytokine.

Results

Identification of EPO-Regulated Genes. Three groups of rats were studied: 12 sham-operated rats (S), 12 ischemic rats undergoing MCAO with saline treatment (I), and 12 ischemic rats undergoing MCAO with EPO treatment (IE). Six rats per group were killed 2 h after MCAO, and six rats were killed at 6 h after MCAO, obtaining six experimental groups (S, I, and IE at 2 h and 6 h). Microarray analysis was performed in the ischemic cortex to identify genes differentially expressed in the EPO-treated groups. For microarray analysis, RNA samples were pooled from six rats to obtain three biological replicates per group. Each replicate was obtained from two rats. Each rat contributed to only one pool.

With a cutoff of $P < 0.01$ and of a fold-change of 2 (corresponding to a log base 2 change of 1), strikingly at 6 h EPO induced the expression of only one gene, *Egr2*. At 2 h one gene (*Olr792*, predicted) was up-regulated, and one (*LOC683790*) was down-regulated, but their absolute expression level was very low (just above the 4.2 expression threshold).

Because we intended to use the microarray analysis only as a first discovery step, and we intended to validate and pursue any difference of interest by quantitative PCR (qPCR), we decided to lower the stringency to $P < 0.05/1.5$ -fold to see if there was a discernible pattern in the transcripts affected by EPO. At this stringency, as shown in Table 1, EPO regulated 1.4% and 2.2%

Author contributions: M. Mengozzi, P. Vandenabeele, Y.C., A.A., and P.G. designed research; M. Mengozzi, I.C., P. Villa, Z.E., N.G., O.Y., S.E., M. Manohasandra, P.V.H., P. Vandenabeele, and A.A. performed research; Y.C. and A.A. contributed new reagents/analytic tools; M. Mengozzi, P.V.H., P. Vandenabeele, and P.G. analyzed data; and M. Mengozzi and P.G. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

*This Direct Submission article had a prearranged editor.

Data deposition: The microarray data reported in this paper have been deposited in the Gene Expression Omnibus (GEO), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo> (accession no. GSE33725).

¹Present address: Department of Medical Oncology, Dana Farber Cancer Institute, Boston MA 02115.

²To whom correspondence should be addressed. E-mail: p.ghezzi@bsms.ac.uk.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1200554109/-DCSupplemental.

Table 1. Summary of transcriptional changes by ischemia or ischemia+EPO at 2 and 6 h

Change	Total	Up by EPO	Down by EPO
2 h			
Up by ischemia	385	0	5
Down by ischemia	240	4	0
Unaffected	39,707	7	28
6 h			
Up by ischemia	1,115	25	4
Down by ischemia	442	9	1
Unaffected	37,677	52	19

Expression changes at $P < 0.05$, 1.5-fold, were considered. Ischemia was compared with sham-operated rats, and EPO-treated ischemic rats were compared with ischemia alone.

(at 2 h and 6 h, respectively) of the transcripts affected by ischemia, but only 0.09% and 0.2%, respectively, of those unaffected by ischemia.

At 2 h, EPO up-regulated 11 transcripts (three genes) and down-regulated 33 transcripts (10 genes) (Table S1); neither manual screening nor functional classification analysis using the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) could identify any functional cluster. At 6 h (Table 2; see Table S2 for the full list), EPO up-regulated 86 transcripts (29 genes), and down-regulated 24 transcripts (13 genes).

Hierarchical cluster analysis was performed on the genes regulated by EPO at 6 h (Fig. 1). Transcripts in cluster 1 include *Arc*, *BDNF*, *Ccl7*, *Dusp5*, *Egr2*, and *Egr4*, which already were up-regulated markedly by ischemia and were up-regulated further by EPO. Transcripts in cluster 2 (including *Egr1*, *Fosl2*, and *Nr4a3*) were not regulated significantly by ischemia at 6 h but were up-regulated by ischemia+EPO. Cluster 3 included a few genes whose up-regulation by ischemia was inhibited by EPO, such as *Trem1* and *Atp7a*.

We then used DAVID to identify overrepresented (enriched) functional categories among the EPO-up-regulated genes. The top ranking categories were "regulation of neuronal synaptic plasticity," "behavior," and "learning or memory" (Table 3), comprising genes in clusters 1 and 2 from Fig. 1. No enriched functional categories were identified analyzing the transcripts down-regulated by EPO.

Because we and others had reported that EPO decreased neuroinflammation at later times [24 h after MCAO or later (7, 8, 19, 20)], we were surprised that no inflammatory cytokines or their receptors were among the transcripts down-regulated by EPO. In fact, in agreement with previous studies, ischemia markedly induced several inflammatory genes, including *Il1b*, *Il6*, *Tnf*, and many other cytokines, but their induction was unaffected by EPO (Dataset S1). The only genes with the Gene Ontology (GO) database description "inflammatory response" or "immune response" whose expression was down-regulated significantly by EPO were *Cxcl2* and *Trem1*, whereas *Ccl7* was up-regulated (Table 2 and Dataset S1). Interestingly, *Ccl7* is a chemokine but also belongs to the GO category "behavior." Likewise, because a previous study on PC-12 cells treated with EPO for 24 h reported an up-regulation of anti-apoptotic *Bad*, *Bax*, and *Bcl-xL* (21), we specifically looked for genes related to apoptosis. None of them was affected by EPO, even when transcripts with low (below 4.2) expression levels were taken into account, as can be seen from Dataset S2 that lists all genes with "apoptosis" or "cell death" in the GO.

Validation of Microarray Data by PCR. Selected genes among those significantly up-regulated by EPO at 6 h were validated by qPCR. In this case, unlike the microarray experiment, samples were not pooled, and qPCR analysis was performed on six individual rats per group. We also looked in the dataset for their expression at 2 h. Fig. 2 reports the expression data from the microarrays at 2 h and 6 h (Fig. 2A) and PCR validation at 6 h (Fig. 2B). Both *Egr1* and *Nr4a3*, belonging to cluster 2, were strongly induced

by ischemia at 2 h but returned to the control level by 6 h. The effect of EPO on these genes was to maintain and prolong their otherwise transient induction by ischemia. All the other genes (*Egr2*, *BDNF*, *Arc*, *Dusp5*, and *Egr4*), belonging to cluster 1 were induced by ischemia at 2 h and 6 h and were up-regulated further by EPO at 6 h. All the results obtained by microarrays at 6 h were confirmed by qPCR (Fig. 2B).

EPO-Induced Egr2 mRNA Expression in Neuronal Cells. Our findings on genes involved in synaptic plasticity support the importance of EPO in neurorepair. Because only *Egr2* was identified with the highest stringency analysis (fold-change of 2 and $P < 0.01$), we first sought to reproduce its induction by EPO in vivo in a second, independent cerebral ischemia experiment carried out exactly as the one used for microarray analysis (6 h after MCAO, six rats per group; three groups: sham, ischemia, and ischemia +EPO). *Egr2*, measured by qPCR, was induced significantly in ischemic compared with sham-operated rats (log base 2 expression ratio \pm SD of 1 vs. S: 1.5 ± 1 , $P < 0.05$) and was up-regulated further by EPO in ischemic animals (log base 2 ratio \pm SD, IE vs. I: 0.8 ± 0.5 , $P < 0.05$). Thus, EPO increased *Egr2* in ischemic animals 1.8-fold (log base 2 ratio = 0.8), confirming the results of the first experiment.

Because the microarray experiment did not include a group of rats treated with EPO in the absence of ischemia, we wondered whether EPO directly induced expression of *Egr2* or only up-regulated *Egr2* induced by cerebral ischemia. For this purpose, we treated healthy rats with the same dose of EPO (50 μ g/kg ip.) and measured the expression of *Egr2* in the brain at 2 h and 6 h. The results showed that EPO did not affect *Egr2* expression, compared with that in rats injected with saline alone, at any time point [*Egr2* mRNA levels, log base 2 expression ratio \pm SD, EPO vs. no EPO, $n = 6$; at 2 h: -0.5 ± 0.3 , nonsignificant (ns); at 6 h: 0.3 ± 0.9 , ns]. Therefore, the in vivo effect of EPO on *Egr2* was to modulate its induction by ischemia.

Because change in gene expression in the brain can take place in several cell populations, we investigated in vitro the effect of EPO on *Egr2* in neuronal cells using the rat neuronal cell line B104. Serum-deprived cells were treated with 80 ng/mL EPO, and *Egr2* mRNA expression was measured 1, 3, and 5 h later. In our experiments, EPO did not affect *Egr2* expression in wild-type B104 cells, as measured by qPCR (log base 2 expression ratio \pm SD, EPO vs. no EPO, $n = 3$; at 1 h: 0.01 ± 0.06 , ns; at 3 h: -0.12 ± 0.09 , ns; at 5 h: 0.19 ± 0.06 , ns). However, we found that these cells do not express detectable EPOR by qPCR (fluorescence threshold cycle for EPOR amplification was >38). On the other hand, EPOR is up-regulated in brain injury and ischemia (22). We therefore overexpressed EPOR in B104 cells. As shown in Fig. 3, EPO induced *Egr2* mRNA at 1 h by about 10-fold; then the levels decreased but still were up-regulated (1.6-fold) at 3 h and returned to control level at 5 h. Of note, EPOR-expressing cells showed functional EPOR signaling in terms of autophosphorylation upon EPO treatment (see Fig. S2).

Discussion

Overall, the main transcriptional effect of EPO at early time points was to regulate genes whose expression already was affected by ischemia. For the majority of transcripts, EPO amplified or prolonged the effect of ischemia, which was particularly evident at 6 h, as shown in Table 1, suggesting that EPO potentiates protective or reparative pathways already activated by ischemic injury. In particular, *Egr2* and other genes implicated in synaptic plasticity were up-regulated, or their induction by ischemia was prolonged. Among these genes was *BDNF*, thus confirming reports of its induction by EPO in stroke and experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (9, 23). Although a previous study reported the induction of *Egr1* by EPO in erythroid cells (24), the effect of EPO on *Egr2* was not investigated in that study.

We were surprised to find no effect of EPO on genes related to inflammation or apoptosis, because a previous microarray study in a mouse model of neonatal brain hypoxia/ischemia showed inhibition of these pathways (25). However, the time point used

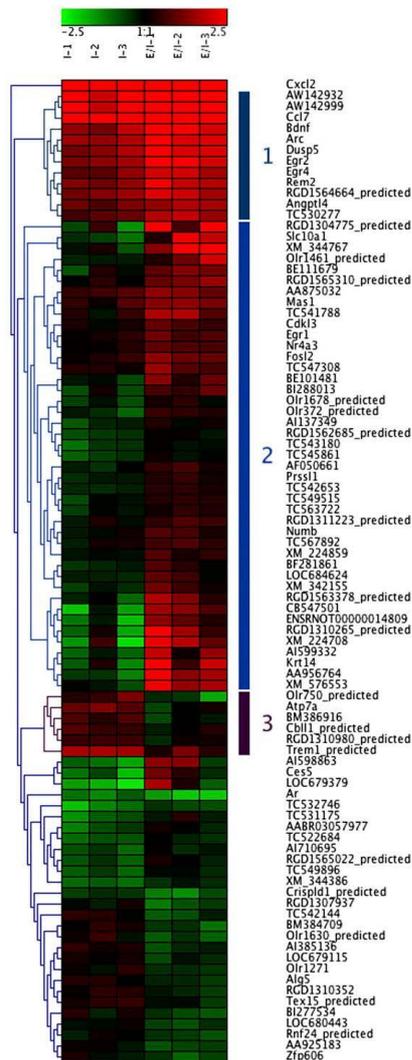


Fig. 1. Cluster analysis. Hierarchical clustering and heat map of the differentially expressed transcripts identified by comparing ischemia+EPO (IE) vs. ischemia alone (I) and setting a threshold of 1.5-fold change, $P < 0.05$. Each sample (pooled RNA from two rats) represents the expression change compared with the mean of three samples from sham-operated rats. Red indicates an increase and green indicates a decrease in expression compared with sham controls. Average linkage clustering analysis was performed using Genesis software.

reduce inflammatory genes at these early time points, one might speculate that neuroinflammation might be a factor that primes the brain for the tissue-protective action of EPO.

Induction of *Egr2* may be important for many central actions of EPO. *Egr2*, also known as “*Krox20*,” is part of the Kruppel-like zinc

Table 3. Functional categories enriched in EPO-up-regulated genes

Category	Fold enrichment	Gene symbols	<i>P</i> value
Regulation of neuronal synaptic plasticity	44.9	BDNF, <i>Egr1</i> , <i>Egr2</i> , <i>Arc</i>	7.9E-05
Behavior	7.8	BDNF, <i>Egr1</i> , <i>Egr2</i> , <i>fosl-2</i> , <i>Nr4a3</i> , <i>CC17</i>	6.6E-04
Learning or memory	16.7	BDNF, <i>Egr1</i> , <i>Egr2</i> , <i>fosl-2</i>	1.5E-03
Zinc finger	45.3	<i>Egr1</i> , <i>Egr2</i> , <i>Egr4</i>	1.7E-03

DAVID Functional Annotation Chart analysis showing the overrepresented (enriched) categories among the genes up-regulated by EPO in rat ischemic cortex at 6 h. The four top categories are shown. Reported are the fold enrichment, the list of the gene symbols, and the significance of the enrichment (*P* value).

finger transcription factor family, which also includes *Egr1*, *Egr3*, and *Egr4* and has several functions that might be important in the pharmacodynamics of EPO in neurological diseases. *Egr* genes are induced by neuronal activity and brain injury, stimuli that cause synaptic plasticity (reviewed in refs. 29 and 30). The most thoroughly studied member of the family is *Egr1*, whose role in synaptic plasticity associated with learning and memory is well documented (30, 31). *Egr2* is induced by neuronal activity (29), but less is known about its specific role. However, *Egr2* was clearly shown to mediate stabilization and maintenance of LTP (32, 33) and cognitive functions associated with attention (34) in models in which *Egr1* was induced only transiently (33) or was not induced (34). Therefore, different members of the *Egr* family might mediate different cognitive functions associated with neuronal plasticity. The finding that EPO preferentially induces *Egr2* in cerebral ischemia might highlight a specific pathway through which EPO induces functional recovery in stroke and improves cognitive functions in diseases such as schizophrenia (35) and multiple sclerosis (12).

Although the molecular mechanisms that link *Egr* induction to long-term effects mediating neuronal plasticity are unknown, *Egr1* and *Egr3* can regulate directly activity-regulated cytoskeleton-associated protein (*Arc*) (36), a plasticity-associated gene involved in the maintenance, but not in the induction, of LTP and consolidation of long-term memory (37). *Arc* can be induced as an early gene, similar to the *Egr*, but also through a protein synthesis-dependent mechanism mediated by *Egr3* (36). Interestingly, *Arc* also is among the genes induced by EPO in our model.

Previous studies have shown that several early genes are up-regulated in cerebral ischemia. Although the most studied are *fos/jun* family members, zinc finger transcription factors, including *Egr2*, also are induced in the brain after permanent (38) or transient (39) ischemia. Studies addressing the role of *fos/jun* in neurotoxicity/neuroprotection have produced apparently contradictory evidence. In particular, *fos/jun* members are implicated in neuronal apoptosis (40), but when *c-fos* is inhibited *in vivo* with antisense oligonucleotides, cerebral ischemia-induced brain damage is increased (41), and ischemia-induced NGF is inhibited (42), suggesting a protective function. There are no studies investigating the role of *Egr2* in stroke by blocking its expression, but indirect evidence for a protective role of *Egr* in stroke is provided by a study showing that these genes are expressed preferentially in surviving neurons compared with neurons committed to die (38). Furthermore, a study carried out at 6 h after ischemia identified *Egr1*, *Egr2*, *Egr4*, and *Nr4a3* among the neuroprotective genes up-regulated by hypothermia in a model of hypothermia-induced neuroprotection in experimental stroke in rats (43). Likewise, *Egr2* protects osteoclasts and T cells from apoptosis (44, 45) and therefore might contribute to the well-known antiapoptotic effect of EPO (46).

Further studies in which *Egr2* in the CNS is inhibited by either conditional knockout or antisense oligonucleotides will be necessary, and are feasible, to investigate the relevance of *Egr2*, and

Cell Culture. The rat neuroblastoma B104 cell line and the genetically modified B104-EPOR cell line were cultured in DMEM (PAA Laboratories) supplemented with 10% (vol/vol) FBS (Invitrogen). When treated with EPO, cells were switched to medium without serum with 5 µg/mL insulin, 5 µg/mL transferrin, and 5 ng/mL selenium (Sigma-Aldrich). Total RNA was extracted with TRIzol (Invitrogen), and reverse transcription and qPCR were done as above.

Generation of Genetically Modified B104-EPOR Cells. B104 cells were genetically modified to express EPOR (B104-EPOR) constitutively. Production of lentivector particles, gene transfer, and cloning of B104 cells were performed as described (52). Expression and EPO-induced activation of EPOR in transduced cells is shown in Fig. S2. A more detailed description of the techniques used for

molecular cloning and to detect expression and activation of EPOR in B104-EPOR cells is included in *SI Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Joke Allemeersch (Flanders Institute for Biotechnology) for help with analyzing the data and Sara Triulzi (Mario Negri Institute) for help with animal experiments. This work was supported by the Interuniversity Poles of Attraction Program-Belgian Science Policy Grant P5/12 and by the European Regional Development Fund Grant Trans Channel Neuroscience Network (TC2N) (to P. Vandenberghe and P.G.). P.G. is supported by the Brighton and Sussex Medical School and the R. M. Phillips Charitable Trust. P. Vandenberghe is holder of a Methusalem grant (BOF09/01M00709) from the Flemish Government. Y.C. and A.A. are supported by the National Multiple Sclerosis Society-USA (Promise 2010).

- Brines ML, et al. (2000) Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:10526–10531.
- Brines M, Cerami A (2005) Emerging biological roles for erythropoietin in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* 6:484–494.
- Byts N, Sirén AL (2009) Erythropoietin: A multimodal neuroprotective agent. *Exp Transl Stroke Med* 1:4.
- Sargin D, Friedrichs H, El-Kordy A, Ehrenreich H (2010) Erythropoietin as neuroprotective and neuroregenerative treatment strategy: Comprehensive overview of 12 years of preclinical and clinical research. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* 24:573–594.
- Pacary E, Petit E, Bernaudin M (2006) Erythropoietin, a cytoprotective and regenerative cytokine, and the hypoxic brain. *Neurodegener Dis* 3:87–93.
- Sirén AL, et al. (2001) Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:4044–4049.
- Villa P, et al. (2007) Reduced functional deficits, neuroinflammation, and secondary tissue damage after treatment of stroke by nonerythropoietic erythropoietin derivatives. *J Cereb Blood Flow Metab* 27:552–563.
- Villa P, et al. (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med* 198:971–975.
- Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004) Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35:1732–1737.
- Zhang L, et al. (2010) Erythropoietin amplifies stroke-induced oligodendrogenesis in the rat. *PLoS ONE* 5:e11016.
- Bahlmann FH, et al. (2004) Erythropoietin regulates endothelial progenitor cells. *Blood* 103:921–926.
- Ehrenreich H, et al. (2007) Exploring recombinant human erythropoietin in chronic progressive multiple sclerosis. *Brain* 130:2577–2588.
- Adamio B, et al. (2008) Erythropoietin enhances hippocampal long-term potentiation and memory. *BMC Biol* 6:37.
- Ehrenreich H, Bartels C, Sargin D, Stawicki S, Krampe H (2008) Recombinant human erythropoietin in the treatment of human brain disease: Focus on cognition. *J Ren Nutr* 18:146–153.
- Brines M, et al. (2004) Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:14907–14912.
- Um M, Gross AW, Lodish HF (2007) A “classical” homodimeric erythropoietin receptor is essential for the antiapoptotic effects of erythropoietin on differentiated neuroblastoma SH-SY5Y and pheochromocytoma PC-12 cells. *Cell Signal* 19:634–645.
- Brines M, Cerami A (2008) Erythropoietin-mediated tissue protection: Reducing collateral damage from the primary injury response. *J Intern Med* 264:405–432.
- Ghezzi P, et al. (2010) Erythropoietin: Not just about erythropoiesis. *Lancet* 375:2142.
- Sun Y, Calvert JW, Zhang JH (2005) Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. *Stroke* 36:1672–1678.
- Wang Y, et al. (2007) Post-ischemic treatment with erythropoietin or carbamylated erythropoietin reduces infarction and improves neurological outcome in a rat model of focal cerebral ischemia. *Br J Pharmacol* 151:1377–1384.
- Renzi MJ, et al. (2002) Erythropoietin induces changes in gene expression in PC-12 cells. *Brain Res Mol Brain Res* 104:86–95.
- Taufik E, et al. (2008) TNF receptor 1 sensitizes neurons to erythropoietin- and VEGF-mediated neuroprotection after ischemic and excitotoxic injury. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:6185–6190.
- Zhang J, et al. (2005) Erythropoietin treatment improves neurological functional recovery in EAE mice. *Brain Res* 1034:34–39.
- Fang J, et al. (2007) EPO modulation of cell-cycle regulatory genes, and cell division, in primary bone marrow erythroblasts. *Blood* 110:2361–2370.
- Juul SE, et al. (2009) Microarray analysis of high-dose recombinant erythropoietin treatment of unilateral brain injury in neonatal mouse hippocampus. *Pediatr Res* 65:485–492.
- Savino C, et al. (2006) Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 172:27–37.
- Brines M, Cerami A (2012) The receptor that tames the innate immune response. *Mol Med* 18:486–496.
- Meistrell ME, 3rd, et al. (1997) Tumor necrosis factor is a brain damaging cytokine in cerebral ischemia. *Shock* 8:341–348.
- O'Donovan KJ, Touretlotte WG, Millbrandt J, Baraban JM (1999) The EGR family of transcription-regulatory factors: Progress at the interface of molecular and systems neuroscience. *Trends Neurosci* 22:167–173.
- Pérez-Cadahia B, Drobic B, Davie JR (2011) Activation and function of immediate-early genes in the nervous system. *Biochem Cell Biol* 89:61–73.
- Worley PF, et al. (1993) Thresholds for synaptic activation of transcription factors in hippocampus: Correlation with long-term enhancement. *J Neurosci* 13:4776–4786.
- Inokuchi K, Murayama A, Ozawa F (1996) mRNA differential display reveals Krox-20 as a neural plasticity-regulated gene in the rat hippocampus. *Biochem Biophys Res Commun* 221:430–436.
- Williams J, et al. (1995) Krox20 may play a key role in the stabilization of long-term potentiation. *Brain Res Mol Brain Res* 28:87–93.
- DeSteno DA, Schmauss C (2008) Induction of early growth response gene 2 expression in the forebrain of mice performing an attention-set-shifting task. *Neuroscience* 152:417–428.
- Ehrenreich H, et al. (2007) Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. *Mol Psychiatry* 12:206–220.
- Li L, Carter J, Gao X, Whitehead J, Touretlotte WG (2005) The neuroplasticity-associated arc gene is a direct transcriptional target of early growth response (Egr) transcription factors. *Mol Cell Biol* 25:10286–10300.
- Guzowski JF, et al. (2000) Inhibition of activity-dependent arc protein expression in the rat hippocampus impairs the maintenance of long-term potentiation and the consolidation of long-term memory. *J Neurosci* 20:3993–4001.
- Honkanieni J, Sharp FR (1996) Global ischemia induces immediate-early genes encoding zinc finger transcription factors. *J Cereb Blood Flow Metab* 16:557–565.
- An G, Lin TN, Liu JS, Hsu CY (1992) Induction of Krox-20 expression after focal cerebral ischemia. *Biochem Biophys Res Commun* 188:1104–1110.
- Ham J, et al. (1995) A c-Jun dominant negative mutant protects sympathetic neurons against programmed cell death. *Neuron* 14:927–939.
- Zhang Y, Widmayer MA, Zhang B, Cui JK, Baskin DS (1999) Suppression of post-ischemic-induced fos protein expression by an antisense oligonucleotide to c-fos mRNA leads to increased tissue damage. *Brain Res* 832:112–117.
- Cui JK, Hsu CY, Liu PK (1999) Suppression of postischemic hippocampal nerve growth factor expression by a c-fos antisense oligodeoxynucleotide. *J Neurosci* 19:1335–1344.
- Ohta H, Terao Y, Shintani Y, Kiyota Y (2007) Therapeutic time window of post-ischemic mild hypothermia and the gene expression associated with the neuroprotection in rat focal cerebral ischemia. *Neurosci Res* 57:424–433.
- Bradley EW, Ruan MM, Oursler MJ (2008) Novel pro-survival functions of the Kruppel-like transcription factor Egr2 in promotion of macrophage colony-stimulating factor-mediated osteoclast survival downstream of the MEK/ERK pathway. *J Biol Chem* 283:8055–8064.
- Lawson VJ, Weston K, Maurice D (2010) Early growth response 2 regulates the survival of thymocytes during positive selection. *Eur J Immunol* 40:232–241.
- Ghezzi P, Brines M (2004) Erythropoietin as an antiapoptotic, tissue-protective cytokine. *Cell Death Differ* 11(Suppl 1):S37–S44.
- Kendziorski C, Irizarry RA, Chen KS, Haag JD, Gould MN (2005) On the utility of pooling biological samples in microarray experiments. *Proc Natl Acad Sci USA* 102:4252–4257.
- Allison DB, Cui X, Page GP, Sabripour M (2006) Microarray data analysis: From disarray to consolidation and consensus. *Nat Rev Genet* 7:55–65.
- Servant N, et al. (2010) EMA – A R package for Easy Microarray data analysis. *BMC Res Notes* 3:277.
- Huang W, Sherman BT, Lempicki RA (2009) Bioinformatics enrichment tools: Paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res* 37:1–13.
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* 25:402–408.
- Annenkov A, et al. (2011) A chimeric receptor of the insulin-like growth factor receptor type 1 (IGFR1) and a single chain antibody specific to myelin oligodendrocyte glycoprotein activates the IGF1R signalling cascade in CG4 oligodendrocyte progenitors. *Biochim Biophys Acta* 1813:1428–1437.

Supporting Information

Mengozzi et al. 10.1073/pnas.1200554109

SI Methods

Generation of Lentivectors Expressing Erythropoietin Receptor. A DNA sequence encoding mouse erythropoietin receptor (EPOR) was amplified by PCR from mouse thymic cDNA using Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Promega) at 1 mM MgSO₄. The forward primer 5' ATGGACAACTCAGGGTG and the reverse primer 5' CTAGGAGCAGGCCACATA were used, and 40 amplification cycles of 94 °C for 15 s, 60 °C for 30 s, and 68 °C for 1 min 45 s were completed. The PCR product was treated with Taq polymerase (Promega) before subcloning in pCR2.1 (Invitrogen). A DNA fragment encoding EPOR for subcloning in a lentivector was amplified by PCR from one of the resulting clones. In the PCR product, the coding sequence was flanked at the 5' end with a SpeI restriction site, which was copied from the multiple cloning sequence of pCR2.1 because the M13 reverse primer was used as a forward primer. At the 3' end of the coding sequence, the BstBI site (underlined) was incorporated by the reverse primer 5' CGTAGCTTCGAAGGAGCAGGCCACATAGC to facilitate subcloning in frame with the V5 epitope. Platinum *Pfx* DNA Polymerase (Promega) was used at 1 mM MgSO₄, and 35 amplification cycles of 94 °C for 15 s, 50 °C for 30 s, and 68 °C for 1 min 45 s were completed. The PCR product was subcloned, between SpeI and BstBI sites, in the constitutive self-inactivating lentivector with the spleen focus-forming virus promoter (1) modified by us to include the V5 epitope, the mouse encephalomyocarditis internal ribosome entry site, and EGFP (2). Correct sequences of inserts were confirmed by DNA sequence analysis at the Genome Centre, Queen Mary University of London.

Production of lentivector particles, gene transfer, and cloning of B104 cells were performed as described previously (2).

EPOR Expression and Activation in B104-EPOR Cells. The expression of EPOR in transduced cells was detected as described for other V5-tagged recombinant proteins (2). Briefly, cells were lysed with the buffer containing 10 mM Tris (pH 7.4), 100 mM NaCl, 50 mM NaF, 0.1% SDS, 1% Triton-X 100 (all from VWR), 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 20 mM Na₄P₂O₇, 2 mM Na₃VO₄, 0.5% sodium deoxycholate, 10% glycerol, and 1 mM PMSF (all from Sigma), and the protease inhibitor mixture (Calbiochem). Cell lysates were separated by PAGE in the presence of 5% β-mercaptoethanol. EPOR was detected by immunoblotting with the anti-V5 mouse monoclonal antibody (Invitrogen).

To determine EPOR activation in response to erythropoietin (EPO), EPOR-expressing B104 cells were cultured until 90% confluent in six-well plates, serum-starved for 4 h, and stimulated or mock-stimulated with 50 ng/mL of human recombinant EPO (Peprotec) for 15 or 30 min. Lysates of control and stimulated cells were immunoprecipitated with rabbit polyclonal anti-EPOR antibody (Santa Cruz Biotechnology) and immunoblotted with a mixture of the phosphotyrosine-specific mouse mAbs pY20 (Abcam) and 4G10 (Millipore), 1 mg/mL each (anti-pY). After stripping at low pH, the blots were reprobed with anti-V5. Immunoblots were developed as described (2) using HRP-conjugated F(ab')₂ fragment of rabbit anti-mouse IgG (Zymed Laboratories) as a secondary antibody.

1. Demaison C, et al. (2002) High-level transduction and gene expression in hematopoietic repopulating cells using a human immunodeficiency virus type 1-based lentiviral vector containing an internal spleen focus forming virus promoter. *Hum Gene Ther* 13:803–813.

2. Annenkov A, et al. (2011) A chimeric receptor of the insulin-like growth factor receptor type 1 (IGFR1) and a single chain antibody specific to myelin oligodendrocyte glycoprotein activates the IGF1R signalling cascade in C64 oligodendrocyte progenitors. *Biochim Biophys Acta* 1813:1428–1437.

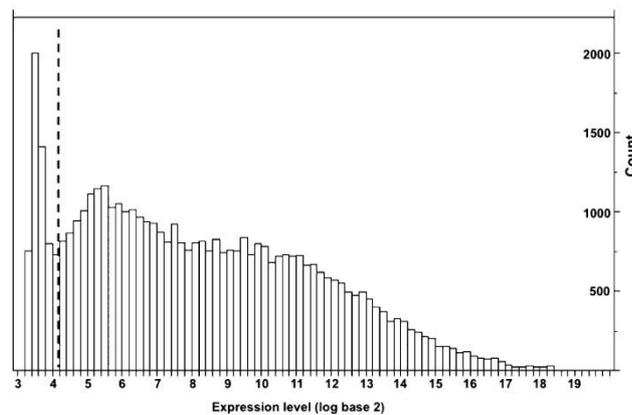


Fig. S1. Frequency distribution of expression data. The dashed vertical line shows the arbitrary threshold of 4.2 used to filter out low-expression transcripts.

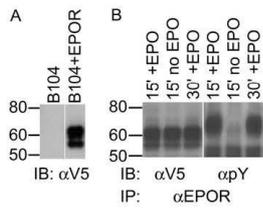


Fig. S2. Expression and activation of EPOR in B104 cells. (A) Untransduced B104 cells and the clone of EPOR-transduced B104 cells were lysed, and EPOR expression in cell lysates was determined by immunoblotting with anti-V5. (B) The clone of EPOR-expressing B104 cells was treated with EPO (50 ng/mL) for 15 or 30 min or was mock-stimulated for 15 min. EPOR was immunoprecipitated (IP) from cell lysates with anti-EPOR, separated by PAGE, and immunoblotted (IB) with anti-pY. The membranes were stripped and reprobed with anti-V5.

Table S1. Transcripts significantly changed by EPO in ischemic cortex at 2 h and relative changes in ischemia versus sham

Gene symbol	Accession number	Ischemia+EPO vs. ischemia		Ischemia vs. sham	
		Fold change	P value	Fold change	P value
Up-regulated					
XM_226521*	XM_226521	1.46	0.0173	-1.31	0.0395
Olr792_predicted	NM_001000378	1.45	0.0037	-0.64	0.0038
BF565770*	BF565770	1.33	0.0378	ns	—
Al010145*	Al010145	1.15	0.0119	ns	—
TC533613*	TC533613	1.14	0.0438	-0.55	0.0493
AA891571*	AA891571	1.11	0.0324	-1.28	0.0144
CB762850*	CB762850	1.05	0.0392	-0.96	0.0488
Cyp2a2	NM_012693	1.04	0.0179	ns	—
Al230744*	Al230744	0.90	0.0395	ns	—
Al599572*	Al599572	0.72	0.0262	ns	—
Jak3	NM_012855	0.59	0.0278	ns	—
Down-regulated					
XM_226554*	XM_226554	-2.04	0.0012	1.44	0.0040
Olr529_predicted	NM_001000674	-1.56	0.0128	ns	—
Al231805*	Al231805	-1.53	0.0054	ns	—
Olr153_predicted	NM_001000167	-1.50	0.0184	ns	—
BE107503*	BE107503	-1.38	0.0253	ns	—
LOC683790	XM_001067479	-1.33	0.0008	0.92	0.0027
RGD1560913_predicted	XM_574627	-1.29	0.0206	1.32	0.0107
BE117594*	BE117594	-1.14	0.0435	ns	—
BQ201357*	BQ201357	-1.03	0.0447	ns	—
AA818700*	AA818700	-0.93	0.0165	ns	—
AA858950*	AA858950	-0.92	0.0380	ns	—
Aqp6	NM_022181	-0.92	0.0238	ns	—
Al113235*	Al113235	-0.89	0.0345	ns	—
LOC684560	XM_001070979	-0.87	0.0352	ns	—
RGD1559517_predicted	XM_227127	-0.86	0.0366	0.67	0.0392
BG672648*	BG672648	-0.85	0.0308	ns	—
A_44_P630635*	A_44_P630635	-0.85	0.0270	ns	—
BE105878*	BE105878	-0.82	0.0441	1.08	0.0019
ENSRNOT00000038661	ENSRNOT00000038661	-0.81	0.0341	ns	—
Bmpr2 [†]	XM_217409	-0.79	0.0040	ns	—
BF567165	BF567165	-0.76	0.0273	ns	—
AA900594*	AA900594	-0.74	0.0136	ns	—
BE104341*	BE104341	-0.70	0.0424	ns	—
RGD1561261_predicted	XM_001053212	-0.70	0.0399	ns	—
Kcnd3 [†]	NM_031739	-0.69	0.0465	ns	—
TC533561*	TC533561	-0.68	0.0014	ns	—
Igf1 [†]	NM_178866	-0.67	0.0283	ns	—
TC562057*	TC562057	-0.67	0.0052	ns	—
Odz3_predicted [†]	XM_224841	-0.65	0.0473	ns	—
LOC685076 [†]	XM_001062178	-0.63	0.0460	ns	—
TC558054*	TC558054	-0.62	0.0037	ns	—
BF545795*	BF545795	-0.61	0.0361	ns	—
BQ200021*	BQ200021	-0.59	0.0473	ns	—

Fold change is expressed as log₂ ratio and is the average of triplicate samples. All transcripts changed more than 1.5-fold, P < 0.05 in ischemia+EPO vs. ischemia are included, and the relative changes in ischemia vs. sham are reported. ns, not significant.

*Unmapped probe IDs.

[†]Transcripts identified by different probes/replicates, of which only one probe/replicate changed significantly.

Table S2. Transcripts significantly changed by EPO in ischemic cortex at 6 h and relative changes in ischemia versus sham

Gene symbol	Accession number	Ischemia+EPO vs. Ischemia		Ischemia vs. sham	
		Fold change	P value	Fold change	P value
Up-regulated					
RGD1304775_predicted	XM_237151	2.80	0.0469	ns	—
XM_344767*	XM_344767	2.76	0.0183	ns	—
XM_224708*	XM_224708	2.74	0.0429	ns	—
AA956764*	AA956764	2.60	0.0029	ns	—
CB547501*	CB547501	2.50	0.0129	ns	—
RGD1310265_predicted	XM_001070727	2.38	0.0423	ns	—
Krt14	D63774	2.32	0.0377	ns	—
Slc10a1	NM_017047	2.28	0.0273	ns	—
LOC679379	XM_001055377	2.23	0.0468	ns	—
XM_576553*	XM_576553	2.19	0.0035	ns	—
ENSRNOT00000014809	ENSRNOT00000014809	2.02	0.0229	ns	—
AI598863*	AI598863	1.96	0.0483	-1.25	0.0051
AI599332*	AI599332	1.93	0.0323	ns	—
Ces5	XM_341636	1.62	0.0479	ns	—
RGD1563378_predicted	XM_228994	1.60	0.0342	ns	—
Olr1461_predicted	NM_001000022	1.46	0.0476	ns	—
BE111679*	BE111679	1.33	0.0210	ns	—
BE101481*	BE101481	1.26	0.0251	ns	—
TC541788*	TC541788	1.22	0.0341	ns	—
BI288013*	BI288013	1.21	0.0287	ns	—
RGD1565310_predicted [†]	XM_343014	1.12	0.0064	ns	—
Bdnf	NM_012513	1.08	0.0323	1.49	0.0026
Bdnf	NM_012513	1.07	0.0450	1.47	0.0048
Bdnf	NM_012513	1.07	0.0390	1.58	0.0049
XM_342155*	XM_342155	1.05	0.0276	ns	—
Bdnf	NM_012513	1.05	0.0483	1.49	0.0040
Bdnf	NM_012513	1.02	0.0419	1.54	0.0033
Bdnf	NM_012513	1.02	0.0405	1.50	0.0023
TC531175*	TC531175	1.02	0.0290	-1.06	0.0119
AW142999*	AW142999	1.01	0.0400	2.38	0.0007
Dusp5	NM_133578	1.01	0.0333	1.42	0.0018
AW142932*	AW142932	1.01	0.0408	2.35	0.0003
Egr2	NM_053633	1.01	0.0077	1.42	0.0089
Olr372_predicted	NM_001001048	1.00	0.0153	ns	—
TC530277*	TC530277	0.89	0.0071	0.86	0.0180
Arc	NM_019361	0.88	0.0433	1.57	0.0008
Arc	NM_019361	0.87	0.0475	1.60	0.0003
Arc	NM_019361	0.86	0.0461	1.59	0.0004
Arc	NM_019361	0.86	0.0439	1.60	0.0006
Fosl2	NM_012954	0.86	0.0099	ns	—
Mas1	NM_012757	0.85	0.0188	ns	—
Arc	NM_019361	0.85	0.0439	1.59	0.0005
Egr4	NM_019137	0.85	0.0253	1.08	0.0066
Arc	NM_019361	0.85	0.0459	1.58	0.0001
LOC684624	XM_001070871	0.84	0.0472	ns	—
Arc	NM_019361	0.84	0.0396	1.61	0.0003
BF281861*	BF281861	0.80	0.0299	ns	—
AABR03057977*	AABR03057977	0.80	0.0449	-0.87	0.0438
TC532746*	TC532746	0.77	0.0407	-1.44	0.0045
TC542653*	TC542653	0.77	0.0003	ns	—
RGD1565022_predicted [†]	XM_216007	0.76	0.0287	ns	—
TC547308*	TC547308	0.76	0.0496	ns	—
Rem2	NM_022685	0.75	0.0183	1.29	0.0192
AF050661*	AF050661	0.74	0.0268	ns	—
Olr1678_predicted	NM_001000893	0.73	0.0395	ns	—
TC549515*	TC549515	0.72	0.0319	ns	—
Prss11	NM_001003956	0.68	0.0057	ns	—
Nr4a3	NM_031628	0.68	0.0152	ns	—
AI137349*	AI137349	0.67	0.0406	ns	—
XM_224859	XM_224859	0.66	0.0169	ns	—

Table S2. Cont.

Gene symbol	Accession number	Ischemia+EPO vs. ischemia		Ischemia vs. sham	
		Fold change	P value	Fold change	P value
TC545861*	TC545861	0.65	0.0175	-0.69	0.0318
Numb [†]	DQ336705	0.65	0.0409	ns	—
XM_344386*	XM_344386	0.65	0.0040	-1.02	0.0072
TC549896*	TC549896	0.65	0.0233	-0.84	0.0182
RGD1311223_predicted	XM_345971	0.65	0.0300	ns	—
TC543180*	TC543180	0.65	0.0373	-0.73	0.0220
TC522684*	TC522684	0.64	0.0209	-0.91	0.0018
Nr4a3	DQ268830	0.64	0.0040	ns	—
Egr1	NM_012551	0.63	0.0326	ns	—
TC563722*	TC563722	0.63	0.0340	ns	—
Egr1	NM_012551	0.62	0.0239	ns	—
Cd7	NM_001007612	0.62	0.0195	2.65	0.0064
Egr1	NM_012551	0.62	0.0225	ns	—
Cdk3	NM_021772	0.61	0.0274	ns	—
Egr1	NM_012551	0.61	0.0190	ns	—
RGD1564664_predicted [†]	XM_575179	0.60	0.0472	1.34	0.0007
RGD1562685_predicted	XM_231463	0.60	0.0099	ns	—
Egr1	NM_012551	0.60	0.0267	ns	—
Egr1	NM_012551	0.60	0.0382	ns	—
Ai710695*	Ai710695	0.60	0.0491	ns	—
AA875032*	AA875032	0.59	0.0226	0.67	0.0057
Egr1	NM_012551	0.59	0.0326	ns	—
Angptl4	NM_199115	0.59	0.0285	1.02	0.0123
TC567892*	TC567892	0.59	0.0466	ns	—
Cd7	NM_001007612	0.58	0.0298	2.84	0.0008
Egr1	NM_012551	0.58	0.0341	ns	—
Down-regulated					
Olr750_predicted	NM_001000366	-1.56	0.0321	ns	—
Atp7a	NM_052803	-1.21	0.0159	ns	—
Trem1_predicted	XM_217336	-1.03	0.0243	1.67	0.0057
Olr1630_predicted	NM_001000092	-0.97	0.0240	ns	—
BM386916*	BM386916	-0.96	0.0173	0.64	0.0139
BM384709*	BM384709	-0.95	0.0168	ns	—
TC542144*	TC542144	-0.94	0.0194	ns	—
RGD1307937	NM_001013877	-0.82	0.0265	ns	—
Ai385136*	Ai385136	-0.79	0.0137	ns	—
Bi277534*	Bi277534	-0.78	0.0381	ns	—
RGD1310352	XM_220404	-0.71	0.0141	ns	—
Ar [†]	NM_012502	-0.71	0.0234	-1.13	0.0299
Alg5 [†]	NM_001025407	-0.69	0.0074	ns	—
AA925183*	AA925183	-0.69	0.0046	ns	—
Zfp606	XM_218283	-0.67	0.0429	ns	—
Tex15_predicted [†]	XM_214365	-0.66	0.0258	ns	—
Cxcl2	NM_053647	-0.65	0.0369	6.49	1.4E-07
Cbll1_predicted [†]	XM_001073155	-0.61	0.0488	0.64	0.0053
LOC679115	XM_001054757	-0.60	0.0235	ns	—
Olr1271 [†]	NM_173300	-0.60	0.0260	ns	—
RGD1310980_predicted	XM_343381	-0.60	0.0358	ns	—
LOC680443	XM_001057208	-0.60	0.0115	ns	—
Rnf24_predicted	XM_342522	-0.59	0.0243	ns	—
Crispld1_predicted	XM_237258	-0.59	0.0491	ns	—

Fold change is expressed as log₂ ratio and is the average of triplicate samples. All transcripts changed more than 1.5-fold, P < 0.05 in ischemia+EPO vs. ischemia are included, and the relative changes in ischemia vs. sham are reported. The table includes replicates identifying the same genes. ns, not significant. [†]Unmapped probe IDs. [‡]Transcripts identified by different probes/replicates, of which only one probe/replicate significantly changed. These transcripts were not included in Table 2.

Other Supporting Information Files

[Dataset S1 \(XLSX\)](#)
[Dataset S2 \(XLSX\)](#)

Nonerythropoietic Tissue Protective Compounds Are Highly Effective Facilitators of Wound Healing

Zübeyde Erbayraktar,¹ Serhat Erbayraktar,¹ Osman Yılmaz,¹ Anthony Cerami,² Thomas Coleman,³ and Michael Brines²

¹Dokuz Eylül University, Izmir, Turkey; ²Warren Pharmaceuticals, Ossining, New York, United States of America; ³The Feinstein Institute for Medical Research, Manhasset, New York, United States of America

Erythropoietin (EPO) is a type I cytokine that utilizes different receptor isoforms either to maintain hematopoiesis or protect against injuries that arise from widely diverse etiologies. EPO also facilitates healing by reducing inflammation and mobilizing endothelial progenitor cells to participate in restorative neoangiogenesis, but it is unclear which EPO receptor isoform is responsible for healing and whether this receptor use varies according to the type of wound. In the present studies carried out in the rat, we have utilized receptor-selective derivatives of EPO to determine which receptor type operates in (i) a nonischemic wound (skin punch biopsy), (ii) a permanently ischemic wound (raised musculocutaneous flap), (iii) an intermittent ischemic reperfusion wound (pressure or decubitus ulcer), or (iv) wounds complicated by infection (cecal ligation and perforation). Using these models, we demonstrate that nonerythropoietic tissue protective compounds administered immediately following injury limit wound size and accelerate eschar closure independent of wound type. Moreover, in a model of peritonitis-induced adhesions, daily administration of the nonerythropoietic derivative carbamyl-EPO (10 µg/kg-bw) was associated with significantly lower serum TNF α concentration, illness scores, increased survival, as well as decreased adhesion formation. These results confirm that wound healing is mediated by the tissue protective receptor isoform and argue that nonerythropoietic tissue protective molecules constitute promising new therapeutics for treatment of a wide variety of surgical wounds.

© 2009 The Feinstein Institute for Medical Research, www.feinsteininstitute.org

Online address: <http://www.molmed.org>

doi: 10.2119/molmed.2009.00051

INTRODUCTION

Erythropoietin (EPO) is a well-known stimulator of erythrocyte production and widely used in the treatment of anemia caused by kidney disease, cancer, or chronic inflammation (reviewed by Jelkmann [1]). Over the past decade, it has become evident that EPO also possesses many other biological activities that can generally be summarized as counteracting the actions of proinflammatory cytokines and their deleterious effects in tissue injury (reviewed by Brines and Cerami [2]). In these nonhematopoietic activities, EPO is locally produced in the immediate vicinity of the injury.

Cross-talk between the circulating hematopoietic and the local tissue protec-

tive pools of EPO is avoided by the presence of EPO receptor isoforms that differ greatly in their affinity for EPO. Specifically, the hematopoietic receptor is a homodimer composed of identical EPO receptor (EPOR) subunits that maintains erythropoiesis in response to circulating levels of EPO in the 1–10 pMolar range (3). In contrast, the tissue protective receptor is postulated to be a heteromer formed by EPOR in assembly with CD131, the β common receptor which also is used by GM-CSF, IL-3, IL-5, and other type I cytokines (4). The tissue protective receptor exhibits a lower affinity for EPO (2–20 nM) and therefore does not respond to EPO at concentrations present within the circulation, but rather only to

high levels of locally produced EPO. An additional important functional separation between the hematopoietic and tissue protective systems arises from the difference in basal expression of the corresponding receptors. In hematopoiesis, the homodimer is expressed continuously by a population of red cell precursors that require constant circulating EPO to enable survival. In contrast, the tissue protective receptor typically is not expressed until after the occurrence of injury or significant metabolic stress and only requires a brief exposure to EPO to trigger sustained biological activity (2).

When employed at the high doses required for adequate tissue protection, EPO unfortunately possesses use-limiting side effects, particularly in converting the vasculature into a prothrombotic state, which leads to an increased risk of life-threatening thromboses, as has been observed particularly for injured patients (5) or those with cancer (6). The identification of distinct hematopoietic and tis-

Address correspondence and reprint requests to Michael Brines, Warren Pharmaceuticals, 712 Kitchawan Road, Ossining, NY 10562. Phone: 914-762-7586; Fax: 914-762-4000; E-mail: mbrines@warrenpharma.com.

Submitted April 9, 2009; Accepted for publication April 16, 2009; Epub (www.molmed.org) ahead of print April 16, 2009.

sue protective EPO receptor isoforms initiated the quest for molecules that exhibit a high specificity for the tissue protective receptor subtype to avoid the adverse effects associated with EPO therapy. As a result, a number of nonerythropoietic tissue protective compounds (TPCs) have been developed that interact exclusively with the tissue protective receptor, including carbamyl-EPO (7), as well as peptides that mimic the three dimensional structure of EPO (8), for example, pyroglutamate-helix B surface peptide (ARA 290, Araim Pharmaceuticals, Ossining, NY, USA). The utilization of these reagents has led to an understanding of the major differences in biological effects of the hematopoietic and tissue protective receptors. For example, while the hematopoietic EPO receptor activates the endothelium into a prothrombotic state, increases platelet number and reactivity, and increases systemic blood pressure via constriction of vascular smooth muscle, the tissue protective EPO receptor activates none of these activities (9).

Among the pleiotropic effects of EPO reported, a number of investigators have reported significant activity of EPO in promoting the healing of ischemic raised cutaneous skin flaps (10-14), ischemia-reperfusion in random musculocutaneous flaps (15), incisional wounds (10,13), and in colonic anastomoses (16,17). Additionally, skin thermal burns also have been reported to respond in a beneficial way to EPO (18). In other models, EPO has been shown to increase the formation and quality of granulation tissue (19). In contrast to the direct, nonhematopoietic actions, it has been postulated that EPO can benefit healing of chronic wounds by augmenting the delivery of oxygen via increases in the hematocrit (20).

It is currently unclear which receptor isoform transduces EPO's activity in the setting of wounds and, therefore, whether TPCs could be reasonable candidates to avoid EPO's adverse effects in this therapeutic area. In the present work we examined the action of TPCs on the development and resolution of injury in a variety of wound etiologies: i) a predomi-

nantly ischemic wound; ii) an ischemia-reperfusion wound model; iii) an incisional wound in which ischemia plays a limited role; and iv) infectious peritonitis that produces adhesions. Because we were interested in modeling potential clinical scenarios that often cannot be anticipated, dosing of TPCs was initiated only following wound injury. The results show that TPCs effectively limit injury, accelerate healing, and reduce adhesion formation, confirming a role for the tissue protective heteroreceptor in this activity.

MATERIALS AND METHODS

All experiments were performed under protocols approved by the local animal use and care committee and complied with the standards in the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, prepared by the Institute of Laboratory Animal Resources and published by the National Academy Press (21). Male Sprague Dawley rats of 275-300 gm body weight were used for these experiments. Each animal was acclimated for at least 1 wk prior to experimentation, maintained under a reverse light-dark cycle, and were able to access food and water *ad libitum* except as stated in each individual protocol. Following surgical wounding procedures, each animal was individually housed for the duration of the experiment.

Compounds

EPO was obtained from Dragon Pharmaceuticals (Vancouver, BC, Canada). Carbamyl-EPO was prepared as published previously (7). ARA 290 is an 11 amino acid peptide of molecular weight 1,258 synthesized by standard F-moc solid phase peptide synthesis and purified by HPLC and ion-exchange chromatography.

Cutaneous Punch Biopsy (Nonischemic Wounding)

Animals were fasted from the evening before the procedure. Under isoflurane anesthesia, a region of skin 5 × 5 cm was shaved on the dorsum in the subscapular region, washed with povidone-iodine solution, and followed by a sterile water

rinse. Four full-thickness skin punches were placed at the corners of a 2-cm square using a 3.5-mm-diameter (area = 9.6 mm²) disposable sterile biopsy punch. A drop of 1% lidocaine solution was placed into the wounds followed by application of 1% lidocaine-saturated gelfoam attached by adhesive tape. Animals then received one of three treatments in a blinded fashion. Group 1 (n = 9) received a daily subcutaneous saline injection in a central location, equidistant from each punch wound. In a similar fashion, Group 2 (n = 6) received EPO at 500 IU/kg-bw (~130 picomoles [pmol]/kg-bw), and Group 3 (n = 9) received 1 nanomole [nmol]/kg-bw of the tissue protective peptide ARA 290. Wound assessment was accomplished by digital planimetry of eschar area using dimensionally calibrated serial digital photographs on d 0, 1, 3, 7, 10, and 14. Wound size was expressed as the ratio between the wound area and a size standard. (22). This experiment was performed twice with similar results.

Dorsal Skin Flap (Permanent Ischemia)

Under isoflurane anesthesia, the dorsal skin was shaved, washed with povidone-iodine solution, and rinsed with sterile water. A caudally based 3- × 9-cm-long cutaneous pedicle flap was constructed following the general method of McFarlane *et al.* (23). In this procedure, a deep incision is made down to the areolar tissue plane along three sides through the dermis and adherent panniculus carnosus. Following mobilization and elevation to make certain that nutrient blood supply was severed on three sides, the flap was immediately replaced into position and the three edges sutured together at 5-mm intervals using 3-0 Ethicon Products (Sommerville, NJ). Animals were separated into three groups, and received intravenous injections in a blinded fashion twice weekly. Group 1 (n = 9) received saline, Group 2 (n = 6) received carbamylated EPO (CEPO) (3 µg/kg-bw), and Group 3 (n = 6) CEPO (0.3 µg/kg-bw). Dimensionally-

calibrated photographs of the flaps were obtained weekly for 5 wks following surgery and eschar area determined by digital planimetry.

Decubitus Ulcer (Recurrent Ischemia-Reperfusion)

In this protocol, pressure-induced ischemia was produced to mimic that encountered by a debilitated hospitalized patient. Over a period of two successive d, we performed five recurring 2-h ischemic episodes, each separated by 30 min of reperfusion (12 h total), were performed, followed by a period of 12 h of ischemia. To reliably elicit ischemia-reperfusion of the skin in freely moving animals, a combination of an implanted steel plate with an externally applied permanent magnet was employed (24). Briefly, under isoflurane anesthesia the left flank was shaved and disinfected. A steel plate (3.3 × 6.3 cm) was then placed subcutaneously and sewn into the underlying muscle. Following a 24-h recovery period, blood flow into the overlying skin was arrested, according to the protocol, by application of a neodymium magnet (47 × 22 × 10 mm thick possessing a surface area of 10.3 cm²) to the central portion of the steel plate. Each magnet was oriented to parallel the long axis of the steel plates, centered to assure a similar compression for each animal, and its position marked on the surface of the skin to allow accurate replacement. Treatment groups (n = 8) were administered saline, ARA 290 (1 nmol/kg-bw subcutaneously) on d 1 and 2, ARA 290 (1 nmol/kg-bw subcutaneously), EPO (300 IU/kg-bw; ~80 pmol/kg-bw) daily or CEPO (50 µg/kg-bw; ~1 nmol/kg-bw) once a day for the first 2 d and the animals followed for a total of 14 d. Digital photographs were obtained and necrotic area of the wound determined in a blinded fashion using digital planimetry. For the first day following injury, a clear determination of skin viability could not be made reliably using photographs, so tissue viability was determined by the presence of skin blanching and confirmed by the presence of bleeding to a slight needle prick.

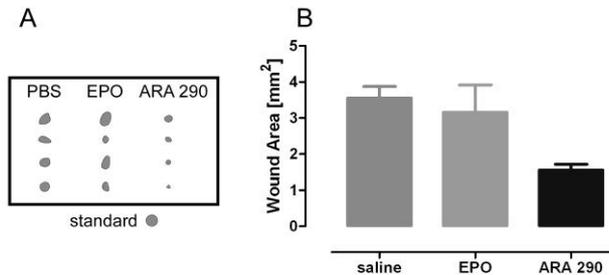


Figure 1. Tissue protective compounds improve wound healing in a dermal punch biopsy (nonischemic) model. (A) Punch wound size from an animal representative of each treatment group at d 7 following injury. The ARA 290 group (1 nmol/kg-bw) was characterized by a more complete closure of the wound compared with animals that received either PBS or EPO (500 IU/kg-bw). (Standard represents the initial lesion size.) (B) At 7 d following injury, the ARA 290 group was significantly more advanced in healing of the clean, uncomplicated dermal punch biopsy wound compared with saline or EPO ($P < 0.001$).

Cecal Ligation and Perforation (Infected Wound)

To produce a model of infectious peritonitis, an abdominal incision was made under isoflurane anesthesia, followed by ligation of the cecum and then two puncture wounds made using a sterile 18 gauge needle. Great care was taken to minimize the handling of the intestines and to produce a uniform abdominal wound. No feces were expressed nor were antibiotics administered. Four treatment groups were evaluated: sham (n = 8, saline, abdominal incision with minimal manipulation of intestine but without perforation); control (n = 14, cecal ligation and perforation [CLP] followed by saline); EPO (n = 8, CLP followed by EPO 10 µg/kg-bw; ~250 pmol/kg-bw); and CEPO (n = 14, CLP followed by CEPO 10 µg/kg-bw). Compounds or saline were administered intravenously by tail vein once immediately following manipulation of the intestine, and then continued daily by intraperitoneal doses. Animals were scored daily for signs of illness by noting the presence (+1) or absence (0) of the following twelve criteria: piloerection, immobility, inability to hold onto an inclined corkboard, inability to use claws, assuming hunched posture, abnormal gait, lack of exploration of surroundings, unable to

grasp a string within 30 sec, diminished reflexes, lack of appetite, weight loss, or moribund. Animals were either euthanized when and if appearing moribund or followed for 8 d after the procedure and then killed. Immediately following death, the abdomen was opened and adhesions scored using the scale of Bothin *et al.* (25).

Statistics

Wound sizes in different treatment groups were analyzed using nonparametric methods (Mann-Whitney *U* or Wilcoxon test), by log-rank (Mantel-Cox test), or by repeated measures analysis as appropriate using JMP software (SAS Inc, Cary, South Carolina, USA).

RESULTS

In the skin biopsy wound model, we detected no differences among the location of the punch wounds throughout the experiment and little change in eschar size was observed over the first 3 d following injury, irrespective of treatment type. Thereafter, wound size decreased rapidly, with complete closure occurring by d 14 in the saline treatment group. Maximum difference in wound size between the treatment groups was largest on d 7 (Figure 1A). At this time, wounds on the animals that received the tissue

protective peptide ARA 290 were 84% healed and differed significantly from the saline group, which was 63% healed and the EPO group, which was 67% healed (Figure 1B). Thus, daily subcutaneous injections of ARA 290 (1 nmol/kg-bw; equivalent to ~ 3,000 IU EPO on a molar basis), a compound with a very short serum half-life of ~ 2 min, effectively shortened healing time in a model of wounding that is not accompanied by significant hypoxia.

In the random musculocutaneous flap model characterized by permanent ischemia due to the interruption of nutrient arteries, CEPO treatment at the higher dose (30 µg/kg intravenously; Figure 2A) but not the lower dose (3 µg/kg; data not shown) was associated with an increased rate of healing. In addition to the degree of eschar resolution, the pattern of closure also differed between treatment groups. Animals that received saline exhibited a lateral contraction of the wound, leading to a long, thin scar (Figure 2B). In contrast, the CEPO group healed without constriction, producing a more rectangular scar.

In the decubitus ulcer model, animals received the first dose of a TPC 36 h after the onset of recurrent ischemic episodes. The results (Figure 3) show that animals treated with tissue protective compounds exhibited a much smaller wound size after 3 d than did animals that received saline alone (3–3.9 cm² versus 6.4 cm²). After attaining a peak wound size, the saline group remained about the same for the duration of the experiment. In contrast, treatment with ARA 290 administered as two daily doses (1 nmol/kg-bw) resulted in a smaller peak wound size (49% of maximum), which also remained the same size for the duration of the experiment. Two doses of the tissue protective compound CEPO, which has a plasma half-life of ~5–6 h, was similar to daily dosing of EPO: both the EPO and CEPO groups that received daily dosing showed a larger reduction in peak wound area (38% and 30% respectively), but thereafter declined. In the terminal phase of the experiment, animals that

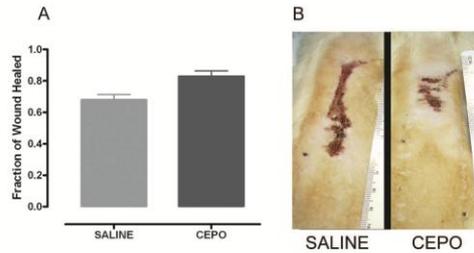


Figure 2. Tissue protective compounds improve wound healing in a raised skin flap (permanent ischemia) model. Both treated and untreated rats with a permanently ischemic, caudally based cutaneous flap exhibited a large necrotic wound area that took more than 5 wks to fully heal. (A) At 35 d following injury, wounds in the saline group were significantly larger ($P < 0.05$) than the group that received CEPO (30 µg/kg twice weekly intraperitoneally). (B) Representative examples of wound size from both treatment groups. Notably, wounds in the saline group healed by transverse constriction which was not apparent in CEPO group.

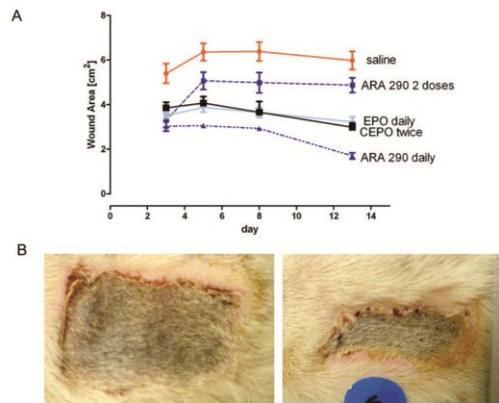


Figure 3. Tissue protective compounds improve wound healing in a decubitus ulcer (ischemia-reperfusion) model. (A) Recurrent ischemia-reperfusion (I/R) episodes caused by compression of the skin lead to a large necrotic wound that reaches a peak in size by d 5. Animals were subjected to I/R episodes for the first 36 h and then received a first treatment via tail vein. Wound size first measured on d 3 was smallest in animals that received nonerythropoietic tissue protective molecules. The saline group was characterized by a large wound that did not shrink appreciably over the observational period. Although two doses of the tissue protective peptide ARA 290 (with an ~2-min plasma half-life) reduced the initial lesion size at d 3, but no further reduction in size was noted, as compared with the other treatment groups that received daily doses (EPO and ARA 290) or two treatments with a nonerythropoietic tissue protective compound with a longer plasma half-life (CEPO; half-life ~5–6 h). (B) Representative examples of difference at d 8 between wound of a saline-treated animal compared with one having received ARA 290.

had received intensive dosing of ARA 290 exhibited the most complete and rapid resolution of the wound over the 13 d of the study (to ~16% of the maximum wound size; Figure 3B). Thus, like the skin punch biopsy model, daily treatment with ARA 290 resulted in a better outcome than that for EPO in this model system.

Rats undergoing cecal ligation and perforation displayed signs of illness within 24 h following the procedure (Figure 4A). The group that received CEPO exhibited a milder course of symptoms that reached a peak by d 3, and then diminished slightly over the observation time of 8 d. In contrast, the saline group reached a maximum illness score by d 4, which was twice as severe as the CEPO group. Additionally, infected animals from both groups lost about 10% of basal body weight over the observation period (data not shown). Although the saline group reached a nadir of weight loss earlier than the CEPO group, from d 3, both groups exhibited the same degree of weight loss, even though the illness scores differed greatly. Serial serum TNF α levels obtained following CLP rose rapidly in all treatment groups except sham, peaking by 3 h, and diminishing slowly over the ensuing 24 h. The mean value of the CEPO treatment group was comparable to the sham group, each being only about half that of the saline treatment group (Figure 4B).

As shown in Figure 4C, animals that received CEPO exhibited an approximate three-fold improved survival rate compared with either the EPO or saline treatment groups. Animals that survived were euthanized at d 8 following the procedure. Interestingly, the severity of adhesions was significantly much worse in the saline group compared with the CEPO group (means of ~10 versus 7; Figure 4D). Although the mean adhesion score of the EPO group was less than that of the saline group, the effect did not reach the level of significance. Figure 4E is a representative photograph showing adhesions present in a surviving saline animal compared with one that received CEPO.

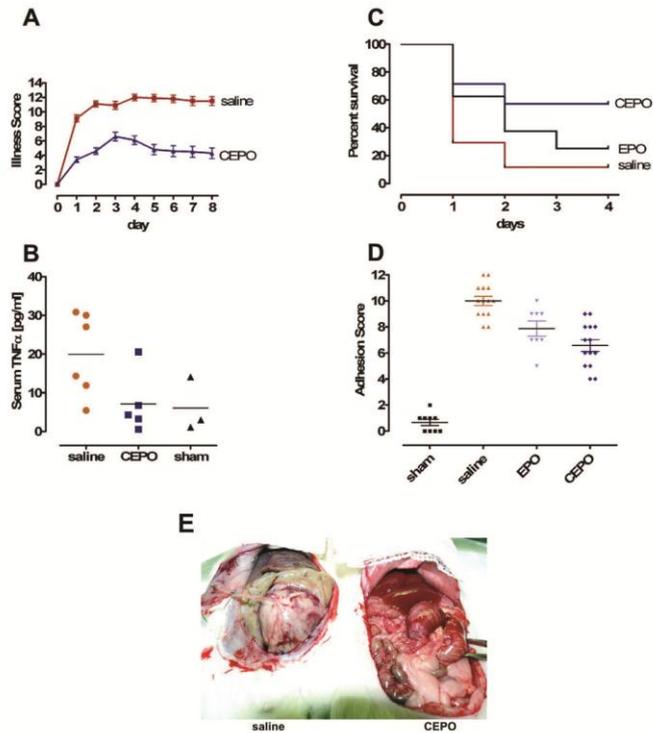


Figure 4. Tissue protective compounds improve wound healing in a cecal ligation and perforation infectious peritonitis model. (A) Following wounding, signs of illness (see Materials and Methods) intensified, reaching a peak by 2–3 d. Notably, illness in the CEPO-treated animals was delayed and less severe than in the saline treatment group. (B) Serum TNF α levels from tail vein samples at 3 h following the procedure. The CEPO group exhibited a lower peak level ($P < 0.05$) and was similar to the sham group, consistent with the less severe clinical scores observed. Horizontal lines are the group means. (C) The mortality in the saline group was significantly more than for CEPO ($P < 0.01$), whereas EPO treatment was not associated with a significant increase in survival. (D) Scoring the severity of adhesions showed that CEPO treatment was associated with a marked reduction ($P < 0.01$ compared with saline) as well as a nonsignificant trend in reduction associated with EPO treatment. (E) Representative photos demonstrating the difference between a saline animal (left) and CEPO (right). Note the white, fibrinous membrane almost completely enveloping the opened abdominal surface. This is consistent with highly inflammatory processes, which are not present in CEPO-treated animals.

DISCUSSION

Using four wound models, each characterized by a different pathophysiology, we have shown that nonerythropoietic tissue protective molecules limit maxi-

mum wound size as well as accelerate closure. Additionally, in a model of infectious peritonitis, carbamyl-EPO, a nonerythropoietic tissue protective molecule, suppresses production of the proinflam-

matory cytokine TNF α , decreases mortality, and is highly effective in reducing scarring. Because TPCs cannot interact with the hematopoietic homodimeric receptor (7), the beneficial effects of TPCs are mediated through the heteromeric tissue protective receptor. An additional conclusion is that effects via the erythropoietic receptor (for example, endothelial cell activation) could account for the inferior activity of EPO on wound healing when compared with TPCs in some of the models tested.

Tissue damage is a certainty of life. Normally, injury is contained and then a repair and regeneration phase returns tissues to a normal state. The biology of wounding involves an acute injury phase that activates hemostatic, inflammatory, and proliferative cellular responses that are triggered by molecular signals (26). These "alarmins" subsequently initiate the recruitment of inflammatory cells that both amplify and modulate tissue damage in a potentially positive feedback manner (27,28). One prominent pathological consequence of this process is tissue apoptosis and necrosis. Prior work has shown that a considerable portion of necrotic injury arises from an intensification of ischemia due to nonfunctional capillaries caused by endothelial cell apoptosis, leukocyte plugging, endothelial cell swelling, and vascular leakage, leading to tissue compression by interstitial edema (29,30). If wound volume is successfully contained, endothelial progenitor cells migrate into the injured region supporting the growth of new blood vessels within granulation tissue.

Tissues respond to a wide variety of injuries by triggering a stereotyped response involving a balance between destructive proinflammatory cytokines (for example, TNF α) and antiinflammatory responses (for example, locally-produced EPO) (2). However, these are mutually suppressive such that within the vicinity of a wound, the proinflammatory milieu leads to suppressed EPO synthesis. A major role of nonerythropoietic tissue protective compounds is to antagonize the activities of proinflammatory cy-

tokines by reducing their production and attenuating their biological effects (2).

In contrast to EPO, the expression of the tissue protective receptor is upregulated within the wound, setting the stage for a potential role of exogenously administered TPCs to rescue cellular targets otherwise programmed to undergo apoptosis. A critical potential therapeutic target is the capillary endothelium, in that capillary dropout frequently occurs because of apoptosis of the endothelial cells, amplifying injury. Administration of TPCs could rescue these capillaries, diminishing wound volume. This phenomenon has been recently reported to occur in the rodent ischemic random musculocutaneous flap model (14) in which EPO administration increased the proportion of functional capillaries within the wound. Another important effect at the capillary level: EPO has been observed to reduce capillary plugging dramatically by leukocytes primed for adherence by proinflammatory molecules (11,12,14,15). However, EPO itself can strongly activate the endothelium producing a prothrombotic state which could neutralize a portion of its therapeutic benefit. This disadvantage is avoided by use of TPCs.

In addition to preserving existing capillaries, EPO has also been shown to accelerate healing in the ischemic flap model by amplifying reparative angiogenesis (10-12). It is known that in organ injury, such as a rodent myocardial infarction model (31), EPO mobilizes endothelial progenitor cells (CD34⁺/flk-1) that subsequently travel via the circulation and migrate into injury sites to drive neoangiogenesis, ultimately reducing tissue hypoxia. Further, tissue-specific stem cells are recruited by EPO to take up residence within the region of injury and differentiate into mature, functional cells (32). Finally, EPO also improves collagen deposition and modulates the number of fibroblasts within a wound site (13).

As discussed previously, the affinity of the tissue protector subtype is lower than that of the hematopoietic system (reviewed in Brines and Cerami [2]). This re-

quires substantially higher doses of EPO for treatment of tissue injury than for erythropoiesis and, as a result, invariably interacts with both receptor isoforms. This is exemplified in the skin flap model in which CEPO was effective at 3 μ g/kg-bw (equivalent to ~ 300 IU/kg-bw of EPO), but not at 0.3 μ g/kg-bw which is equivalent to ~ 30 IU/kg-bw, a purely hematopoietic dose of EPO. In addition to hematopoiesis, the homodimer also mediates a number of other activities. These include constriction of vascular smooth muscle, activation of vascular endothelial cells into a proinflammatory state (expression of selectins, increased platelet production, and so on) which are generally undesirable when one contemplates the use of EPO as a therapeutic agent for tissue protection. Nonerythropoietic molecules completely avoid this issue (9).

It is especially notable that in the decubitus ulcer model, ARA 290 administered daily produced an initially smaller lesion than animals receiving EPO. Several groups using the musculocutaneous skin flap model have reported that high dose EPO is associated with significantly inferior effects on healing than lower doses of EPO (14,33). In these cases, nonbeneficial activities ascribed to EPO, for example, reduction of blood supply by promoting thrombosis or from adverse rheological effects arising from increases in the hematocrit are explained by interactions with the homodimeric receptor.

In these experiments, treatment was initiated only following the wounding injury, mirroring many typical clinical situations in which therapy in advance of wounding is not practical. The biological effects can be explained by a triggering of the tissue protective receptor, as ARA 290, which is highly effective, is a compound that has a half-life of only about 2 minutes when administered intravenously in the rat (8). Such long lasting effects are explained by the triggering of complex gene expression programs that provide for sustained activities. Thus, in promoting recovery from wounding, nonerythropoietic tissue protective ligands do not need to be

present continuously to promote beneficial effects.

The potential clinical utility of TPCs in wound healing is clear for a reduction of healing time in a variety of wound types, including those surgically-induced or those caused by a debilitated patient state, for example, decubitus ulcers. Potential additional benefits in modulation of scarring following peritoneal infections, or other inflammatory processes like endometriosis, bear further investigation. Finally, these compounds could have other beneficial effects not examined in the current experiments, for example, a neurotrophic activity (2) that likely enhances the regrowth of severed cutaneous nerves.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Deborah Diaz, Daniel Gomez, Annie Zhu, and Xiao-wen Xie for their invaluable technical assistance.

DISCLOSURE

Araim Pharmaceuticals is a spin-off of Warren Pharmaceuticals. A Cerami and M Brines are employees of Warren Pharmaceuticals, which is developing tissue protective compounds for clinical use.

REFERENCES

- Jelkmann W. (2007) Erythropoietin after a century of research: younger than ever. *Eur. J. Haematol.* 78:183-205.
- Brines M, Cerami A. (2008) Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. *J. Intern. Med.* 264:405-32.
- Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. (2008) The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 67:39-61.
- Brines M, et al. (2004) Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:14907-12.
- Corwin HL, et al. (2007) Efficacy and safety of epoetin alfa in critically ill patients. *N. Engl. J. Med.* 357:965-76.
- Bennett CL, et al. (2008) Venous thromboembolism and mortality associated with recombinant erythropoietin and darbepoetin administration for the treatment of cancer-associated anemia. *JAMA* 299:914-24.
- Leist M, et al. (2004) Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. *Science* 305:239-42.
- Brines M, et al. (2008) Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105:10925-30.
- Coleman TR, et al. (2006) Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:5965-70.
- Buemi M, et al. (2004) Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 22:169-73.
- Buemi M, et al. (2002) Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta. Derm. Venereol.* 82:411-7.
- Rezaeian F, et al. (2008) Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. *Ann. Surg.* 248:919-29.
- Sayan H, Ozacmak VH, Guven A, Aktas RG, Ozacmak ID. (2006) Erythropoietin stimulates wound healing and angiogenesis in mice. *J. Invest. Surg.* 19:163-73.
- Harder Y, et al. (2009) Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner. *Surgery* 145:372-83.
- Kim EK, Hong JP. (2007) The effect of recombinant human erythropoietin on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat TRAM flap model. *Plast. Reconstr. Surg.* 120:1774-81.
- Fatouros M, Dalekos GN, Mylonakis E, Vekinis G, Kappas AM. (1999) Alterations in body weight, breaking strength, and wound healing in Wistar rats treated pre- and postoperatively with erythropoietin or granulocyte macrophage-colony stimulating factor: evidence of a previously unknown anabolic effect of erythropoietin? *J. Lab. Clin. Med.* 133:253-9.
- Fatouros MS, et al. (1999) Influence of growth factors erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on mechanical strength and healing of colonic anastomoses in rats. *Eur. J. Surg.* 165:986-92.
- Galeano M, et al. (2006) Recombinant human erythropoietin improves angiogenesis and wound healing in experimental burn wounds. *Crit. Care Med.* 34:1139-46.
- Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcaşoy MO. (2003) A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response. *Am. J. Pathol.* 163:993-1000.
- Keast DH, Fraser C. (2004) Treatment of chronic skin ulcers in individuals with anemia of chronic disease using recombinant human erythropoietin (EPO): a review of four cases. *Ostomy Wound Manage.* 50:64-70.
- National Research Council, Commission on Life Sciences, Institute of Laboratory Animal Resources. (1996) Guide for the care and use of laboratory animals. Washington, DC: National Academy Press. 140 pp.
- Kiecolt-Glaser JK, Marucha PT, Malarkey WB, Mercado AM, Glaser R. (1995) Slowing of wound healing by psychological stress. *Lancet* 346:1194-6.
- McFarlane RM, Deyoung C, Henry RA. (1965) The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast. Reconstr. Surg.* 35:177-82.
- Peirce SM, Skalak TC, Rodeheaver GT. (2000) Ischemia-reperfusion injury in chronic pressure ulcer formation: a skin model in the rat. *Wound Repair Regen.* 8:68-76.
- Bothin C, Okada M, Midtvedt T, Perbeck L. (2001) The intestinal flora influences adhesion formation around surgical anastomoses. *Br. J. Surg.* 88:143-5.
- Oppenheim JJ, Yang D. (2005) Alarmins: chemotactic activators of immune responses. *Curr. Opin. Immunol.* 17:359-65.
- Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, Billiar TR, Tsung A. (2008) Hmgbl: endogenous danger signaling. *Mol. Med.* 14:476-84.
- Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. (2005) The cytokine activity of HMGB1. *J. Leukoc. Biol.* 78:1-8.
- Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox." *Am. J. Physiol.* 263: H1901-6.
- Menger MD, Steiner D, Messmer K. (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow." *Am. J. Physiol.* 263: H1892-900.
- Westenbrink BD, et al. (2007) Erythropoietin improves cardiac function through endothelial progenitor cell and vascular endothelial growth factor mediated neovascularization. *Eur. Heart J.* 28:2018-27.
- Wang L, et al. (2006) Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) and MMP9 secreted by erythropoietin-activated endothelial cells promote neural progenitor cell migration. *J. Neurosci.* 26:5996-6003.
- Saray A, et al. (2003) Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study. *Laryngoscope* 113:85-9.