T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERİTROPOETİNİN SH-SY5Y HÜCRE HATTINDA mikroRNA EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

Doğan TUNALI

TEMEL SİNİRBİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR
2011

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

ERİTROPOETİNİN SH-SY5Y HÜCRE HATTINDA mikroRNA EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

TEMEL SİNİRBİLİMLERİ ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Doğan TUNALI

DANIŞMAN ÖĞRETİM ÜYESİ
Doç. Dr. Şermin GENÇ

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 99.3456.23 sayı ile desteklenmiştir.

Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Temel Sinirbilimleri Anabilim Dalı,Yüksek Lisans program öğrencisi Doğan TUNALI. **‘Eritropoetin’in SH-SY5Y hücre hattında miRNA ekspresyonu üzerine etkisi’** konulu Yüksek Lisans tezini …….tarihinde başarılı olarak tamamlamıştır.

BAŞKAN

ÜYE ÜYE

ÜYE ÜYE

İÇİNDEKİLER

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. ERİTROPOETİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ……..4
2.2. ERİTROPOETİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİ MEKANİZMALARI……....7
2.2.1. Eritropoetinin Anti-Oksidan Etkisi……...8
2.2.2.Eritropoetinin Anti-Apoptotik Etkisi……..... 8
2.2.3. Eritropoetinin Anti-İnflamatuvar Etkisi……....9
2.3. miRNA ……..10
2.3.1.miRNA Biyogenezi ……11
2.3.2. miRNA Ekspresyonunun Düzenlenmesi…….....13
2.4. SANTRAL SİNİR SİSTEMİNİN GELİŞİMİNDE VE
HASTALIKLARINDA MİKRORNA'LARIN ROLÜ ……..... 13
2.4.1. Sinir Sisteminin Gelişiminde ve Fizyolojisinde Rol Oynayan
miRNA'lar……..13
2.4.2. Sinir Sistemi Hastalıklarında miRNA'lar……..……...14
2.5. ERİTROPOETİN miRNA İLİŞKİSİ……17
2.6. miRNA DETEKSİYON YÖNTEMLERİ……..18
3.GEREÇ VE YÖNTEM……..…….21
3.1. Araştırmanın Tipi……..……..21
3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı……..……21
3.3. Çalışma Materyali……..…….....21
3.4. Araştırmanın Değişkenleri…….21
3.5. Veri toplama Araçları……..……21
3.5.1. Hücre Kültürü …….....…..…….…..21
3.5.2. İn vitro Deney…….....…..…….…..21

3.5.3. RNA İzolasyonu……..... ……22
3.5.4. miRNA Mikroarray Analizi……..... 23
3.5.5. miRNA KPCR array analizi…….....…….……..23
3.5.6. miRNA hedeflerinin ve bu hedeflerin yolaklarının analizi..... 23
3.6. Araştırma Planı ve Takvimi……..23
3.7. Verilerin Değerlendirilmesi……...24
3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları……..24
3.9. Etik Kurul Onayı……24
4. BULGULAR..... 25
4.1. Mikroarray'de Eritropoietin ile Ekspresyonu Değişen miRNA'ların Belirlenmesi..... 25
4.2.Kantitatif PCR'da Eritropoietin İndüksiyonuyla Ekspresyonu Değişen miRNA'ların Belirlenmesi..... 26
4.3. Anlamlı değişim gösteren mikroRNA'ların olası hedef genleri ve yolakları..... 26
5. TARTIŞMA..... 36
6. SONUÇ ve ÖNERİLER..... 38
7. KAYNAKLAR..... 39
8. EKLER..... 49

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 1: İnme dışındaki sinir sistemi hastalıklarında eritropoetin ile yapılmış klinik deneyler

Tablo 2: Mikroarray analizi sonucunda ekspresyon değişimi en çok olan 30 miRNA

Tablo 3: Kantitatif PCR analizi sonucunda ekspresyon değişimi saptanan miRNA‘lar

Tablo 4: Anlamlı değişim gösteren miRNA’ların Targetscan analizi

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1: Eritropoetin'in hücre içi sinyal yolakları

Şekil 2: MikroRNA biyogenezi

KISALTMALAR

AH: Alzheimer Hastalığı
AIDS: Acquired immune deficiency syndrome
Akt: serin/treonin protein kinaz
ALS: Amyotrophic lateral sclerosis
APP: amyloid precursor protein
BACE: Beta-secretase
Bad: Bcl-2-associated death promoter
Bax: Bcl-2–associated X protein
Bcl-2: B-cell lymphoma 2
cDNA: complemetary deoksiribonükleik asit
cIAP: cellular inhibitor of apoptosis protein
DMEM/F12: Dulbecco's Modified Eagle Medium Nutrient Mixture F-12
DNA: deoksiribonükleik asit
DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
EPO: Eritropoetin
EPOR: Eritropoetin reseptörü
ERK: Extracellular signal-regulated kinases
FBS: Fetal bovine serum
GSK3: Glycogen synthase kinase 3
IL: İnterlökin
IκB: NFκB-Inhibitor of kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
JAK2: Janus kinase 2
kPCR: quantitative real time polymerase chain reaction
MAPK: Mitogen-activated protein (MAP) kinases
MDB: Membrane Desalting Solution
mdm2: The murine double minute 2
miRNA: mikroRNA
mRNA: messenger ribonucleic acid
ncRNA: non-coding ribonucleic acid

NFkB: nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells

NKH: nöral kök hücre

NO: nitrik oksit

PH: Parkinson Hastalığı

PI3K: Phosphatidylinositol 3-kinases

piRNA: piwi interacting ribonucleic acid

RISC: RNA-induced silencing complex

RNA: Ribonükleik asit

rRNA: ribosomal ribonucleic acid

SAGE: serial analysis of gene expression

siRNA: short interfering ribonucleic acid

SNP: single-nucleotide polymorphism

snRNA: Small nuclear ribonucleic acid

SOD: superoksit dismutaz

STAT5: Signal transducer and activator of transcription 5

TNF: Tumor necrosis factors

TRBP: Trans activation response element(TAR) RNA Binding Protein

tRNA: transfer ribonucleic acid

VSN: variance stabilizing normalization

xIAP: X-linked inhibitor of apoptosis protein

TEŞEKKÜR

İlk öğrencisi olmaktan onur duyduğum, alçakgönüllülüğü ve bilim tutkusuyla saygımı kazanan, benim için sadece bir danışmandan çok daha fazlası olan hocam Doç. Dr. Şermin GENÇ'e yüksek lisansım boyunca bana kazandırdığı onca bilgi ve becerinin yanısıra gösterdiği ilgi, sabır ve destek için en içten teşekkürlerimi sunarım. Çoğuna uyamasam da koyduğu zaman sınırları olmasa tezimi yazmayı nasıl bitirirdim bilmiyorum.

Yaptığımız çoğu zaman keyifli tartışmalarla bana yeni ufuklar açan ve bilim tutkusunun sürekli beslenmesi gereken bir his olduğunu aksi halde tükeneceğini gösteren hocam Doç. Dr. Kemal Kürşad GENÇ'e yol göstericiliğinden, alçakgönüllüğünden, ilgisinden ve tanıdığım en müstesna insanlardan biri olmasından dolayı teşekkür ederim.

Tez çalışmamda çok emeği geçen ekip arkadaşım Zeynep ZADEOĞLULARI'na ve verilerin analizi konusunda bana çok yardımcı olan takım arkadaşım Kemal Uğur TÜFEKÇİ'ye teşekkür ederim.

Hayatım boyunca destek ve sevgilerini hissettiğim, tezi yazarken de hep yanımda olan aileme teşekkür ederim.

Saygılarımla

Doğan TUNALI

ERİTROPOETİNİN SH-SY5Y HÜCRE HATTINDA mikroRNA EKSPRESYONU ÜZERİNE ETKİSİ

ÖZET

Eritropoetin (EPO), eritropoezi uyaran hematopoietik büyüme faktörü ve sitokindir. Son yıllarda beyindeki nöronal ve glial hücrelerde kendisinin ve reseptörünün varlığı ortaya konmuştur. EPO; sinir sisteminin gelişiminde, nöronal canlılığın devamında nöronal hasarın tamirinde kritik roller üstlenir. EPO'nun nöroprotektif etkisinin olası bir mekanizması transkripsiyonel düzeyde gen regülasyonudur. Transkripsiyonel gen regülasyonunda önemli role sahip molekül grubundan birisi mikroRNA'lar (miRNA), küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır. Gen ekspresyonunu mRNA parçalanması ya da translasyon inhibisyonu yoluyla düzenlerler. miRNA'ların sinir sisteminin gelişiminde, plastisitesinde, nörodejenerasyonunda rol oynadıkları saptanmıştır. Bu çalışmada amacımız EPO'nun SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında miRNA ekspresyonunda yaptığı değişikliklerin incelenmesidir. Bu amaçla nöronal bir hücre hattı olan SH-SY5Y hücre hattına EPO indüksiyonu uygulanıp bunun sonucunda ekspresyonu değişen mikroRNA'lar mikroarray ve kantitatif polimeraz zincir reaksiyonu (kPCR) yöntemleriyle incelenmiştir. EPO uyarımı ile ekspresyonu değişen mikroRNA'ların hedef genleri biyoinformatik analizle saptanmıştır. Araştırmamızın sonuçlarına göre EPO uyarımı ile miR-885-5p, miR-1236, miR-451 miR-640 ve miR-4303 ekspresyon değişimi anlamlı olduğu bulundu. Target analizinde miR-885-5p ve miR-451'in hedef genlerinin EPO'nun etki mekanizmasında rol oynama ihtimali yüksek moleküller olduğu saptandı. Çalışmamız EPO uyarımının nöronal hücrelerde miRNA ekspresyon değişimine neden olduğunu gösteren ilk çalışma olmakla birlikte, ekspresyon değişimi saptanan miRNA'lar için hedef gen analizlerinin doğrulamasının yapılması gereklidir.

EFFECT OF ERYTHROPOIETIN ON THE microRNA EXPRESSION LEVELS OF SH-SY5Y CELL LINE

Erythropoietin (EPO) is a hematopoietic growth factor and cytokine which stimulates erythropoiesis. In recent years it's been shown that EPO and its receptor is expressed in the brain, neurons and the glial cells. Epo has a critical role in the development, maintenance, protection and repairment of the nervous system. A possible mechanism of Epo is gene regulation at the transcriptional level. MicroRNAs(miRNAs) which are small, non-coding RNAs have an important role in this process. miRNAs regulate gene expression through mRNA degradation or translational inhibition. It's thought that miRNAs have a role in development, plasticity and neurodegeneration of the nervous system. In this study our goal is to observe the effect of EPO on the miRNA expression in SH-SY5Y neuroblastoma cell line. For this purpose neuronal cell line SH-SY5Y has been induced by EPO and any miRNA expression changes that occured has been detected by miRNA microarray and Quantitative Polymerase Chain Reaction (QPCR) methods both. Target genes of miRNAs whose expression has changed has been predicted by bioinformatics analysis. According to our results expression changes of miR-885-5p, miR-1236, miR-451 miR-640 and miR-4303 are found significant. targets of miR-885-5p and miR-451 has a high probability of playing a role in EPO's action mechanism. Although our study is the first one to show that EPO induction stimulates miRNA expression change in neuronal cells further research like target validation for determined miRNAs should be conducted.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Eritropoetin (EPO), santral sinir sisteminde nörotrofik ve nöroprotektif etkiler gösteren aynı zamanda nöronal gelişimde de etkili olduğu düşünülen eritropoezi stimüle edici hematopoietik büyüme faktörü ve sitokindir. Kendisi ve reseptörünün beyinde, nöronal ve glial hücrelerde varlığı ortaya konan EPO'nun iskemik, hipoksik, metabolik, nörotoksik ve eksitotoksik streste nöroprotektif etkisi olduğu gösterilmiştir (Genç S, 2004). EPO, nöroprotektif etkisini serbest radikallerin ve glutamatın üretiminin sınırlanması, nörotransmisyonunun düzenlenmesi, vazospazmın geri çevrilmesi, anjiyogenez stimülasyonu, apoptozun azaltılması, inflamasyonun düzenlenmesi ve kök hücrelerin farklılaşması gibi yollarla gösterir. Şimdiye kadar bu etkilerini göstermesinde AKT, transducer and activator of transcription 5 (STAT5), Mitogen-activated protein kinases/ Extracellular signal-regulated kinases (MAPK/ERK) ve nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells (NFkB) yolakları gibi sinyal yolaklarının etkili olduğu saptanmıştır (van der Kooij MA, 2008).

Yakın zamanda transkripsiyonel düzeyde gen regülasyonunda önemli rolü olan mikroRNA(miRNA) adlı RNA tipleri keşfedilmiştir. Bu RNA'lar çok küçük, kodlama yapmayan RNA'lardır. Gen ekspresyonunu mRNA parçalanması ya da translasyon inhibisyonu yoluyla düzenlerler. miRNA'ların sinir sisteminde; gelişimde, plastisitede, nörodejenerasyonda rol oynadıkları düşünülmektedir. 2008 yılında Kosaka N. et al'ın yaptıkları çalışma sonucunda eritroid diferansiyasyonu esnasında EPO'nun bazı miRNA'ların ekspresyonunu etkilediği saptanmıştır (Kosaka N, 2008).

Bu tez çalışmasının amacı; SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında EPO uygulamasının miRNA ekspresyon seviyelerini nasıl etkilediğini belirlemektir. Eritropoetin indüksiyonu sonucu ekspresyonu değişen mikroRNA'lar mikroarray ve kantitatif PCR yöntemleri ile incelenmiştir. EPO ile ekspresyonu indüklenen mikroRNA'ların hedef genleri biyoinformatik yöntemle incelenmiştir.

H1: SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattına EPO uygulamasının ardından miRNA ekspresyon seviyelerinde değişim vardır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. ERİTROPOETİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİLERİ

Glikoprotein yapıda bir hormon olan EPO'nun primer fonksiyonu hematopoetik dokularda eritrosit öncüsü hücrelerin apoptotik ölümünü baskılayarak eritrosit üretimini (eritropoez) uyarmaktır (Jelkmann W, 2004). Rekombinant 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 (Jelkmann W, 2004). Eritropoetinin bu etkileri göstermek için bağlandığı eritropoetin reseptörü (EPOR) sitokin tip 1 alt ailesine bağlı bir transmembran proteindir. EPOR, mezensefalik, hipokampal ve kortikal nöronlarda, astrositlerde, oligodendrositlerde ve beyin kapiller endotelyal hücrelerinde ekprese olur (Morishita E, 1997; Nagai A, 2001; Yamaji R, 1996). İki transmembran EPOR molekülü homodimerize olduğunda bir EPO molekülünün bağlanmasını sağlar ve bu da konformasyonel bir değişime neden olarak reseptörün Janus kinase 2 (JAK2) transfosforilasyonuna katılmasını sağlar. Karbamile eritropoetin gibi bazı EPO türevlerinin hücre koruyucu etkisini klasik homodimer reseptörlerin haricinde heterodimer EPOR'a bağlanarak gösterdikleri ortaya konmuştur (Brines M, 2004; Leist M, 2004; Fiordaliso F, 2005). Hematopoetik dokular dışındaki dokularda da fonksiyonel EPO reseptörlerinin bulunması bu maddenin eritropoez dışında başka fonksiyonları da olabileceğini düşündürmüştür (Jelkmann W, 2004; Genc S, 2004; Chong ZZ, 2002; Juul SE, 2004; Ehrenreich H, 2004; Maiese K, 2005; Maiese K, 2004).

EPO'nun eritropoetik ve doku koruyucu etkilerini farklı EPOR izoformları belirler. Hematopoetik reseptör homodimerik yapıda ve 1-10 pikomolar konsantrasyondaki EPO'ya yanıt verirken (Jelkmann W, 2008) doku koruyucu reseptör EPOR ve CD131'den oluşan heteromerik reseptör 2-20nM gibi daha düşük konsantrasyondaki EPO'ya yanıt verir (Brines M, 2004). Hematopoetik reseptör devamlı eksprese edilirken doku koruyucu reseptörün hasar ya da önemli metabolik stres koşullarında eksprese olduğu ortaya konmuştur (Brines M, 2008). EPO reseptörü aracılığıyla gerçekleşen sinyalleme normal beyin gelişimi için gereklidir (Yu X, 2002). Şimdiye kadar yapılan çeşitli *in vitro* deneylerde EPO'nun nöroprotektif etkisi gösterilmiştir. Örneğin sıçan lumbar omuriliği organotipik hücre

kültüründe glutamat geri alım inhibitörü DL-threo-beta-hidroksiaspartat (THA) kullanılarak oluşturulan *in vitro* ALS modelinde EPO uygulamasıyla hücrelerin glutamat nörotoksisitesinden daha az etkilendiği gösterilmiştir (Nagańska E, 2010). Bir başka çalışmadaysa 5 günlük postnatal sıçan hipokampal nöronlarında hipoksiye karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir (Lewczuk P, 2000). İnme ve diğer beyin hasar modellerinde şişmeyi azalttığı (Gunnarson E, 2009) gözlenmiştir. Retinal ganglion hücrelerinde yapılan bir çalışmada EPO'nun glutamat ve nitrik oksid sitotoksisistesine karşı koruyucu etki gösterdiği saptanmıştır.(Yamasaki M, 2005), sıçan kortikal nöronlarını hipoksi ve alfa-amino-3-hidroksi-5-metilisoksazol-4-propionik asit (AMPA) sitotoksisitesine karşı koruduğu gösterilmiştir (Sinor AD, 2000; Lewczuk P, 2000). Signore AP et. al tarafından gerçekleştirilen çalışmada EPO'nun dopaminerjik nöronları (MN9D hücre hattı) 6-hidroksidopamin (6-OHDA) nörotoksisitesine karşı koruduğu gösterilmiştir (Signore AP, 2006). EPO ayrıca Alzheimer hastalığında önemli rol oynadığı düşünülen amiloid beta proteinine karşı da *in vitro* nöroprotektif etki sergilemektedir (Chong ZZ, 2005; Sun ZK, 2008). Bunlara ilaveten birçok *in vivo* modelde de EPO'nun koruyucu etkisi gösterilmiştir; inme (Sadamoto Y, 1998; Villa P, 2003; Rodríguez Cruz Y, 2010), Parkinson (Xue YQ, 2007; Kadota T, 2009), Alzheimer (Kumar R, 2010) deneysel otoimmün ansefalomiyelit (Agnello D, 2002; Savino C, 2006), subaraknoid kanama (Buemi M, 2000; Grasso G, 2002; Yatsiv I, 2005; Genc S, 2006), travmatik omurilik hasarı (Gorio A, 2002; Celik M, 2002, Kaptanoglu E, 2004), kafa travması (Lu D, 2005; Ozturk E, 2005), gibi modellerde EPO'nun nöronal hasara karşı koruyucu ya da hasarı azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Parkinson hastalığında nigrostriatal bölgedeki nöron kaybını yerine koymak için beyne embriyonik kök hücre transfer edilmesi çalışmaları devam etmektedir. *In vivo* hayvan çalışmasında kök hücrelerin transfer öncesi EPO ile enkübasyonu transfer edilen nöronların hayatta kalma oranını arttırarak tedaviye katkıda bulunduğu gösterilmiştir (Kanaan NM, 2006). EPO in vivo yenidoğan kemirgen hipoksik-iskemik beyin hasarı modelinde de koruyucu etki göstermektedir (Demers, Eric J, 2005; Kumral A, 2003). EPO deneysel iskemik inme modelinde hasarın oluşumundan 2 hafta sonra verildiğinde bile uzun süreli değerlendirmede beyin dokusunda iyileşme sağlamaktadır (Dzietko M, 2004).

Yapılan klinik çalışmalar Epo'nun nörodejeneretif hastalıklarda etkisi olup olmadığı konusunda çelişkili sonuçlar vermiştir (bknz. Tablo1).

Tablo 1. İnme dışındaki sinir sistemi hastalıklarında eritropoetin ile yapılmış klinik deneyler

Hastalık	Faz	Hasta sayısı	Tedavi protokolü	Sonuç	Referans
Neonatal hipoksik-iskemik ensefalopati	I/II	167	Doğumdan sonra 48 saat içinde 300 ya da 500 U/kg peş peşe günlerde (2 hafta)	Sadece orta seviyede HIE'li infantlarda uzun vadeli sonuçlar iyileşti	Zhu C. et al.
IVH, PVL, ROP, septisemi, serebral inme, NEC bronkopulmoner displazili preterm infant	IIa/IIb	45	3000U/kg, iv, doğumdan 3, 12-18, 36-42 saat sonra	Kısa vadeli sonuçlarda değişiklik yok Ciddi yan etkisi yok	Fauchere JC. et al.
Aşırı düşük doğum ağırlıklı infantlar	I/II	60	500/1000/2500 U/kg, iv, 0, 24, 48 saatte 3 kere	EPO iyi tolere edilir Morbidite ya da mortalitede değişim yok	Juul SE. et al. (2008)
Şizofreni	IIb	39	40000U iv haftalık (12 hafta)	Şizofreniyle ilişkili bilişsel performansta artış	Ehrenreich H. et al. (2007)
Multipl skleroz	IIa	8	Mpred ile birlikte 8000/48000U haftada/2 haftada (12 hafta boyunca)	Yan etki yok motor fonksiyon ve kognisyonda gelişme	Bartels C. et al. (2008)
Subaraknoid hemoraji	IIb	80	SAH'tan sonra 72 saat içinde, 30000U iv/d (3 gün)	SAH'ı takiben gecikmeli iskemik problemlerde azalma	Tseng MY. et al. (2008)
	IIb	73	500U/kg/gün (3gün)	EPO'yla klinik durumda iyileşme yok	Springborg JB. et al. (2007)
Friedreich ataksisi	IIa	8	5000U sc 8 hafta boyunca haftada 3 kere	Frataksin seviyelerinde artma	Boesch S. et al. (2008)
	IIa	12	2000U sc 6 ay boyunca haftada 3 kere	Oksidatif stres markırlarında azalma	Boesch S. et al. (2007)

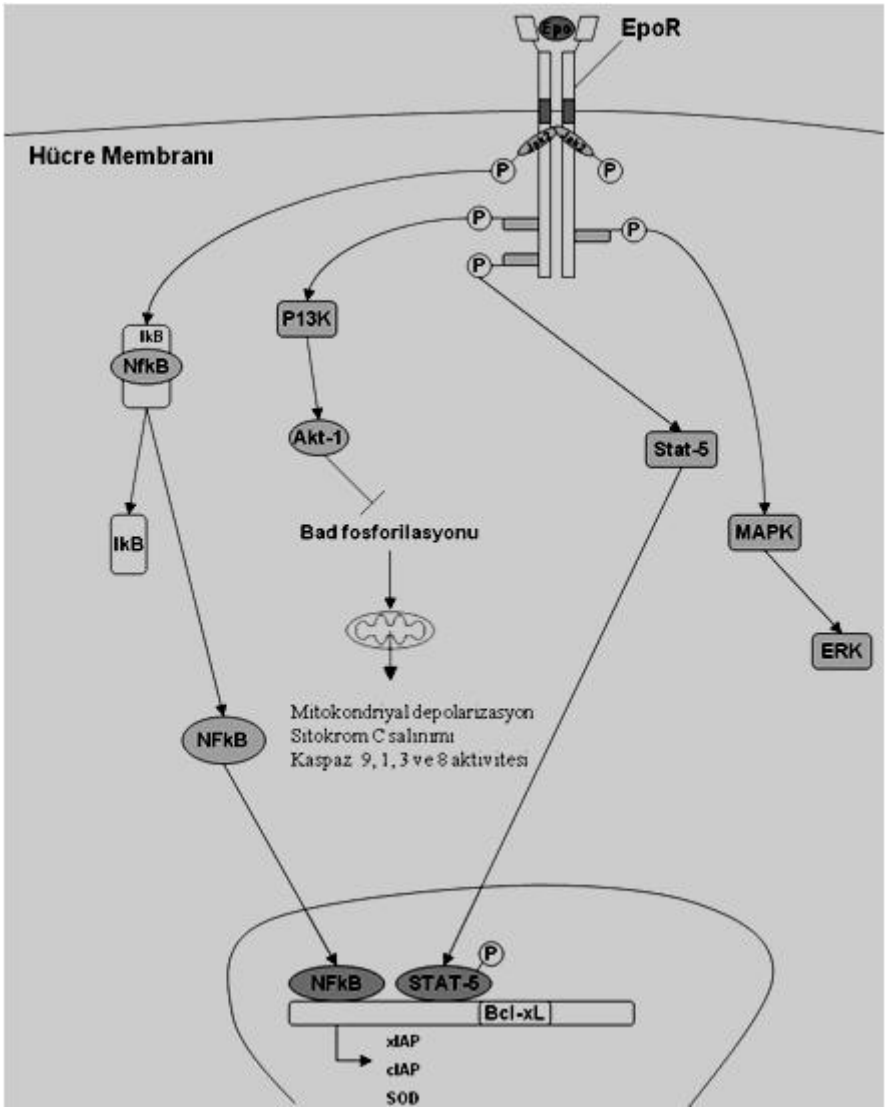
HIE: Hipoksik iskemik ensefalopati; Mpred: Metilprednisolon; NEC: nekrotize edici enterokolit; PVL: periventriküler lökomalasi; ROP: prematür retinopatisi; SAH: Subaraknoid hemoraji

2.2. ERİTROPOETİNİN NÖROPROTEKTİF ETKİ MEKANİZMALARI

EPO'nun nöron koruyucu etkilerinin kesin mekanizması tam olarak bilinmese de hücre canlılığını arttırıcı yolakları uyardığı, antiapoptotik proteinlerin ekspresyonunu arttırdığı, hücre içi kalsiyum metabolizmasını düzenlediği, nitrik oksid üretimini azalttığı, glutamat salınımını baskıladığı, anjiyojenezi ve nörogenezi uyardığı, nörotrofik faktör sentezini arttırdığı, antiapoptotik, antioksidatif ve anti-inflammatuar etki gösterdiği bildirilmiştir (Jelkmann W, 2004; Ehrenreich H, 2004; Maiese K, 2005; Ehrenreich H, 2002; Assandri R, 1999; Kretz A, 2005; Viviani B, 2005; Wang L, 2004; Wei L, 2006; Sun Y, 2005). Ancak EPO'nun bu etkilerinin mekanizmaları henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Eritropoetin uyarımı ile aktive olan, EPO'nun etki mekanizmalarına aracılık eden hücre içi sinyal yolakları Şekil 1'de gösterilmiştir.

2.2.1. Eritropoetinin Anti-Oksidan Etkisi

EPO'nun nöroprotektif etkisinde rol oynayan en önemli mekanizmalardan biri anti oksidan etkisidir. Sıçanlarda gerçekleştirilen bir deneyde diabetik retinada EPO'nun bir türevi olan epoetin deltanın (diğer EPO türevlerinden farkı insan hücre hattı tarafından üretilmiş olmasıdır) antioksidatif etki gösterdiği bulunmuştur (Wang Q, 2010). Deneysel kafa travması ve hipoksik-iskemik hasar modellerinde EPO artmış lipid peroksidasyonunu ve nitrik oksit (NO) düzeyini azaltmaktadır (Ozturk E, 2005; Kumral A, 2005; Sakanaka M, 1998). EPO'nun SOD2 eksikliği olan farelerde astrositleri oksidatif strese karşı koruduğu saptanmıştır (Liu J, 2006). Bu çalışmalar ışığında EPO'nun antioksidan etki gösterdiği düşünülmektedir.



Şekil 1: Eritropoietinin hücreiçi sinyal yolakları. EPO, EPOR'a bağlandıktan sonra JAK2 fosforile olur ve pek çok sinyal yolağını aktive eder. Bu hedeflerinden biri olan PI3K indüklendiğinde, o da AKT'yi aktive eder. AKT; Bad fosforilasyonunu inhibe ederek mitokondriden sitokrom C salınımını ve kaspaz aktivitesini engelleyerek anti-apoptotik özellik gösterir. JAK2 fosforilasyonu tarafından uyarılan diğer bir hedef; NFκB, sitozoldeki inaktif NFκB–IκB kompleksinden ayrılarak nükleusa geçer. Burda hücresel apoptoz inhibitörleri (xIAP and cIAP sırasıyla), superoksit dismutaz (SOD) ve anti-apoptotik genler Bcl-2 ve Bcl-xL'nin transkripsiyonunu indükler. Bcl-2 ve Bcl-xL genlerinin transkripsiyonu JAK2 fosforilasyonu ile indüklenen homodimer STAT5 tarafından da indüklenebilir.

2.2.2. Eritropoetinin Anti-Apoptotik Etkisi

EPO'nun koruyucu etkisine aracılık eden diğer önemli mekanizma da anti apoptotik etkisidir. EPO eritroid öncüsü hücrelerde Fas-Fas ligand (FasL) aracılı apoptozu ve Fas ve FasL gen ve yüzey ekspresyonunu baskılamaktadır (Sun Y, 2005). EPO'nun birçok in vivo ve in vitro nöronal hasar modelinde apoptotik hücre ölümünü azaltıcı etki gösterdiği bildirilmiştir (Yu X, 2002; Bernaudin M, 1999; Siren AL, 2001; Kanaan NM, 2006; Signore AP, 2006; Genc S, 2006). EPO yenidoğan rat beyin iskemisi modelinde apoptotik hücre ölümünü, buna eşlik eden kaspaz aktivasyonu ve sitokrom c salınımını, infarkt hacmini baskılamaktadır. Bu etkilere Signal transducer and activator of transcription 5 (STAT-5) aktivasyonu ve B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) artışı eşlik etmektedir (Wang L, 2004). İskemik inme hasta beyinlerinin otopsi incelemesinde infarkt çevresinde en fazla yoğunlaşan apoptotik hücrelerde Fas ve FasL ekspresyon artışı saptanmıştır. Nöronal EPOR ekspresyonu ise iskemik nöronal nekrozun şiddetiyle ters orantılı bir dağılım göstermektedir (Shurtz-Swirski, 2002). Benzer bir sonuca ulaşılan başka bir deneyde de deneysel kapalı kafa travması modelinde EPO tedavisinin nöronal apoptozu ve kaspaz-3 ekspresyonunu azalttığı belirlenmiştir (Campana WM, 1998). Bu çalışmalar EPO'nun antiapoptotik etkisini desteklemektedir.

2.2.3. Eritropoetinin Anti-İnflamatuvar Etkisi

EPO'nun anti-inflamatuar etkisi pek çok çalışmayla gösterilmiştir. Deneysel intraserebral hemoraji modelinde EPO'nun hematom çevresinde inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve proinflamatuvar sitokin [Tumor necrosis factors-α (TNF-α)] gen ekspresyonunu azalttığı bildirilmiştir (Lee ST, 2006). Örneğin deneysel omurilik hasarı modelinde EPO'nun mikroglial infiltrasyonu ve proinflamatuvar sitokin [Makrofaj inflamatuar protein 2 (MIP-2), TNF-α, interlökin-1β (IL-1β), interlökin-6 (IL-6)] düzeyini azalttığı gösterilmiştir (Gorio A, 2005). Başka bir çalışmada farelerde oluşturulan deneysel travmatik beyin hasarı modelinde EPO'nun motor kaybı azalttığı, bilişsel fonksiyonların geri kazanımını hızlandırdığı, apoptotik hücre ölümüyle birlikte inflamasyonu azalttığı glial hücre aktivasyonu ve komplement C3 salınımı ölçülerek saptanmıştır (Yatsiv I, 2005). Yenidoğan rat hipoksi/iskemi modelinde EPO'nun beyinde proinflamatuvar bir sitokin olan IL-1β düzeyini ve lökosit infiltrasyonunu azalttığı bildirilmiştir (Sun Y, 2005). Deneysel otoimmün ansefalomiyelit modelinde EPO'nun inflamasyonu azaltarak yarar sağladığı gösterilmiştir. Bu

modelde EPO omurilikte inflamatuvar hücre infiltrasyonunu ve proinflamatuvar sitokin (TNF ve IL6) düzeylerini azaltmaktadır (Agnello D, 2002). Deneysel fare otoimmün ansefalomiyelit modelinde EPO ve non-eritropoetik EPO türevleri klinik tabloyu düzeltmekte, omurilikte TNF-α, IL-1β ve interlökin-1Reseptör-α (IL1Ra) düzeylerini, periferik kan mononükleer hücrelerinde interferon gamma düzeyini azaltmaktadır (Savino C, 2006). EPO deneysel inme modelinde infarkt hacmini, apoptotik hücre ölümünü ve inflamasyonu azaltmaktadır, in vitro EPO hipoksi ile indüklenen hipokampal nöron ölümüne karşı koruma sağlamaktadır (Siren AL, 2001). Bütün bu çalışmalar EPO'nun nöroprotektif etkisinde anti-inflamatuar etkisinin önemli rol oynadığına işaret etmektedir.

2.3. mikroRNA

Son 10 yılda biyolojinin çok az alanı RNA moleküler biyolojisi kadar hızlı ve kayda değer bir atılım göstermiştir. Geleneksel görüşe göre protein kodlayan RNA'lar hücresel fonksiyonları düzenlerken protein kodlayan genler de bir organizmanın gelişmişlik seviyesinin belirleyicisiydiler (Lee RC, 1993). Bu nedenle son 20 yılda genom projeleri sonucu ortaya çıkan genomlarda protein kodlayan genlerin aranmasına odaklanılmıştır (Ruvkun G, 2001). Fakat geniş ölçekte yapılan cDNA sekanslama çalışmaları ve karşılaştırmalı analizler, biyolojik gelişmişlik ile protein kodlayan genler arasında doğrudan bir ilişki olmadığını göstermektedir (Lewis BP, 2005; Abrous DN, 2005). Yapılan çalışmalar sonucunda insan genomunun %50'sinin transkripsiyona uğradığı ve oluşan transkriptlerin ise sadece %2'sinin proteine çevrildiği, geri kalan %98'nin kodlama yapmayan RNA'lar (ncRNAs) olduğu gösterilmiştir (Frith MC, 2005). Görünüşe göre ncRNA'lar gelişmiş canlıların genetik ürünlerinin büyük kısmını oluşturmaktadırlar (Sempere LF, 2004). Bu kodlama yapmayan RNA'lar canlıların diferansiyasyon, gelişim vb. fonksiyonlarını kromatin modifikasyonlarının düzenlenmesi, transkripsiyon, RNA modifikasyonları, 'splicing' mRNA translasyonu ve RNA stabilitesi gibi faktörleri etkileyerek düzenlerler (Mattick JS ve Gagen MJ, 2001; Mattick JS, 2003; Prasanth KV, 2005; Willingham AT, 2005). Ayrıca çeşitli kodlama yapmayan RNA sınıflarının santral ve periferik sinir sisteminde bolca eksprese edildiği açıkça gösterilmiştir (Hsieh J ve Gage FH, 2004; Kim J, 2004; Klein ME, 2005). Bu da kodlama yapmayan RNA'ların sinir sistemi gelişimi, fonksiyonu ve hastalıklarında oynadıkları olası rollerin önemini göstermektedir. Bu ncRNA'ların en önemli alt sınıflarından biri de yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda küçük kodlama yapmayan mikroRNA (miRNA)'lardır. Sinir sisteminde miRNA'lar nöronal hücre diferansiyasyonunda, gelişme

esnasındaki sinapsların oluşturulmasında ve inhibisyonunda, yetişkin hayvanlardaki sinaptik plastisitede görevlidirler (Mehler MF, Mattick JS, 2006). Bütün bunlara rağmen sinir sistemindeki miRNA araştırmaları hala daha başlangıç aşamasındadır ve detaylı mekanizmalar henüz açığa çıkarılmaktadır.

2.3.1.mikroRNA Biyogenezi

miRNA'lar, hedef mRNA'nın 3′Untranslated Region (UTR) bölgesine baz eşleşmesiyle bağlanarak gen ekspresyonunu post-transkripsiyonel düzeyde düzenlerler (Bartel DP, 2004; He L, 2004). miRNA'nın çekirdek kısmındaki (miRNA'nın 2-8 nükleotidleri) tamamlayıcılık, hedef mRNA'nın tanınması açısından çok önemlidir, 3′ ucu o kadar önemli değildir ve yanlış eşleşmeler olabilir. Hareket biçimleri sayesinde miRNA'lar gen ekspresyonunu sıkı bir uzamsal ve zamansal kontrol altında tutarlar. Son kanıtların ışığında miRNA'ların farklılaşma, metabolizma ve apoptoz, kardiyogenez ve miyogenez gibi hücresel süreçlerde rol oynadıkları düşünülmektedir (Hutvagner G, 2002; Lim LP, 2005; Bagga S, 2005).

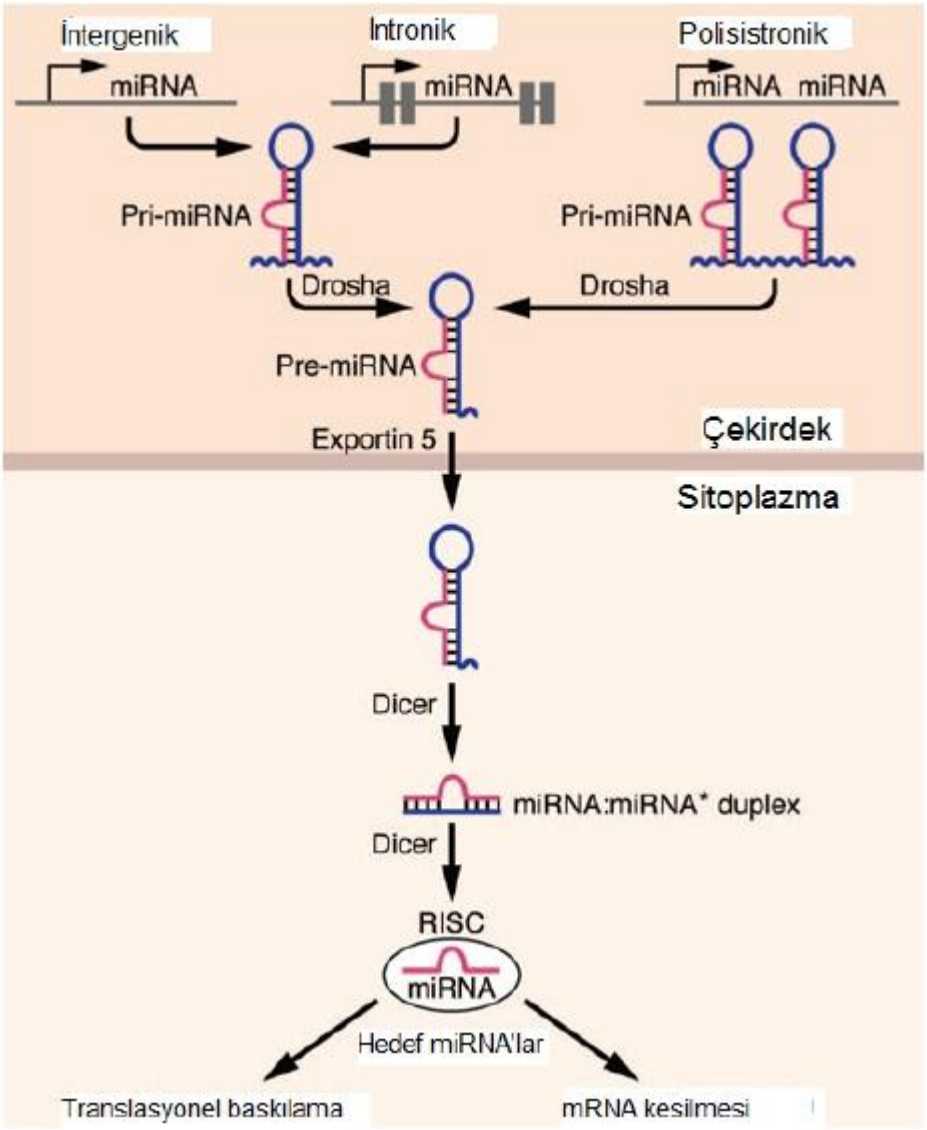
miRNA'ların çoğu kanonik miRNA yolağıyla RNA polimeraz II bağımlı bir mekanizmayla transkripsiyona uğrar fakat RNA polimeraz III'ün de ALU-tekrarlı elemanların içindeki miRNA genlerinin transkripsiyonuna katıldığı bildirilmiştir (Rodriguez, 2004). miRNA'lar önce birincil (primer) transkript, veya pri-miRNA olarak oluşturulurlar, bu transkriptlerin birer başlığı ve poliA kuyruğu vardır (Kim, 2005). Bunlar işlem görüp hücre çekirdeğinde pre-miRNA olarak bilinen kısa, 70 nükleotit uzunlukta, sap-ilmik şekilli, öncül (prekürsör) yapılara dönüşür. Bu işlenme hayvanlarda Mikroişlemci kompleks (Mikroprocessor complex) adlı bir protein kompleksi tarafından gerçekleştirilir. Mikroişlemci kompleks'te Drosha adlı bir nükleaz, ve Pasha adlı çift iplikçikli RNA bağlayıcı protein bulunur (Okamura K, 2004). Pre-miRNA'lar sonra sitoplazmada Dicer adlı endonükleaz ile etkileşerek matür miRNA'ya dönüşürler. Dicer aynı zamanda *RNA-indüklenmiş susturma kompleksi* (İng. *RNA-induced silencing complex*; RISC) oluşumunu başlatır (Caudy AA, 2002). Dicer'ın kesmesinden sonra çift zincirli miRNA bir helikaz tarafından açılır ve genellikle sadece bir zincir *RNA-indüklenmiş susturma kompleksi'*ne girerken (Caudy AA, 2003) diğer zincir parçalanır (Liu Q, 2003; Mourelatos Z, 2002; Tomari Y, 2004). İlgili miRNA sayesinde RISC belli bir mRNA'ya yönlendiğinde, karşılık gelen proteinin ekspresyonunu; translasyonal inhibisyonla ya da hedef transkriptin kesilmesiyle sınırlarlar (Liu J, 2005). Yüksek düzeyde sekans benzerliği mRNA kesilmesini indüklerken, kusurlu baz

eşleşmesi translasyonel baskılamaya neden olur (Meister ve Tuschl, 2004). Hedef transkriptin kesilmesi bitkilerde baskın mekanizmayken (Sen GL, 2005; Pauley KM, 2006) hayvan miRNA'ları gen ekspresyonunu, mRNA translasyonunu engelleyerek sustururlar (He L, 2004). İlginç bir biçimde miRNA aracılı translasyonel baskılamanın geri döndürülebilir olduğu gösterilmiştir (Eystathioy T, 2003; Ding L, 2005). Şekil 2'de miRNA biyogenezi gösterilmiştir.

2.3.2. mikroRNA Ekspresyonunun Düzenlenmesi

Kodlama yapmayan RNA'lar ökaryot transkriptomunda bol miktarda bulunmaktadır ve çevresel olaylara yanıt olarak oldukça iyi kontrol edilirler (Zhang B, 2006). Bazı hayvan miRNA'ları ayrı transkripsiyon ünitelerinden tek başlarına transkripte olsa da çoğu miRNA kümeler halinde transkripte olur (Bartel, 2004). Kümelenmemiş miRNA'lar ya ekzonlarda ya da kodlama yapmayan RNA'ların intronlarında kodlanırlar (Aboobaker AA, 2005).

Çoğu miRNA, büyük oranda gene özgü transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilen, dokuya veya gelişimsel döneme özgü bir ekspresyon sergiler. Son çalışmalar miRNA'ların ve transkripsiyon faktörlerinin birbirlerinin düzenleyicileri olarak çalışabildiklerini göstermiştir (Mansfield JH, 2004; Ronshaugen M, 2005). Kayda değer bir biçimde miRNA ekspresyonunun post-transkripsiyonel düzeyde de düzenlenebildiği gösterilmiştir (Garzon R, 2006).



Şekil 2: miRNA biyogenezi. miRNA genlerinin transkripte edilmesiyle oluşan pri-miRNA'lar Drosha ile işlenerek pre-miRNA'ları oluştururlar. pre-miRNA bir taşıma kompleksi olan exportin 5 yardımıyla çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Daha sonra pre-miRNA sitoplazmada Dicer tarafından kesilir ve miRNA:miRNA* duplex oluşur. Bu iki RNA zincirinden biri miRISC'lerin yapısına katılır. miRISC'lerin hedef mRNA ile tam komplementerlik sağlamadıklarında translasyonel baskılamayı, sağlandığında mRNA kesilmesini yoluyla hedef gen ekspresyonunu baskıladıkları düşünülmektedir.

2.4. SANTRAL SİNİR SİSTEMİNİN GELİŞİMİNDE VE HASTALIKLARINDA MİKRORNA'LARIN ROLÜ

2.4.1. Sinir Sisteminin Gelişiminde ve Fizyolojisinde Rol Oynayan mikroRNA'lar:

Yapılan birçok miRNA ekpresyon profillleme çalışmasında, miRNA'ların önemli bir kesiminin sinir sistemi tarafından spesifik olarak sentezlendiği ortaya konmuştur. Bu sentezlemenin tamamiyle beyin gelişimi sırasında düzenlenmesi, miRNA'ların beyin gelişimi, nöronal farklılaşma, spesifik beyin ve nöral gen ekpresyon regülasyonunda önemli bir rol aldığını göstermektedir (Christensen, 2009). Spesifik miRNA'lar, çeşitli çok katmanlı gelişim mekanizmaları ve sinir sistemi gelişim aşamalarında yer alan; nöral indüksiyon, nöral çeşitlendirme, nöral plak ve nöral tüp gelişimi sırasında aksis oluşumu, nörogenez, nöronal farklılaşma, sinaptogenez, nöral morfogenez, gliogenez, dentritogenez, nöral kök hücre yönlenmesi, nörit büyümesi, nöronal ve glial hücre tipleri arasında spesifik iletişim bölgelerinin kurulması ve korunmasında yer almaktadırlar (Weinberg, 2009). İlk keşfedilen miRNA'lardan biri olan *mLin-41* genindeki mutasyon, gelişim sırasında önemli nöral tüp kapanma bozukluklarına yol açarak, embriyonik ölümcüllüğe sebep olmaktadır. Fare embriyosunun gelişimi sırasında yaklaşık E9.5 evresinde, *mLin-41*'in down-regülasyonu let–7 ekpresyonunda artışa ve miR–125 ile örtüşen patern göstermesine sebep olmaktadır (Maller Schulman BR, 2008). Benzer bir şekilde, let–7 miRNA'sının hedef geninin insan lin–41 geni (HLIN41/TRIM71) olduğunun bulunması, bu genin potansiyel insan gelişim ve bozuklukları ile ilişkili olduğunu göstermiştir (Lin, 2007) . miRNA'lar ayrıca nöral kök hücre (NKH) gibi spesifik kök hücreler ile pluripotent embriyonik kök hücrelerin oluşması ve korunması için gereklidir (Corbin, 2008).

Zebra fishten elde edilen veriler omurgalılarda miRNA'ların erken nöral kader belirlemede çoğunlukla gerekli olmadığı fakat farklılaşmış nöral fenotip ekpresyonunda ve hücre kimliği devamlılığında önemli bir yere sahip olduklarını düşündürmektedir (Mehler, 2007, Chang, 2007).

MikroRNA'lar erişkin sinir sisteminin öğrenme, bellek, uyku, nöroendokrin yanıtlar ve sirkadyen ritim düzenlenmesi gibi fizyolojik işlevlerinde de önemli rol oynamaktadırlar (Lin, 2007; Hosako H, 2009). Sinaptik ve bilişsel işlev bozukluğunun görüldüğü Alzheimer hastalığı, madde bağımlılığı, uyku yoksunluğu, stres gibi patolojik durumlarda beyinde mikroRNA ekspresyon değişikliklerinin görülmesi de bu düşünceyi desteklemektedir (Weinber, 2009).

2.4.2. Sinir Sistemi Hastalıklarında mikroRNA'lar

Nörolojik rahatsızlıkların pek çok çeşidi nöronal morfolojideki değişimlerle tanımlanır. miRNA'ların nöronal morfolojiyi pek çok düzeyde düzenledikleri göz önünde bulundurulursa anormal miRNA işlevlerinin bu tip hastalıklara yol açabileceği öne sürülebilir.

İnme

Beyne yeterli kan gitmemesi sonucu hızla gelişen felç, yetişkin engelliğinin Amerika ile Avrupadaki en önemli, dünya çapında ölümlerin de ikinci en önemli nedenidir (Feigin VL, 2005). Yapılan araştırmalar pek çok hastalıkta olduğu gibi felçte de miRNA'ların önemli roller oynadıklarını düşündürmektedir. Örneğin nöronlarda bulunan miR-151'in orta serebral arter tıkanması sonrasında ekspresyon seviyesinin yükseldiği saptanmıştır (Kim JB, 2004). miR-151'in hedefleri arasında çeşitli hücre döngüsü düzenleyicileri ve protein tirozin kinaz 2 vardır. Bu proteinin orta serebral arter tıkanması sonrası düzenlenişi değişir. Protein tirozin kinaz 2 ayrıca nörit gelişimi, nöronal plastisite ile iskemik alan içindeki nöral ağın onarılmasından sorumlu büyüme faktörü sinyal yolaklarıyla etkileşim içerisindedir (Shimamura N, 2006; Shani V, 2009) .

miR-140 orta serebral arter tıkanmasından 3 saat sonra ekspresyonu hızla artan ve 72 saat boyunca böyle kalan miRNA'lardan biridir. miR-140'ın hedef mRNA'larından biri, santral sinir sisteminde nöral progenitor hücre artışını ve serebral iskemi sonrası doku göçü ve tamirini düzenleyen stromal hücre kökenli factor 1'i kodlar (Nicolas FE, 2008). Bu durum miR-140'ın iskemi sonrasında beyindeki iyileşme yanıtında rol oynadığını düşündürmektedir. Bunun ötesinde beyinde yüksek düzeyde eksprese edilen bazı miRNA'lara periferik kanda rastlanması (Jeyaseelan K, 2008) bunların biyomarkır olarak kullanılma ihtimalinin yanında miRNA'ların serebral iskemiye karşı oluşturulan sistemik yanıtlarda da görevli olabileceğini göstermektedir.

Alzheimer Hastalığı

Yaşlılarda görülen demansın en sık rastlanan sebebi Alzheimer Hastalığıdır (AH). Seyrek görülen, erken başlangıçlı, otozomal baskın kalıtılan ailesel AH patogenezinde önemli rol oynadığı bilinen amiloid preküsör protein (APP)'nin miR-106'nın hedef geni olduğu in vitro çalışmalarla doğrulanmıştır (Patel, 2008). Alzheimer hastalığında beyinde, özellikle hipokampusta miRNA ekspresyonu incelenmiştir. Ekspresyon değişimi gözlenen miR 29a'nın hedeflerinden birisinin hastalığın patogenezine katılan beta-sekretaz olması (BACE) olması

ilgi çekicidir. Hedefi yine BACE1 geni olan miR-107'nin beyin ekspresyonu da AH'da azalmaktadır (Nelson, 2010). miR-107'nin bir başka hedefi de AH'da modifiye edici bir gen olarak rol oynadığı düşünülen granulindir (Wang, 2010). Çalışmalar henüz somut bağlantılar ortaya çıkarmasa da miRNA'ların Alzheimer patogenezinde rol oynadığını düşündürmektedir.

Parkinson Hastalığı

Alzheimer'dan sonra en sık rastlanan nörodejeneratif hastalık olan Parkinson hastalığında (PH) da miRNA'ların rolü olduğu düşünülmektedir. Dicer geninin orta beyin dopaminerjik nöronlarına özgül delesyonunun dopaminerjik nöronların gelişimini engellemesi mikroRNA'ların bu nöronların canlılığı için gerekli olduğunu göstermektedir (Huang, 2010). Özellikle miR-9, miR-124 ve miR-218 ekspresyonunun orta beyinde dicer delesyonuyla en belirgin azalan mikroRNA'lar olduğu saptanmıştır. Ancak bu mikroRNA'ların disregülasyonunun PH patogenezindeki rolü henüz bilinmemektedir. Nigral dopaminerjik nöronlara özgül dicer delesyonu bu hücrelerin nörodejenerasyonuna ve apoptotik hücre ölümüne yol açmaktadır (Kim J, 2007). miRNA'ların hücrelerin normal metabolik aktivitelerini yürütebilmesi için kilit öneme sahiptirler.

Multipl Skleroz

Multipl skleroz (MS) hastalarının periferik kan mononükleer hücrelerinde (PBMC) kPCR yöntemiyle miRNA ekspresyonları karşılaştırıldığında 346 adet miRNA'da değişiklik saptanmıştır (Otaegui D, 2009). Bu mikroRNA'lardan miR-18b ve miR-599 relaps fazı ile ilişkilendirilirken miR-96 remisyon fazı ile ilişkili bulunmuştur. miR-96 interlökin ve Wnt sinyal yolaklarında görevli bazı proteinleri hedefleyerek ekspresyonlarını düzenlemektedir (Otaegui D, 2009). Keller ve ark. tarafından gerçekleştirilen diğer bir çalışmada relapsing-remitting MS hastalarında 165 miRNA'nın ekspresyonlarının değiştiği belirlenmiştir (Keller A, 2009). Çalışma sonucuna göre miR-145'in biyomarkır olarak kullanılabileceği saptanmıştır.

Amiyotrofik lateral skleroz

Tedavisi bulunmayan bu ölümcül hastalık az sayıda olguda ailesel geçiş göstermektedir ve olguların çoğu sporadiktir (Perry, 2010). Fare Amiyotrofik lateral skleroz **(**ALS) modelinde miR-206'nın genetik olarak yetersizliği hastalığın ilerleyişini arttırmaktadır. miR-206, akut periferik sinir hasarından sonra kas-sinir kavşağı rejenerasyonunun etkin olması için gerekli bir moleküldür.

Şizofreni

Şizofreni hastalarının prefrontal kortekslerinde post-mortem yapılan çalışmalar sonucunda sağlıklı insanlara göre değişmiş miRNA seviyeleri saptanmıştır (Perkins, 2007). Ayrıca SNP temelli genetik analizler miR-206 ve miR-198 adlı iki miRNA lokusunun şizofreni ile ilişkisini tanımlanmıştır (Hansen, 2007). Şizofreni ile miRNA'lar arasındaki ilişkiye güçlü bir kanıt yakın zamanda yapılan bir çalışmayla ortaya konmuştur (Bearden, 2001). Yazarlara göre miRNA'ların anormal işlenmesi, şizofreni gelişimi ile oldukça yüksek bir ilişkisi olduğunu düşünülen insan 22q11.2 mikrodelesyonu tarafından meydana getirilen davranışsal ve nöronal bozukluklara katkıda bulunuyor olabilir. 22q11.2 lokusu, Drosha ile etkileşime giren Dgcr8'i kodlayan geni de içerir. Dgcr8$^{+/-}$ fareler bozulmuş bir miRNA işlenmesi gösterirler ve bu da daha küçük dendritik çıkıntılar ve düşük dendritik karmaşıklık ile sonuçlanır. Buna ek olarak yazarlar anormal miRNA biyogenezinin bilişsel ve davranışsal performansı da etkilediğini göstermiştirler.

Bipolar bozukluk

miRNA'lar sinir sisteminin gelişimi ve sinaptik plastisitede oynadıkları rollerle bipolar rahatsızlığın etiyopatolojisinde rol oynamaları kuvvetle muhtemel moleküllerdir. Rong H et al. yaptıkları çalışmada miR-134'ün manik dönemdeki bipolar hastalarda önemli ölçüde azaldığını ve bunun rahatsızlığın şiddeti ve patofizyolojisi ile yakından ilgili olabileceğini öne sürmüşlerdir (Rong H, 2011). Şizofrenik ve bipolar hasta beyninin prefrontal korteks bölgesinde miR-34a, miR-132 ve miR-212 ekspresyonlarıyla hedefleri olarak öngörülen TH ile metabotropik glutamat reseptor 3 düzeyleri düşmüştür (Kim AH, 2010). Yine miR-219'un şizofreni ve bipolar hastalık patogenezinde rol oynadığı düşünülmektedir (Kocerha J, 2009) ve antipsikotik ilaç kullanımı miR-219 ekspresyonunu modüle etmektedir. Dinan TG'ye göre bipolar rahatsızlıkta en önemli aday miRNA'lar miR-34a ve miR-144'tür (Dinan TG, 2010).

2.5. ERİTROPOETİN mikroRNA İLİŞKİSİ

Daha önce EPO'nun nöronal hücrelerdeki nöroprotektif etkisinin mekanizmalarını ortaya çıkarmak üzere tüm beyinde gerçekleştirilen transkriptom (Martin, 2002), hücre kültüründeki PC12 ve kortikal hücrelerde proteom (Bruno, 2006) ve yine PC12'de cDNA array hibridizasyon ve RT-PCR metotları kullanılarak mRNA düzeyleri (Michael, 2002) incelenmiştir. EPO'nun nöroprotektif etki mekanizmalarından biri transkripsiyonel düzeyde

miRNA'lar aracılığıyla gen regülasyonu olabilir. Kosaka ve ark. 2008 yılında yayınlanan çalışmalarında EPO'nun UT-7 hücre hattında miRNA ekspresyonunda değişim meydana getirdiğini ve bu miRNA'lardan miR-210'un eritroid farklılaşmasında rol oynayabileceğini göstermişlerdir. Diğer ekspresyonu yükselen miRNA'lar: miR-188, miR-362'dir (Kosaka, 2008). Bu çalışma EPO'nun etkilerinde miRNA aracılığının kanıtıdır. Bizim çalışmamızda EPO'nun SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattında miRNA ekspresyonu üzerindeki etkisi incelenmiştir. Santral sinir sisteminde EPO'nun etkilerinde miRNA değişiminin rolü üzerine *in vivo* ve *in vitro* çalışma yapılmamıştır. EPO, hücre tipine bağlı olarak farklı miRNA'ların ekspresyonunu değiştirebilir.

2.6. miRNA DETEKSİYON YÖNTEMLERİ

miRNA ekspresyonu hücre tipine ve içinde bulunduğu duruma (diferansiyasyon, onkogenez vb.) göre büyük farklılıklar sergiler. Hatta hastalıklar ve miRNA ekspresyon seviyelerindeki bu korelasyon nedeniyle miRNA'ların biyomarkır olarak kullanımı gündeme gelmiştir. Bunun mümkün olması için öncelikle miRNA'ların hassas ve kesin şekilde tespit edilebilmesi gerekmektedir. Bunu başarabilmek için teknik zorluklar; miRNA'ların kısa (22 nükleotit) olması, GC içeriklerinin değişken olması nedeniyle oldukça değişken erime sıcaklıklarında (T_m) oluşları, Erişkin miRNA'ların, selektif tesbitlerini kolaylaştıran ortak bir sekanstan yoksun oluşları, Hedef sekansın hem pri-miRNA, hem pre-miRNA hem de erişkin miRNA'da bulunması ve son olarak aynı aileye ait miRNA'ların bir tek sekans farkıyla birbirlerinden ayrılmalarıdır (Vladimir, 2010).

miRNA ekspresyon miktarlarını belirlemek için daha ziyade örneklerden izole edilen ve 200 nükleotitten küçük RNA'lar bakımından zenginleştirilmiş toplam RNA'lar kullanılmaktadır. Şayet ekspresyonu analiz edilecek miRNA türü biliniyor ve sınırlı sayıda miRNA ekspresyonu analiz edilecekse (1-20), genellikle tercih edilen yöntem northern blot ya da RNAz koruma (RNAse Protection Assay, RPA) metotlarıdır (Valoczi, 2004). *In situ* hibridizasyonda (Gupta, 2010) miRNA deteksiyonunda kullanılmaktadır. Ancak, genomik seviyede miRNA tarama çalışmaları için daha az prob ve RNA gerektiren mikroarray veya kPCR teknikleri tercih edilmektedir (Krichesky, 2003). Bunlara ilave olarak SAGE (serial analysis of gene expression) ve derin sekanslama teknikleri de global miRNA profilleme çalışmalarında sıklıkla kullanılmaktadır. miRNA deteksiyonunda kullanılacak tekniğin seçiminde hücreden elde edilebilecek RNA miktarı, analiz edilecek miRNA sayısı, tekniğin

duyarlılığı ve güvenilirliği, veri analiz programlarının bulunup bulunmaması, fiyat ve iş yükü göz önünde bulundurulması gereken unsurlar arasında yer almaktadır.

Mikroarray

Çalışmamızda kullandığımız yöntemlerden biri olan mikroarray bütünsel bir yaklaşımın bir parçası olarak hücre içerisinde meydana gelen değişiklikleri ucuz, hızlı ve güvenilir bir şekilde analiz etmek ihtiyacından doğmuş bir teknolojidir (Shena, 1995). Mikroarray analizinin temel prensibi binlerce genin DNA'sının bireysel noktalar halinde bir kaç santimetrekarelik katı bir tabana (çip) yayıldıktan sonra hazırlanan işaretli problara (örneğin floresan işaret) eşleştirilmesi temeline dayalıdır. Çip üzerine yerleştirilen prob sayısına bağlı olarak binlerce transkript veya DNA sekansı aynı anda, ucuza ve tekrarlanabilir bir şekilde analiz edilebilmektedir.

miRNA mikroarray uygulamalarında, klasik toplam RNA izolasyonlarında RNA'nın %80-85'ini ribozomal RNA'lar oluşturduğundan RNA örneklerinin 200 nükleotitten küçük RNA'lar bakımından zenginleştirilmesi gerekmektedir. İşaretleme ve hibridizasyon gibi analizin sonraki aşamalarında sorun yaşamamak için RNA kalitesinin mutlaka belirlenmesi ve belli bir kalitenin altına düşen örneklerin kullanılmaması gerekmektedir (Ranade AR, 2011). miRNA mikroarray uygulamalarının ilk aşamasını biyokimyasal reaksiyonlar oluşturmaktadır. Bu aşamada seçilen platforma uygun olarak floresan işaretli örnekler hazırlanmakta olup çiplere hibridizasyon sonrası yıkamalar yapılmaktadır. Veri toplama işlemi ikinci aşamada olup güçlü bilgisayarlara bağlı lazerli tarayıcılarla yapılmaktadır. Üçüncü ve son aşamada ise veri normalizasyonu, veri analizi ve istatistiksel hesaplamalar yapılmaktadır. Veri normalizasyonu için en sık kullanılan metotlar; Quantile (Bolsted, 2003), LOESS (Locally Weighted Regression and Smoothing Scatterplot) (Steinhoff, 2006), variance stabilization (Sarkar, 2009), invarient-based (Hua, 2009) ve medyan normalizasyonlarıdır.

Kantitatif PCR

kPCR yöntemi genellikle mikroarray veya derin sekanslama gibi yöntemlerle elde edilen verileri doğrulamak amacıyla kullanılmaktadır. kPCR; cDNA sentezlenmesi, PCR ürünlerinin deteksiyonu ve data analizi olmak üzere üç aşamadan oluşmaktadır. İlk aşamada amaç yüksek kaliteli RNA'nın tamamının güvenilir bir şekilde cDNA'ye dönüştürülmesidir. miRNA'lardan cDNA elde etmek için genellikle iki yaklaşım kullanılmaktadır. İlk yaklaşımda miRNA'lar teker teker cDNA'ya dönüştürülmektedir. Nitekim çoklu miRNA deteksiyonu gerekli

durumlarda her bir miRNA'nın ayrı ayrı cDNA'ya dönüştürülmesi için oldukça fazla RNA gerekli olup hazırlanması zor veya nadir bulunun örneklerde büyük sorun teşkil etmektedir. İkinci yaklaşım olarak *E. coli* poly(A) polimeraz kullanılarak 3' uca kuyruk eklenmektedir (Shi, 2005). Daha sonra universal primer bağlanma sekansı içeren oligod(T) sekansları kullanılarak cDNA hazırlanmaktadır. PCR aşamasında ise miRNA'nın 5' ucuna eşleşen primer ve universal primer kullanılarak çoğaltma işlemi yapilmaktadir. İkinci aşamayı oluşturan PCR ürün miktarının gerçek zamanlı ölçülmesinde miRNA deteksiyonu için floresan deteksiyon boyası olarak SYBR green I ve Taqman prob kullanılmaktadır (Kutyavin, 2000). SYBR green I; çift zincirli DNA'ya bağlanarak mavi ışıkla uyarıldığında (λ= 488nm) yeşil ışık (λ= 522nm) veren florasan boyadır. Taqman prob ise gerçek zamanlı PCR uygulamalarının spesifitesini arttırmak için kullanılan hidroliz problarıdır. Üçüncü aşamada iki farklı örnekte bulunan miRNA miktarı karşılaştırılarak miRNA miktarında meydana gelen değişikliklerin tespiti için gerekli veri normalizasyonu yapılır. kPCR datası toplandıktan sonra $\Delta\Delta C_t$ metodu kullanılarak analiz yapılmaktadır (Livak, 2001). C_t değeri; örneğin eksponansiyel çoğaltma sırasında belli bir sınır değere ulaşana kadar geçirdiği döngülerin sayısıdır. Sonucun anlamlı olması için C_t değerinin 10 ile 35 arasında olması gerekir. Data analizi esnasında mRNA ekspresyonuna benzer bir şekilde, miktarı değişmeyen bir RNA internal kontrol olarak kullanılmalıdır. Genelde birden çok kontrol geninin kullanılması analizin spesifitesini arttırır (Vandesompele 2002; Andersen 2004).

Veri analizinin ardından tespit edilen miRNA'ların hedef genleri belirlenmek istenirse bunun için çeşitli tahmin programları bulunmaktadır. Bu programlar arasından en çok kullanılanlar; sekans uyumuna, RNA-RNA sarmalının serbest enerjisine ve korunmanın miktarına bağlı olarak tahmin yapan miRanda (Enright AJ, 2003; Griffiths-Jones S, 2008), çekirdek bölgenin (seed) uyumuna, bağlanmanın termodinamik serbest enerjisine ve farklı türlerdeki korunuma göre tahmin yapan Targetscan (Lewis BP, 2005; Friedman RC, 2009) ile çekirdek bölgenin (seed) uyumuna, birlikte eksprese edilen miRNA'ların ortak hedeflerine göre tahmin yapan PicTar (Krek A, 2005) programlarıdır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM:

3.1. Araştırmanın Tipi:

Çalışma deneysel bir araştırmadır.

3.2. Araştırmanın Yeri ve Zamanı:

Çalışmamız Mayıs 2009 ile Ocak 2011 arasında gerçekleştirilmiştir. Deneylerin tamamı 9 Eylül Üniversitesi Araştırma laboratuarında (Arlab) gerçekleştirilmiştir.

3.3. Çalışma Materyali:

Araştırmada pasaj 12'deki SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattı kullanılmıştır.

3.4. Araştırmanın Değişkenleri:

miRNA ekspresyon seviyeleri: (bağımlı değişken)
EPO (bağımsız değişken)

3.5. Veri toplama Araçları:

3.5.1. Hücre Kültürü

Pasaj 11'deki SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri -80°C'deki dondurucudan alınarak 37^{0}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 medyum 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 medyum bulunan flaska aktarıldı. Ertesi gün medyum değiştirildi. Kültür kabı her gün invert mikroskop ile kontrol edildi, hücreler konfluent oldukları gün tripsinlenerek pasajlandılar.

3.5.2. İn vitro Deney

Pasaj 12'deki SH-SY5Y nöroblastoma hücreleri 75 cm^{2}'lik hücre flasklarına (Greiner,USA) 10^{6} 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 CO_2'li ve nemli hava içeren etüvde (Revco, USA) inkübe edildi. İnkübasyonun ardından üç kontrol flaskında %1 FBS içeren DMEM F-12 ortamına geçildi. Diğer üç flaskta da %1 FBS içeren DMEM F-12 ortamına geçildi. EPO indüksiyonu 1 U/ml dozda ve 24 saat süreyle uygulandı.

3.5.3 RNA İzolasyonu

İn vitro deney sonrasında mikroarray için hücrelerden total RNA izolasyonu firmanın önerilerine uygun biçimde *NucleoSpin® RNA* II *Kit*'inin PT3693-2 numaralı protokolüne uygun olarak gerçekleştirilmiştir. 5x 10^6 hücre içeren santrifüj tüpüne 350 µl RA1 tamponu ve 3.5 µl β-merkaptoethanol eklendi ve lizis edildi. Pipetaj yapıldı ve iyice vortekslendi (Velp, İtalya). 350 µl %70 ethanol eklendi ve iyice vortekslendi. Lizat farklı tüplere aktarıldı. 30 sn 8000g'de santrifuj (Sigma, USA) edildi. 350 µl MDB (Membrane Desalting Solution) eklendi. 1dk 11.000g de santrifuj edildi. Steril bir mikrosantrifuj tüpünde DNase reaksiyon karışımı hazırlandi. Her bir örnek için 10 µl DNase I, 90 µl DNase reaction buffer koyuldu. Tüp alt üst edilerek karıştırıldı. 95 µl DNase reaksiyon karışımı silika membranın tam ortasına uygulandı ve oda ısısında 15 dk inkubasyona bırakıldı. 200 µl RA2 bufferı eklendi. 30 sn 8.000g de santrifuj edildi. Kolon yeni bir toplama tüpüne koyuldu. 600 µl RA3 bufferı eklendi. 30 sn 8000g de santrifuj edildi. 250 µl RA3 bufferı eklendi. 2 dk 11.000g de santrifuj edildi. Kolon 1.5 ml'lik nükleaz free mikrosantifuj tüpüne koyuldu. Membranın ortasına 25µl RNase free su eklendi. 1 dk, 11.000g de santrifuj edilerek RNA toplandı. Örnek 1:25 oranında seyreltilerek hazırlandi. UV – Spektrofotometreden A_{280} / A_{260} oranı ölçüldü.

KPCR analizi için RNA, Qiagen'in miRNeasy mini kit'i ile izole edilmiştir. Tüm işlem üreticinin belirttiği biçimde gerçekleştirilmiştir. Öncelikle hücreler flasklardan toplandıktan sonra lizis için 350 µl RLT tamponu eklendi. Lizat firmanın 2ml'lik toplama tüpündeki döndürme kolonuna eklenip 2dakika azami hızda santrifüj edildi. 350 µl %70 ethanol eklendi ve vortekslenmeden pipetle iyice karıştırıldı. Örneğin 700 µl'si firmanın 2ml'lik toplama tüpüne aktarıldı ve 15 saniye 8000g'de santrifüj edildi. Süzüntü atıldı. 700 µl RW1 tamponu tüpe eklendi ve 15s 8000g'de santrifüj edildi. 500 µl RPE tamponu tüpe eklendi ve 15s 8000g'de santrifüj edildi. 500 µl RPE tamponu tüpe eklendi ve 2 dakika 8000g'de santrifüj edildi. Döndürme kolonu yeni bir 2 ml'lik toplama tüpüne aktarılarak 1 dakika son süratte santrifüj edildi. Döndürme kolonu yeni bir 1.5 ml'lik toplama tüpüne aktarıldı. 50 µl RNAz bulundurmayan su eklendi ve 1 dakika 8000g'de santrifüj edildi.

3.5.4. miRNA Mikroarray Analizi

Mikroarray analizi için Febit firmasından hizmet satın alınmıştır. Mikroarray analizi için kullanılan problar Sanger miRBase'in 14.09.2009 tarihli veritabanında bulunan tüm homo sapiens matür ve matür* miRNA'larının ters komplementerleri şeklinde tasarlanmıştır (http://microrna.sanger.ac.uk/sequences/index.shtml). Firmanın patentli 'Microfluidic Primer Extension Assay' adlı yöntemi ile işaretlenmemiş miRNA'lar hibridizasyon için kullanılır. İkinci adımda DNA polimeraz I'in Klenow fragmanları firmanın kullandığı özel sekiz kanallı biyoçipin kanallarına eklenir ve burada uzama basamağı gerçekleşir. Nükleotidlerin işaretlenmesi için biotin ile streptavidin–phycoerythrin (SAPE) molekülleri kullanılmıştır.

3.5.5. miRNA KPCR array analizi

KPCR analizi için System Biosciences firmasından hizmet satın alınmıştır. İlk olarak total RNA örneğindeki mikroRNA'lara 'Sanger miRBase microRNA' veritabanındaki bilgilere dayalı olarak poliA kuyruğu sentezlenerek işaretlenmiştir. Bu aşamadan sonra yine aynı veritabanındaki bilgilere göre hazırlanan primerler yardımıyla mikroRNA'lar cDNA'ya çevrilip KPCR'da ekspresyonlarındaki kat değişimi tayin edilmiştir. İşaretleme için SYBR Green I DNA boyası kullanılmıştır.

3.5.6. miRNA hedeflerinin ve bu hedeflerin yolaklarının analizi

miRNA hedef analizi Targetscan release 5.1 (http://www.Targetscan.org/) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Yapılan analiz öngörülen (predicted) hedefleri kapsamaktadır. Hedef proteinler belirlendikten sonra rol aldıkları yolakların saptanması için KEGG (http://www.genome.jp/kegg/pathway.html) yazılımından yararlanılmıştır.

3.6. Araştırma Planı ve Takvimi:

Projelendirme	Mayıs 2009 - Temmuz 2009
Veri toplama	Temmuz 2009 – Aralık 2009
Veri analizi	Aralık 2009 – Ocak 2011
Yazım	Aralık 2009 – Mart 2011

3.7. Verilerin Değerlendirilmesi:

KPCR verileri SPSS 16.0 paket programı kullanılarak çözümlenmiştir. Her iki yöntemde de ekspresyon değişimlerinin anlamlı olup olmadığını belirlemek için parametrik t-testi uygulanmıştır. Tüm analitik değerlendirmelerde p 0.05 anlamlılık sınırı olarak kabul edilmiştir.

3.8. Araştırmanın Sınırlılıkları:

Araştırmamızda kullandığımız SH-SY5Y hücre hattı nöron benzeri bir kanser hücre hattıdır. EPO'nun nöronlardaki miRNA ekspresyonunu nasıl etkilediğini daha iyi görmek için diferansiye hücrelerle ya da primer kültürle yapılacak bir çalışma daha uygun olabilir. Ayrıca mikroarray analizi için gönderilen RNA'ların toplanması küçük RNA'lara özgü bir kit ile değil total RNA izolasyon kiti ile yapıldığından bu da verilerin duyarlılığını etkilemiş olabilir.

3.9. Etik Kurul Onayı:

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik ve Laboratuvar Araştırmaları Etik Kurulu 14 Mayıs 2009 tarih ve 12.11.2009 no.lu toplantısında; 119/2009 protokol numaralı çalışmamızın etik açıdan sakıncalı olmadığına karar vermiştir.

4. Bulgular

4.1. Mikroarray'de Eritropoietin ile Ekspresyonu Değişen miRNA'ların Belirlenmesi

Tablo 2'de miRNA arrayde ekspresyonunun en çok değiştiği belirlenen 30 miRNA gösterilmiştir. Ekspresyon değişimi kat olarak verilmiştir.

Tablo 2: Mikroarray analizi sonucunda ekspresyon değişimi en çok olan 30 miRNA

miRNA adı	Ekspresyon değişim miktarı	p değeri
miR-1228	0,32	0,27
miR-23b	0,39	0,55
miR-1178	0,35	0,39
miR-1281	0,32	0,27
miR-1979	0,35	0,27
miR-483-3p	0,15	0,11
miR-574-3p	0,36	0,33
miR-320c	0,37	0,44
miR-2117	2,68	0,51
miR-432	0,39	0,27
miR-885-5p	**0,22**	**0,02**
miR-1236	**0,17**	**0,05**
miR-1260	0,29	0,11
miR-520h	2,65	0,49
Let-7c	0,29	0,27

miRNA adı	Ekspresyon değişim miktarı (kat)	p değer
miR-595	0,23	0,11
miR-148a	2,72	0,35
miR-185	0,30	0,11
miR-19b-2*	0,39	0,35
miR-451	**0,17**	**0,02**
miR-328	0,35	0,27
let-7e	0,34	0,44
miR-223	0,24	0,20
miR-486-5p	0,34	0,32
miR-30b	0,29	0,20
miR-574-5p	0,33	0,35
miR-193b*	0,39	0,27
miR-618	0,30	0,44
miR-1238	0,32	0,44
miR-1280	0,35	0,35

Tabloda da görüldüğü gibi p değeri anlamlı olan ($p<0.05$) 3 miRNA vardır. Bunlar miR-451, miR-885-5p ve miR-1236'dır.

4.2. Kantitatif PCR'da Eritropoietin İndüksiyonuyla Ekspresyonu Değişen miRNA'ların Belirlenmesi

Aşağıda kPCR analizi sonucunda en çok değişim gösteren miRNA'ların ekspresyon değişimi tablosu verilmiştir.

Tablo 3: KPCR analizi sonucunda ekspresyon değişimi saptanan miRNA'lar

MicroRNA	Örneklerin ekspresyon değişiminin ortalaması	p
hsa-miR-29b	0.45	0,0617207
hsa-miR-219-5p	0.63	0,1770646
hsa-miR-301b	0.59	0,1325888
hsa-miR-621	0.45	0,210059
hsa-miR-638	7.78	0,0877046
hsa-miR-640	**0.06**	**0,027453**
hsa-miR-645	0.50	0,1589293
hsa-miR-769-5p	0.42	0,168967
hsa-miR-1208	0.43	0,2052056
hsa-miR-1259	0.42	0,6921939
hsa-miR-1286	0.43	0,0965036
hsa-miR-1193	0.47	0,252542
hsa-miR-3154	0.29	0,2933112
hsa-miR-4259	9.51	0,0679479
hsa-miR-4303	**2.24**	**0,0181305**
hsa-let-7a*	0.21	0,1337974
hsa-miR-431*	0.16	0,3884708
hsa-miR-1915*	0.00	0,172892

Burdaki verilere göre p değeri anlamlı olan ($p<0.05$) iki miRNA hsa-miR-640 ve hsa-miR-4303'tür.

4.3. Anlamlı değişim gösteren mikroRNA'ların olası hedef genleri ve yolakları

Mikroarray ve KPCR sonuçlarında anlamlı değişim gösteren miRNA'ların varsayılan hedeflerini belirlemek için Targetcan ve hedef genlerin hangi yolakta rolü olduğunu belirlemek için KEGG yazılımından yararlanılmıştır.

Tablo 4: Epo uyarımı ile anlamlı değişim gösteren miRNA'ların Targetscan de saptanan hedef gen sayıları

miRNA ismi	Varsayılan hedef gen sayısı
miR-885-5p	124
miR-1236	247
miR-451	14
miR-640	110

Tablo 5: Epo uyarımı ile anlamlı değişim gösteren miRNA'ların hedef genlerinin Yolakları

bol	Ad	Biyokimyasal yolizi	miRNA
B8	proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8 (large multifunctional peptidase 7)	Proteasome	Mir-451
	titin	Tight junction, Bacterial invasion of epithelial cells, Pathogenic Escherichia coli infection, Shigellosis, Hypertrophic cardiomyopathy (HCM), Dilated cardiomyopathy	Mir-451
1	tuberous sclerosis 1	mTOR signaling pathway, Insulin signaling pathway,	Mir-451
B39	calcium binding protein 39	mTOR signaling pathway	Mir-451
	glycerol kinase	Aldosterone-regulated sodium reabsorption, Metabolic pathways, Glycerolipid metabolism, Glycerophospholipid metabolism, Phosphatidylinositol signaling system, Glycolysis / Gluconeogenesis, Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis, PPAR signaling pathway, Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, MAPK signaling pathway	Mir-451
HAZ	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, zeta polypeptide	Cell cycle, Oocyte meiosis, Neurotrophin signaling pathway, Pathogenic Escherichia coli infection	Mir-451
PA	VAMP (vesicle-associated membrane protein)-associated protein A	Tight junction	Mir-451
K N2D	cyclin-dependent kinase inhibitor 2D	Cell cycle	Mir-451
NB1	catenin (cadherin-associated protein), beta 1	Adherens junction, Pathways in cancer, Endometrial cancer, Leukocyte transendothelial migration, Colorectal cancer, Wnt signaling pathway, Focal adhesion, Tight junction, Melanogenesis, Bacterial invasion of epithelial cells, Pathogenic Escherichia coli infection, Prostate cancer, Thyroid cancer, Basal cell carcinoma, Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy (ARVC)	miR-885-5
E2N	ubiquitin-conjugating enzyme E2N	Ubiquitin mediated proteolysis	miR-885-5p
34	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 4	Chemokine signaling pathway	miR-885-5p
K1	pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1	Insulin signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Toxoplasmosis, Hepatitis C, Neurotrophin signaling pathway, Non-small cell lung cancer, PPAR signaling pathway, mTOR signaling pathway, Focal adhesion, Endometrial cancer, Prostate cancer	miR-885-5
MK4	calcium/calmodulin-dependent protein kinase IV	Calcium signaling pathway, Osteoclast differentiation, Long-term potentiation, Neurotrophin signaling pathway	miR-885-5
N1	netrin 1	Cell adhesion molecules, Axon guidance	miR-885-5p
40	U2-associated SR140 protein	Spliceosome	miR-885-5p
BR1	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, alpha isoform	MAPK signaling pathway, Calcium signaling pathway, Oocyte meiosis, Apoptosis, Wnt signaling pathway, Axon guidance, VEGF signaling pathway, Natural killer cell mediated cytotoxicity, T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, Long-term potentiation, Alzheimer's disease, Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	miR-885-5p
	ret proto-oncogene	Retinol metabolism, Protein processing in endoplasmic reticulum, Collecting duct acid secretion, Salivary secretion, Gastric acid secretion, Pancreatic secretion, Bile secretion, Retinoic acid receptor (RAR) and retinoid X receptor (RXR) agonists/antagonists	miR-885-5p
E2K	ubiquitin-conjugating enzyme E2K	Ubiquitin mediated proteolysis	miR-885-5p
P1A	DCP1 decapping enzyme homolog A	RNA degradation	miR-885-5p
2	5-azacytidine induced 2	RIG-I-like receptor signaling pathway	miR-885-5p
1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	RNA transport	miR-885-5p
L5A2	collagen, type V, alpha 2	ECM-receptor interaction, Amoebiasis, Focal adhesion, Protein digestion and absorption	miR-885-5p
M8	glutamate receptor, metabotropic 8	Neuroactive ligand-receptor interaction	miR-885-5p

4G2	eukaryotic translation initiation factor 4 gamma, 2	RNA transport, Viral myocarditis	miR-885-5p
CA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	ABC transporters, Fat digestion and absorption	miR-885-5p
DBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	Ubiquitin mediated proteolysis	miR-885-5p
6V1C2	ATPase, H+ transporting, lysosomal 42kDa, V1 subunit C2	Metabolic pathways, Phagosome, Oxidative phosphorylation, Collecting duct acid secretion, Vibrio cholerae infection, Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection, Rheumatoid arthritis	miR-885-5p
CC9		ABC transporters	miR-885-5p
P9	aquaporin 9	Bile secretion	miR-885-5p
E2NL	ubiquitin-conjugating enzyme E2N-like	Ubiquitin mediated proteolysis	miR-885-5p
M1	sperm adhesion molecule 1	Glycosaminoglycan degradation, Metabolic pathways	mir-640
PDA1	glucosamine-6-phosphate deaminase 1	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism, Metabolic pathways	mir-640
K_	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	Glycosylphosphatidylinositol(GPI)-anchor biosynthesis, Metabolic pathways	mir-640
_	eukaryotic translation initiation factor 5	RNA transport	mir-640
P3K1	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1	MAPK signaling pathway, GnRH signaling pathway, GnRH signaling pathway, Ubiquitin mediated proteolysis, Apoptosis, Osteoclast differentiation, RIG-I-like receptor signaling pathway, T cell receptor signaling pathway, Intestinal immune network for IgA production, Neurotrophin signaling pathway, Epithelial cell signaling in Helicobacter pylori infection	
K2	glutamate receptor, ionotropic, kainate 2	Neuroactive ligand-receptor interaction	mir-640
7C	cytochrome c oxidase subunit VIIc	Metabolic pathways, Oxidative phosphorylation, Cardiac muscle contraction, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease	mir-640
NAB	glucosidase, alpha; neutral AB	N-Glycan biosynthesis, Metabolic pathways, Protein processing in endoplasmic reticulum	mir-640
LG	KIT ligand	Hematopoietic cell lineage, Cytokine-cytokine receptor interaction, Pathways in cancer, Melanogenesis	mir-640
1R3A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 3A	Insulin signaling pathway	mir-640
rf16	chromosome 7 open reading frame 16	Long-term depression	mir-640
VR2B	activin A receptor, type IIB	Cytokine-cytokine receptor interaction, TGF-beta signaling pathway	mir-640
A1	early endosome antigen 1	Endocytosis, Phagosome	mir-640
G1	B-cell translocation gene 1, anti-proliferative	RNA degradation	mir-640
A2	nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2	Maturity onset diabetes of the young	mir-640
C	clathrin, heavy chain (Hc)	Lysosome, Endocytosis, Huntington's disease, Bacterial invasion of epithelial cells	mir-640
G	LFNG O-fucosylpeptide 3-beta-N-acetylglucosaminyltransferase	Other types of O-glycan biosynthesis, Notch signaling pathway	mir-640
7A2	cytochrome c oxidase subunit VIIa polypeptide 2 (liver)	Oxidative phosphorylation, Cardiac muscle contraction, Alzheimer's disease, Parkinson's disease, Huntington's disease	mir-640
E2E2	ubiquitin-conjugating enzyme E2E 2	Protein processing in endoplasmic reticulum, Ubiquitin mediated proteolysis	mir-640
CY9	adenylate cyclase 9	Purine metabolism, Calcium signaling pathway, Chemokine signaling pathway, Oocyte meiosis, Vascular smooth muscle contraction, Gap junction, GnRH signaling pathway, Progesterone-mediated oocyte maturation, Melanogenesis, Vasopressin-regulated water reabsorption, Salivary secretion, Gastric acid secretion, Pancreatic secretion, Bile secretion, Vibrio cholerae infection, Dilated cardiomyopathy	mir-640
DBTB1	Rho-related BTB domain containing 1	Ubiquitin mediated proteolysis	mir-640
BR1	protein phosphatase 3 (formerly 2B), regulatory subunit B, alpha isoform	MAPK signaling pathway, Calcium signaling pathway, Oocyte meiosis, Apoptosis, Wnt signaling pathway, Axon guidance, VEGF signaling pathway, Natural killer cell mediated cytotoxicity, T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, Long-term potentiation, Alzheimer's disease, Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	mir-640
	coagulation factor V (proaccelerin, labile factor)	Complement and coagulation cascades	miR-1236
PAT	glyceronephosphate O-acyltransferase	Glycerophospholipid metabolism, Peroxisome	miR-1236
2	calcineurin B homologous protein 2	MAPK signaling pathway, Calcium signaling pathway, Oocyte meiosis, Apoptosis, Wnt signaling pathway, Axon guidance, VEGF signaling pathway, Natural killer cell mediated cytotoxicity, T cell receptor signaling pathway, B cell receptor signaling pathway, Long-term potentiation, Alzheimer's disease, Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	miR-1236
LNT4	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 4 (GalNAc-T4)	Mucin type O-Glycan biosynthesis, Metabolic pathways	miR-1236
MK2G	calcium/calmodulin-dependent protein kinase (CaM kinase) II gamma	Glioma, ErbB signaling pathway, Calcium signaling pathway, Oocyte meiosis, Wnt signaling pathway, Long-term potentiation, Neurotrophin signaling pathway, Olfactory transduction, GnRH signaling pathway, Melanogenesis, Gastric acid secretion	miR-1236
B	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog B	Osteoclast differentiation	miR-1236
F41	ring finger protein 41	Endocytosis	miR-1236
DT2	CCR4-NOT transcription complex, subunit 2	RNA degradation	miR-1236
R4	5-hydroxytryptamine (serotonin) receptor 4	Calcium signaling pathway, Neuroactive ligand-receptor interaction	miR-1236
AD3	SMAD family member 3	TGF-beta signaling pathway, Wnt signaling pathway, Adherens junction, Chronic myeloid leukemia, Cell cycle, Endocytosis, Chagas disease, Pathways in cancer, Colorectal cancer, Pancreatic cancer,	miR-1236
AD2	SMAD family member 2	TGF-beta signaling pathway, Colorectal cancer, Cell cycle, Endocytosis, Chagas disease, Pathways in cancer, Pancreatic cancer, Wnt signaling pathway, Adherens junction	miR-1236
D	jun D proto-oncogene	MAPK signaling pathway, Osteoclast differentiation	miR-1236
G4	discs, large homolog 4 (Drosophila)	Huntington's disease	miR-1236
L11A2	collagen, type XI, alpha 2	ECM-receptor interaction, Amoebiasis, Focal adhesion, Protein digestion and absorption	miR-1236
	Sp1 transcription factor	Huntington's disease	miR-1236

⊐HC7	zinc finger, CCHC domain containing 7	RNA degradation	miR-1236
VE20	zinc finger, FYVE domain containing 20	Endocytosis	miR-1236
SS2	3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate synthase 2	Purine metabolism, Sulfur metabolism, Metabolic pathways, Selenocompound metabolism	miR-1236
32	GRB2-associated binding protein 2	Osteoclast differentiation, Fc epsilon RI signaling pathway, Fc gamma R-mediated phagocytosis, Chronic myeloid leukemia	miR-1236
	interleukin 10	Toxoplasmosis, Intestinal immune network for IgA production, Autoimmune thyroid disease, Leishmaniasis, Chagas disease, African trypanosomiasis, Malaria, Amoebiasis, T cell receptor signaling pathway, Staphylococcus aureus infection, Asthma, Systemic lupus erythematosus, Allograft rejection	miR-1236
R1	cannabinoid receptor 1 (brain)	Neuroactive ligand-receptor interaction	miR-1236
NAT3	nicotinamide nucleotide adenylyltransferase 3	Nicotinate and nicotinamide metabolism, Metabolic pathways	miR-1236
AR	adenosine deaminase, RNA-specific	Cytosolic DNA-sensing pathway	miR-1236
KB	phosphorylase kinase, beta	Calcium signaling pathway, Insulin signaling pathway	miR-1236
⊐D6IP	programmed cell death 6 interacting protein	Endocytosis	miR-1236
K1	opioid receptor, kappa 1	Neuroactive ligand-receptor interaction	
G	epiregulin	ErbB signaling pathway	miR-1236
P1	BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 1	SNARE interactions in vesicular transport	miR-1236
DK3	TAO kinase 3	MAPK signaling pathway	miR-1236
C	clathrin, heavy chain (Hc)	Lysosome, Endocytosis, Huntington's disease, Bacterial invasion of epithelial cells	
G2	stromal antigen 2	Cell cycle	miR-1236
NA2	plexin A2	Axon guidance	miR-1236
Y2	cryptochrome 2 (photolyase-like)	Circadian rhythm	miR-1236
1CB	protein phosphatase 1, catalytic subunit, beta isoform	Vascular smooth muscle contraction, Oocyte meiosis, Focal adhesion, Long-term potentiation, Regulation of actin cytoskeleton, Insulin signaling pathway	miR-1236
NK1	ethanolamine kinase 1	Glycerophospholipid metabolism, Metabolic pathways	miR-1236
RK3	neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 3	Neurotrophin signaling pathway	miR-1236
GN2	neuroligin 2	Cell adhesion molecules (CAMs)	miR-1236
2CA	protein phosphatase 2 (formerly 2A), catalytic subunit, alpha isoform	Oocyte meiosis, Tight junction, mRNA surveillance pathway, Wnt signaling pathway, TGF-beta signaling pathway, Long-term depression, Chagas disease (American trypanosomiasis), Hepatitis C	miR-1236
B1	SH2B adaptor protein 1	Neurotrophin signaling pathway	miR-1236
PA	signal-regulatory protein alpha	Osteoclast differentiation	miR-1236
41	erythrocyte membrane protein band 4.1 (elliptocytosis 1, RH-linked)	Tight junction	miR-1236
K6	cyclin-dependent kinase 6	Non-small cell lung cancer, Glioma, Cell cycle, p53 signaling pathway, Pathways in cancer, Pancreatic cancer, Melanoma, Chronic myeloid leukemia, Small cell lung cancer	miR-1236
GAL2	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 2	Metabolic pathways, Glycosphingolipid biosynthesis, Mucin type O-Glycan biosynthesis, Glycosphingolipid biosynthesis, Glycosaminoglycan biosynthesis	miR-1236
AM1	neural cell adhesion molecule 1	Cell adhesion, Prion diseases	miR-1236
9A6	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 6	Cardiac muscle contraction	miR-1236
4	fms-related tyrosine kinase 4	Cytokine-cytokine receptor interaction, Focal adhesion	miR-1236
GN4X	neuroligin 4, X-linked	Cell adhesion molecules (CAMs)	miR-1236

5. Tartışma

Çalışmamızda EPO'nun bir nöroblastoma hücre hattı olan SH-SY5Y'de meydana getirdiği miRNA ekspresyon değişiklikleri hem mikroarray hem de KPCR yöntemleriyle araştırılmıştır. EPO'nun nöroprotektif etki mekanizması henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Bu çalışma, EPO'nun nöroprotektif etki mekanizmasında mikro RNA'ların etkisini inceleyen ilk çalışmadır.

miRNA'ların metabolik işlevlerde ve başta kanser olmak üzere pek çok hastalıkta oynadıkları önemli roller anlaşıldığında araştırmalar hızla artmıştır. Çalışmamız, EPO'nun nöroprotektif etkisine de miRNA'ların aracılık ettiğini düşündürmektedir. Analizler sonucunda ekspresyon değişimi anlamlı bulunan miRNA'lardan mir-885-5p'nin yakın zamanda nöroblastoma hücreleriyle yapılan bir çalışmada p53'ü aktive ederek hücre proliferasyonunu ve hayatta kalmasını baskıladığı ortaya koyulmuştur (Afanasyeva EA, 2011). p53'ün EPO'nun etki mekanizmasında da rol oynadığı düşünülmektedir. Ekspresyonu anlamlı olarak değişen diğer bir miRNA da mir-451'dir. Bu miRNA'nın sitokin sinyal yolakları üzerinden eritroid farklılaşmasını (Patrick DM, 2010; Bruchova-Votavova H, 2010) ve homeostazisini (Rasmussen KD, 2010) etkilediği eritroidleri oksidatif strese karşı koruduğu (Yu D, 2010) gösterilmiştir. Bunun yanısıra glioblastomalarda çeşitli sinyal yolaklarını etkileyerek metabolik strese karşı hücre yanıtlarını düzenlediği ve onları koruduğu (Godlewski J, 2010) ayrıca tümor baskılayıcı rol oynadığı gösterilmiştir (Nan Y, 2010). Nan Y et al çalışmalarında mir-451'in bu etkisini EPO'nun etki mekanizmasında da görevli olan PI3K/AKT yolağı üzerinden gösteriyor olabileceğini öne sürmüştür. Bu çalışmalarda mir-451'in eritroid hücreleri ve glioblastomalar üzerindeki etkileri EPO'nun nöron ve nöroblastoma hücrelerindeki etkisine benzemektedir.

Çalışmamızda anlamlı değişim gösteren miRNA'ların hedefleri arasında daha önce EPO'nun nöronlarda meydana getirdiği değişiklikleri inceleyen bir transkriptom (Maurer MH, 2002) çalışmasında değişimi saptanan genlerden N-asetilglukozamin-6-O-sulfotransferaz (CHST6) ve mitokondriyal ribozomal protein S18B (MRPS18B) bulunmaktadır. Bu iki gen de miR-1236 ve miR-640'ın hedefleri arasındadır. CHST6 eritropoietinin etkisini uzatırken MRPS18B de oksidatif strese karşı enerji metabolizmasının düzenlenmesinde görevli olabilir. Bu çalışmanın dışında EPO'nun nöronlarda meydana getirdiği değişiklikleri inceleyen proteom (Meloni BP, 2006) ve genomiks (Renji MZ, 2002) çalışmalarında değişimi saptanan diğer pek çok genin belirlediğimiz miRNA'ların hedefleri arasında değildir. Bunun nedeni bu

genlerin EPO'nun etkilediği miRNA'lar tarafından düzenlenmemesi ya da hedef tahmini yapan yazılımların (Targetscan) algoritmalarının sınırlılıkları olabilir.

Çalışmamızda farklılaşmamış SH-SY5Y nöroblastoma hücre hattını kullanılmıştır. Sonuçların geçerliliğini arttırmak için primer nöron kültürü kullanılabilir. Çalışmamızda EPO indüksiyonundan 24 saat sonra miRNA toplanarak miRNA ekspresyon analizi gerçekleştirilmiştir. miRNA'ların farklı yarılanma süreleri nedeniyle bu süre içinde kimi miRNA'ların ekspresyonu değişmiş ve eski haline dönmüş olabilir ya da bu sürenin ardından ekspresyonu değişen miRNA'lar olabilir. Bu nedenle miRNA'lar farklı zaman aralıklarında toplanarak miRNA ekspresyon analizi yapılabilir. Tüm bu sınırlılıklarına rağmen çalışmamız EPO'nun nöroprotektif etkisine miRNA'ların aracılık ediyor olabileceğini göstermektedir.

6. Sonuç ve Öneriler

Çalışmamız kapsamında gerçekleştirilen ve 904 miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin incelendiği mikroarray analizi sonucunda 3 miRNA'nın, 1120 miRNA'nın ekspresyon seviyelerinin incelendiği KPCR analizi sonucunda 2 miRNA'nın ekspresyonunun anlamlı olarak değiştiği saptanmıştır. Bu sonuçlara göre EPO SH-SY5Y hücre hattında miRNA ekspresyonunu değiştirmektedir.

Şimdi aydınlatılması gereken nokta bu değişimin EPO'nun nöroprotektif etkisinde gerçekten rol oynayıp oynamadığıdır. Bunun için ekspresyon değişimi anlamlı bulunan miRNA'lar için fonksiyonel analizler yapılmalıdır. Bu miRNA'lar susturulduğunda ya da aşırı eksprese edildiklerinde EPO'nun etkisindeki değişim incelenebilir.

7. Kaynaklar

1. Aboobaker AA, Tomancak P, Patel N, Rubin GM, Lai EC. Drosophila mikroRNAs exhibit diverse spatial expression patterns during embryonic development. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2005;102:18017–18022.

2. Abrous DN, Koehl M, Le Moal M, Adult neurogenesis: from precursors to network and physiology. Physiol Rev 2005;85(2):523-69.

3. Afanasyeva EA, Mestdagh P, Kumps C, Vandesompele J, Ehemann V, Theissen J, Fischer M, Zapatka M, Brors B, Savelyeva L, Sagulenko V, Speleman F, Schwab M, Westermann F. MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. Cell Death Differ. 2011

4. 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.

5. Assandri R, Egger M, Gassmann M, Niggli E, et al. Erythropoietin modulates intracellular calcium in a human neuroblastoma cell line. J Physiol 1999;516:343-52.

6. Bagga S, Bracht J, Hunter S, Massirer K, et al. Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. Cell. 2005;122(4):553-63.

7. Bartel DP. MikroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. Cell. 2004;116(2):281-97.

8. Bartels C, Späte K, Krampe H, Ehrenreich H. Recombinant Human Erythropoietin: Novel Strategies for Neuroprotective/Neuro-regenerative Treatment of Multiple Sclerosis. Ther Adv Neurol Disord. 2008 Nov;1(3):193-206.

9. Bernaudin M, Marti HH, Roussel S, Divoux D, Nouvelot A, et al. A potential role for erythropoietin in focal permanent cerebral ischemia in mice. J Cereb Blood Flow Metab 1999;19:643-51.

10. Boesch S, Sturm B, Hering S, Scheiber-Mojdehkar B, Steinkellner H, Goldenberg H, Poewe W. Neurological effects of recombinant human erythropoietin in Friedreich's ataxia: a clinical pilot trial. Mov Disord. 2008 Oct 15;23(13):1940-4.

11. Boesch S, Sturm B, Hering S, Goldenberg H, Poewe W, Scheiber-Mojdehkar B. Friedreich's ataxia: clinical pilot trial with recombinant human erythropoietin. Ann Neurol. 2007 Nov;62(5):521-4.

12. Brines ML, Ghezzi P, Keenan S, Agnello D, et al. Erythropoietin crosses the blood-brain barrier to protect against experimental brain injury. Proc Natl Acad Sci USA 2000;97:10526-31.

13. Brines M, Cerami A. Erythropoietin-mediated tissue protection: reducing collateral damage from the primary injury response. J Intern Med. 2008 Nov;264(5):405-32.

14. Brines M, Grasso G, Fiordaliso F et al. Erythropoietin mediates tissue protection through an erythropoietin and common beta-subunit heteroreceptor. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 2004; 101: 14907–14912.

15. Bruchova-Votavova H, Yoon D, Prchal JT. miR-451 enhances erythroid differentiation in K562 cells. Leuk Lymphoma. 2010 Apr;51(4):686-93.

16. Campana WM, Misasi R, O'Brien JS. Identification of a neurotrophic sequence in erythropoietin. Int J Mol Med 1998;1:235-41.

17. Caudy AA, Myers M, Hannon GJ, Hammond SM. Fragile X-related protein and VIG associate with the RNA interference machinery. Genes Dev. 2002 Oct 1;16(19):2491-6.

18. Caudy AA, Ketting RF, Hammond SM, Denli AM et al. A mikrococcal nuclease homologue in RNAi effector complexes. Nature. 2003 Sep 25;425(6956):411-4.

19. Çelik M, Gökmen N, Erbayraktar S, Akhisaroğlu M, Konakçı S, Ulukuş C, Genç Ş, Genç K, Sağıroğlu 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.

20. Chalfie M, Horvitz HR, Sulston JE. Mutations that lead to reiterations in the cell lineages of C. elegans. Cell. 1981;24(1):59-69.

21. 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.

22. 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.

23. 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.

24. 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.

25. 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.

26. Ding L, Spencer A, Morita K, Han M. The developmental timing regulator AIN-1 interacts with miRISCs and may target the argonaute protein ALG-1 to cytoplasmic P bodies in C. elegans. Mol Cell. 2005;19(4):437-47.

27. Dzietko M, Felderhoff-Mueser U, Sifringer M, Krutz B, et al. Erythropoietin protects the developing brain against N-methyl-D-aspartate receptor antagonist neurotoxicity. Neurobiol Dis 2004;15:177-87.

28. Ehrenreich H, Hasselblatt M, Dembowski C, Cepek L, et al. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. Mol Med 2002;8:495-505.

29. 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.

30. Ehrenreich H, Degner D, Meller J, Brines M, et al. Erythropoietin: a candidate compound for neuroprotection in schizophrenia. Mol Psychiatry 2004;9:42-54.

31. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S et al. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. Molecular Psychiatry 2007; 12: 206–220.

32. Ehrenreich H, Hinze-Selch D, Stawicki S, Aust C, Knolle-Veentjer S, Wilms S, Heinz G, Erdag S, Jahn H, Degner D, Ritzen M, Mohr A, Wagner M, Schneider U, Bohn M, Huber M, Czernik A, Pollmächer T, Maier W, Sirén AL, Klosterkötter J, Falkai P, Rüther E, Aldenhoff JB, Krampe H. Improvement of cognitive functions in chronic schizophrenic patients by recombinant human erythropoietin. Mol Psychiatry. 2007 Feb;12(2):206-20.

33. Eystathioy T, Chan EK, Takeuchi K, Mahler M et al. Clinical and serological associations of autoantibodies to GW bodies and a novel cytoplasmic autoantigen GW182. J Mol Med. 2003;81(12):811-8.
34. Fauchere JC, Dame C, Vonthein R et al. An approach to using recombinant erythropoietin for neuroprotection in very preterm infants. Pediatrics 2008; 122: 375–382.
35. Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, et al. A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005;102(6):2046-51.
36. Frith MC, Pheasant M, Mattick JS. The amazing complexity of the human transcriptome. Eur J Hum Genet. 2005 Aug;13(8):894-7.
37. Garzon R, Pichiorri F, Palumbo T, Iuliano R,et al. MikroRNA fingerprints during human megakaryocytopoiesis. Proc Natl Acad Sci USA. 2006;103(13):5078-83.
38. Genç S, Akhisaroğlu M, Kuralay F, Genç 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.
39. Genç Ş, Köroğlu TF, Genç K. Erythropoietin and the nervous system. Brain Res, 2004;1000:19–31.
40. Genc K, Genc S, Baskin H, Semin I. Erythropoietin decreases cytotoxicity and nitric oxide formation induced by inflammatory stimuli in rat oligodendrocytes. Physiol Res. 2006;55(1):33-8.
41. Genç Ş, Yüksel-Eğrilmez M, Genç K. Endothelial nitric oxide-mediated Nrf2 activation as a novel mechanism for vascular and neuroprotection by erythropoietin in experimental subarachnoid hemorrhage. Med Hypotheses, in press. 2006;67(2):424.
42. Godlewski J, Bronisz A, Nowicki MO, Chiocca EA, Lawler S. microRNA-451: A conditional switch controlling glioma cell proliferation and migration. Cell Cycle. 2010 Jul 15;9(14):2742-8.
43. 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.

44. Grmec S, Strnad M, Kupnik D et al. Erythropoietin facilitates the return of spontaneous circulation and survival in victims of out-of-hospital cardiac arrest. Resuscitation 2009; 80: 631–637.
45. He L, Hannon GJ. MikroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. Nat Rev Genet. 2004 Jul;5(7):522-31. Review. Erratum in: Nat Rev Genet. 2004;5(8):631.
46. Hsieh J, Gage FH. Epigenetic control of neural stem cell fate. Curr Opin Genet Dev. 2004 Oct;14(5):461-9.
47. Hutvagner G. & Zamore PD. RNAi: nature abhors a double-strand. Curr. Opin. Genet. Dev. 2002;12, 225–232.
48. Jelkmann W, Bohlius J, Hallek M, Sytkowski AJ. The erythropoietin receptor in normal and cancer tissues. Crit Rev Oncol Hematol. 2008 Jul;67(1):39-61.
49. Jelkmann W, Wagner K. Beneficial and ominous aspects of the pleiotropic action of erythropoietin. Ann Hematol, 2004;83:673-86.
50. 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.
51. Juul S. Recombinant erythropoietin as a neuroprotective treatment: in vitro and in vivo models. Clin Perinatol 2004;31:129-42.
52. Juul SE, McPherson RJ, Bauer LA, Ledbetter KJ, Gleason CA, Mayock DE. A phase I/II trial of high-dose erythropoietin in extremely low birth weight infants: pharmacokinetics and safety. Pediatrics. 2008 Aug;122(2):383-91.
53. Kadota T, Shingo T, Yasuhara T, Tajiri N, Kondo A, Morimoto T, Yuan WJ, Wang F, Baba T, Tokunaga K, Miyoshi Y, Date I. Continuous intraventricular infusion of erythropoietin exerts neuroprotective/rescue effects upon Parkinson's disease model of rats with enhanced neurogenesis. Brain Res. 2009 Feb 13;1254:120-7.
54. 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.
55. Kaptanoğlu E, Solaroğlu I, Okutan O, Sürücü HS, Akbıyık F, Beşkonaklı 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.

56. Kim J, Krichevsky A, Grad Y, Hayes GD, Kosik KS, Church GM, Ruvkun G. Identification of many microRNAs that copurify with polyribosomes in mammalian neurons. Proc Natl Acad Sci U S A. 2004 Jan 6;101(1):360-5.
57. Klein ME, Impey S, Goodman RH. Role reversal: the regulation of neuronal gene expression by microRNAs. Curr Opin Neurobiol. 2005 Oct;15(5):507-13.
58. Kosaka N, Sugiura K, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Miyazaki H, Komatsu N, Ochiya T, Kato T. Identification of erythropoietin-induced mikroRNAs in haematopoietic cells during erythroid differentiation. Br J Haematol. 2008 Jun;142(2):293-300.
59. 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.
60. Kumral A, Özer E, Yılmaz O, Akhisaroğlu M, Gökmen N, Duman N, Ulukuş C, Genç S, Özkan H. Neuroprotective effect of erythropoietin on hypoxic–ischemic brain injury in neonatal rats. Biol Neonate 2003;83:224–228.45.
61. Kumral A, Tugyan K, Gonenç S, Genç K, Genc Ş, Sönmez U, Yılmaz O, Duman N, Uysal N, Özkan H. Protective effects of erythropoietin against ethanol-induced apoptotic neurodegenaration and oxidative stress in the developing C57BL/6 mouse brain. Brain Res Dev Brain Res 2005;160:146-56.
62. Mehler MF, Mattick JS. Non-coding RNAs in the nervous system. J Physiol. 2006 Sep 1;575(Pt 2):333-41. Epub 2006 Jun 29.
63. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. Cell 75 (5): 843–54 (1993).
64. 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.
65. 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.
66. Leist M, Ghezzi P, Grasso G et al. Derivatives of erythropoietin that are tissue protective but not erythropoietic. Science 2004; 305: 239–242.

67. 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.

68. Lewis BP, Burge CB, Bartel DP. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are mikroRNA targets. Cell. 2005;120: 15–20.

69. Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, et al. Mikroarray analysis shows that some mikroRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. Nature. 2005;433, 769–773.

70. Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. Science 2004;305:1437–1441.

71. Liu J, Rivas FV, Wohlschlegel J, Yates JR 3rd, et al. A role for the P-body component GW182 in mikroRNA function. Nature Cell Biol. 2005;7: 1261–1266.

72. Liu Q, Rand TA, Kalidas S, Du F et al. R2D2, a bridge between the initiation and effector steps of the Drosophila RNAi pathway. Science 2003;301: 1921–1925.

73. 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.

74. 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;

75. 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.

76. Mattick JS, Gagen MJ. The evolution of controlled multitasked gene networks: the role of introns and other noncoding RNAs in the development of complex organisms. Mol Biol Evol. 2001 Sep;18(9):1611-30.

77. Mattick JS. Challenging the dogma: the hidden layer of non-protein-coding RNAs in complex organisms. Bioessays. 2003 Oct;25(10):930-9.

78. Maiese K, Li F, Chong ZZ. Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? Trends Pharmacol Sci 2004;25:577-83.

79. Maiese K, Li F, Chong ZZ. New avenues of exploration for erythropoietin. JAMA 2005;293:90–95.

80. Mansfield JH, Harfe BD, Nissen R, Obenauer J, et al. MikroRNA-responsive 'sensor' transgenes uncover Hox-like and other developmentally regulated patterns of vertebrate mikroRNA expression. Nat Genet. 2004;36(10):1079-83.

81. 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.

82. 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;76:105–16.

83. Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A et al. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous mikroRNAs. Genes Dev. 2002;16(6):720-8.

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

85. Nan Y, Han L, Zhang A, Wang G, Jia Z, Yang Y, Yue X, Pu P, Zhong Y, Kang C. MiRNA-451 plays a role as tumor suppressor in human glioma cells. Brain Res. 2010 Nov 4;1359:14-21.

86. Neubauer AP, Voss W, Wachtendorf M & Jungmann T. Erythropoietin improves neurodevelopmental outcome of extremely preterm infants. Annals of Neurology 2010;67: 657–666.

87. Okamura K, Ishizuka A, Siomi H, Siomi MC. Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. Genes Dev. 2004;18(14):1655-66.

88. Özturk E, Demirbilek S, Kadir But A, Sarıçiçek V, Güleç M, Akyol O, Özcan Ersoy M. Antioxidant properties of propofol and erythropoietin after closed head injury in rats. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry 2005;29:922-7.

89. Patrick DM, Zhang CC, Tao Y, Yao H, Qi X, Schwartz RJ, Jun-Shen Huang L, Olson EN. Defective erythroid differentiation in miR-451 mutant mice mediated by 14-3-3zeta. Genes Dev. 2010 Aug 1;24(15):1614-9.

90. Pauley KM, Eystathioy T, Jakymiw A, Hamel JC, Fritzler MJ, Chan EK. Formation of GW bodies is a consequence of mikroRNA genesis. EMBO Rep. 2006;7(9):904-10.

91. Pearson JC, Lemons D, McGinnis W. Modulating Hox gene functions during animal body patterning. Nat Rev Genet. 2005 Dec;6(12):893-904.
92. Prasanth KV, Prasanth SG, Xuan Z, Hearn S, Freier SM, Bennett CF, Zhang MQ, Spector DL. Regulating gene expression through RNA nuclear retention. Cell. 2005 Oct 21;123(2):249-63.
93. Ranade AR, Weiss GJ. Methods for microRNA microarray profiling. Methods Mol Biol. 2011;700:145-52.
94. Renzi MJ, Farrell FX, Bittner A, Galindo JE, Morton M, Trinh H, Jolliffe LK.Erythropoietin induces changes in gene expression in PC-12 cells. Brain Res Mol Brain Res. 2002 Jul 15;104(1):86-95.
95. Rodríguez Cruz Y, Mengana Támos Y, Muñoz Cernuda A, Subirós Martines N, González-Quevedo A, Sosa Testé I, García Rodríguez JC. Treatment with nasal neuro-EPO improves the neurological, cognitive, and histological state in a gerbil model of focal ischemia. ScientificWorldJournal. 2010 Nov 16;10:2288-300.
96. Ronshaugen M, Biemar F, Piel J, Levine M, Lai EC. The Drosophila mikroRNA iab-4 causes a dominant homeotic transformation of halteres to wings. Genes Dev. 2005;19(24):2947-52.
97. Ruvkun G. Molecular bio. Glimpses of a tiny RNA world. Science. 2001;294(5543):797-9.
98. Sadamoto Y, Igase K, Sakanaka M, Sato K, Otsuka H, Sakaki S, Masuda S, Sasaki R. Erythropoietin prevents place navigation disability and cortical infarction in rats with permanent occlusion of the middle cerebral artery. Biochem Biophys Res Commun. 1998 Dec 9;253(1):26-32.
99. 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.
100. 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.
101. 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.

102. Sempere LF, Freemantle S, Pitha-Rowe I, Moss E, et al. Expression profiling of mammalian mikroRNAs uncovers a subset of brain-expressed mikroRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. Genome Biol. 2004;5(3):R13.

103. Sen GL, Blau HM. Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. Nat Cell Biol. 2005 Jun;7(6):633-6.

104. 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.

105. Sinor AD, Greenberg DA. Erythropoietin protects cultured cortical neurons, but not astroglia, from hypoxia and AMPA toxicity. Neurosci Lett 2000;290:213-5.

106. 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 USA 2001;98:4044-9.

107. Springborg JB, Møller C, Gideon P, Jørgensen OS, Juhler M, Olsen NV. Erythropoietin in patients with aneurysmal subarachnoid haemorrhage: a double blind randomised clinical trial. Acta Neurochir (Wien). 2007 Nov;149(11):1089-101; discussion 1101. Epub 2007 Sep 17.

108. Song JJ, Smith SK, Hannon GJ, Joshua-Tor L. Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. Science. 2004;305(5689):1434-7.

109. Solaroğlu I, Solaroğlu A, Kaptanoğlu E, Dede S, Haberal A, Beskonakli E, Kılınç K. Erythropoietin prevents ischemia–reperfusion from inducing oxidative damage in fetal rat brain. Child's Nerv Syst 2003;19:19–22.

110. Sun Y, Calvert JW, Zhang JH. Neonatal hypoxia/ischemia is associated with decreased inflammatory mediators after erythropoietin administration. Stroke 2005;36:1672-8.

111. Tomari Y, Du T, Haley B, Schwarz DS et al. RISC assembly defects in the Drosophila RNAi mutant armitage. Cell. 2004 Mar 19;116(6):831-41.

112. Tseng MY, Hutchinson PJ, Richards HK et al. Acute systemic erythropoietin therapy to reduce delayed ischemic deficits following aneurysmal subarachnoid

hemorrhage: a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Clinical article. Journal of Neurosurgery 2009; 111: 171–180.

113. Tseng MY, Hutchinson PJ, Kirkpatrick PJ. Interaction of neurovascular protection of erythropoietin with age, sepsis, and statin therapy following aneurysmal subarachnoid hemorrhage. J Neurosurg. 2010 Jun;112(6):1235-9.

114. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P. Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. J Exp Med. 2003 Sep 15;198(6):971-5.

115. van der Kooij MA, Groenendaal F, Kavelaars A, Heijnen CJ, van Bel F. Neuroprotective properties and mechanisms of erythropoietin in in vitro and in vivo experimental models for hypoxia/ischemia. Brain Res Rev. 2008;59(1):22-33.

116. 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.

117. 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.

118. 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.

119. Weimar C, Kraywinkel K, Maschke M & Diener HC. Intravenous thrombolysis in German stroke units before and after regulatory approval of recombinant tissue plasminogen activator. Cerebrovascular Diseases 2006; 22: 429–431.

120. Willingham AT, Orth AP, Batalov S, Peters EC, Wen BG, Aza-Blanc P, Hogenesch JB, Schultz PG. A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. Science. 2005 Sep 2;309(5740):1570-3.

121. Wuestenberg T, Begemann M, Bartels C et al. Recombinant human erythropoietin delays loss of gray matter in chronic schizophrenia. Molecular Psychiatry 2010.

122. Xue YQ, Zhao LR, Guo WP, Duan WM. Intrastriatal administration of erythropoietin protects dopaminergic neurons and improves neurobehavioral outcome in a rat model of Parkinson's disease. Neuroscience. 2007 May 25;146(3):1245-58.

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

124. 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.
125. 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.
126. Yu D, dos Santos CO, Zhao G, Jiang J, Amigo JD, Khandros E, Dore LC, Yao Y, D'Souza J, Zhang Z, Ghaffari S, Choi J, Friend S, Tong W, Orange JS, Paw BH, Weiss MJ. miR-451 protects against erythroid oxidant stress by repressing 14-3-3zeta. Genes Dev. 2010 Aug 1;24(15):1620-33.
127. 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.
128. Zhang B, Pan, X. & Anderson, T. A. MikroRNA: a new player in stem cells. J. Cell Physiol. 209, 266–269 (2006).
129. 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
130. 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.
131. Zhu C, Kang W, Xu F et al. Erythropoietin improved neurologic outcomes in newborns with hypoxic-ischemic encephalopathy. Pediatrics 2009;124: 218–226.
132. Elmahdy H, El-Mashad AR, El-Bahrawy H et al. Human recombinant erythropoietin in asphyxia neonatorum: pilot trial. Pediatrics 2010;125: 1135–1142.