



## **microRNA Ekspresyon Analizi**

- microRNA ekspresyon çalışması için gelen 'A' sayıda hasta, 'B' sayıda sağlıklı bireylerde mi'C' microRNA'sı için Y sayıdaki numunenin real time PCR analizleri yapılmıştır. Deney uygulamalarında uygun snRNA normalizatör olarak kullanılmıştır.
- Analiz grupları içerisinde tüm grupların gen ekspresyon analizlerini çıkartmak için  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak, 2001) metodu kullanılmıştır. Hasta grubu baz alınarak kontrol grubunun kat değişimi (Fold change, FC) hesaplanmıştır.
- Analiz grupları için istatistik analizler;
  - A grubu
  - B grubu
  - ...

Normal dağılımları onaylanan grupların kıyaslaması için Student t-test uygulanarak grup kıyaslamaları çıkarılmıştır.

- A-B grup kıyaslaması -
- ...

Son olarak çoklu grup kıyaslamalarının birlikte değerlendirilmesi için ANOVA testi uygulanmıştır.

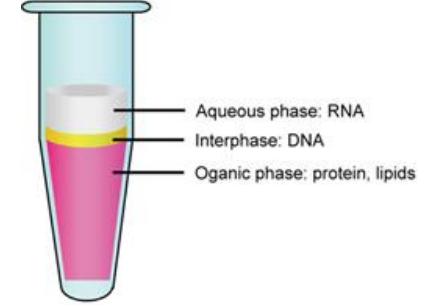


# Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar



## 1- Total RNA Ekstraksiyon

Yüksek kalitede Total RNA ekstraksiyonu sağlamak için TRIzol Reagent kullanılmıştır. Trizol Reagent kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemleri faz ayrımı ve bir dizi nükleik asit çöktürme yöntemine dayanmaktadır.



## 2- Nükleik Asitlerin spofotometrik Ölçümleri(nano gram değerleri) ve konsantrasyonlarının belirlenmesi

Total RNA ekstraksiyon işleminden elde edilen numunelere ait nükleik asit yükleri (ng değerleri) çalışmanın sonraki basamaklarda kullanılmak üzere belirli bir ng değerine sabitlenir. Bu işlem qPCR aşamasında tutarsız sonuçların önüne geçilebilmesi için önem arz etmektedir.

## 3- miRNA Poly(A) tail oluşturma işlemi

miRNA dizileri yaklaşık 21 baz büyüklünde mature yapıda kısa RNA

5'  3' miRNA

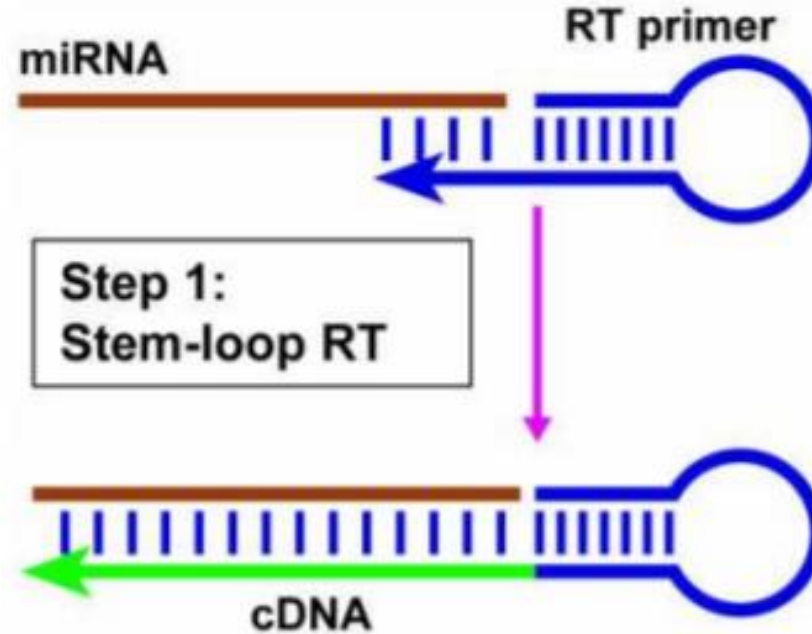
zincirleridir. Bu dizilere Poly(A) Polimeraz enzimi vasıtasıyla Poly(A) zinciri eklenerek daha uzun ve kararlı bir yapı oluşturulur.

5'  AAAAAAAAAA 3' Poly(A)-tailed miRNA



## 4- miRNA stem-loop Reverse Transkriptaz (cDNA) İşlemi

miRNA gene ekspresyonu çalışmalarında yapının kısa bir zincirden oluşmasından dolayı miRNA spesifik primerler ile Revers Transkriptaz işlemi yapılmaktadır. Özel olarak tasarlanan bu primerler miRNA zincirini uzatarak bir hairpin yapısı oluşturmaktadır. Hairpin yapısının 5' ucunun açık kısmı miRNA zincirinin 3' kısmına bağlanır. Daha sonra miRNA Reverse Transkriptaz enzimi vasıtasıyla hairpin yapısı üzerinden miRNA dizisinin karşı kopyasını sentezler.

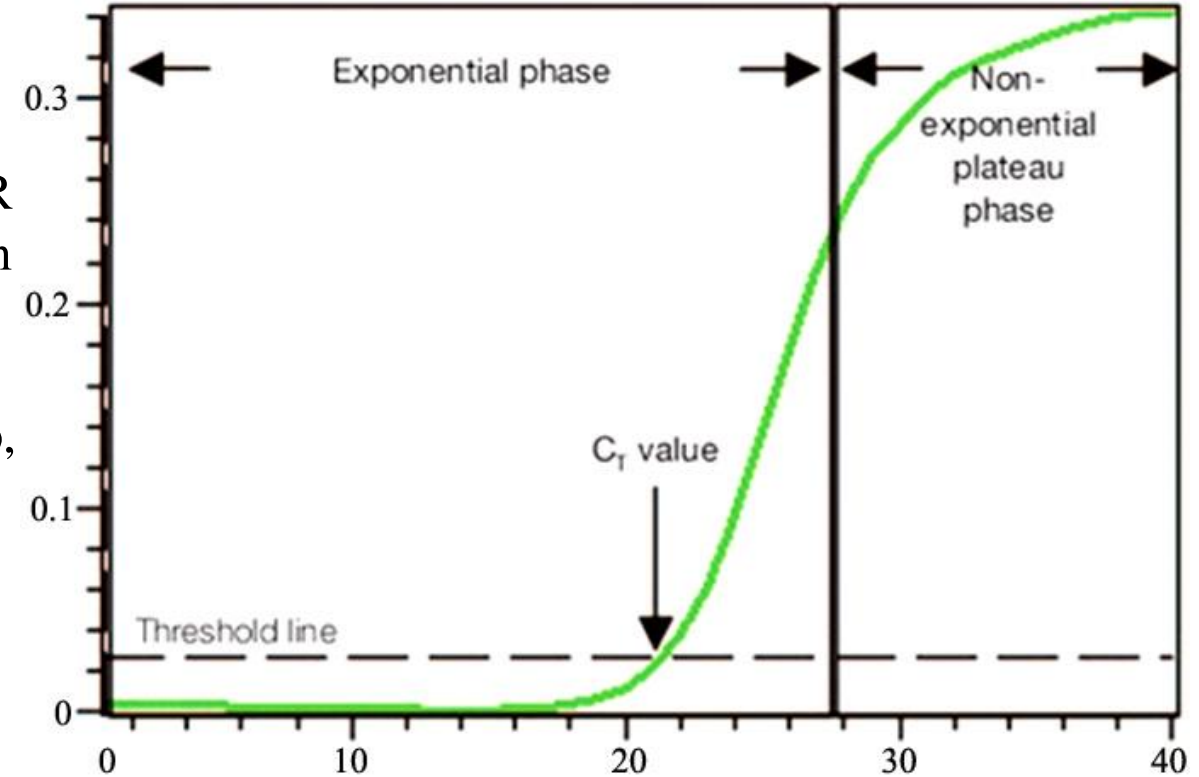


# Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar

## 5- qPCR miRNA Gen Ekspresyon Analizleri

Son aşamada miRNA dizileriyle oluşturulan cDNA zincirleri, relative ekspresyon analizlerinde kullanılır. Hasta ve kontrol gruplarında bulunan numunelerin herbiri için, ilgili miRNA ve ona uygun referans genine ait dizilerin real time PCR cihazı ile çoğaltılması sağlanır. İşlem sonucunda cihazdan alınan veriler  $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$  metodu ile değerlendirilir. 40 döngü üzerinden yapılan çalışmalarda florasan değerinin eşik değerini geçtiği (Threshold çizgisini kestiği) noktadan alınan eşik değeri ( $C_t$ ,  $C_p$ ,  $C_q$ ) hesaplamalarda kullanılır.

Gen Ekspresyon metodu ( $2^{-(\Delta\Delta Ct)}$ Livak metod)		
Grup	Hedef Gen	Referans Gen
Hasta örnek	A	A*
Control örnek	B	B*
$2^{-[(\Delta Ct(A) - \Delta Ct(A*)) - (\Delta Ct(B) - \Delta Ct(B*))]}$		
"*" Gen ekspresyon çalışmasında standardizasyon için kullanılan referans gen sonucu		



# Nükleik Asit Ekstraksiyon İşlemi



1. Mikrosantrifuj tüplere 200 µl total kan, serum, plazma vs. eklenerek, liziz ve faz ayırımı işlemlerini gerçekleştirmek üzere süspansiyon içerisine 1 ml TRIzol reagent solüsyonu ilave edilir.
2. Süspansiyon oda sıcaklığında 5 dk bekletilir.
3. Karışıma 200 µl kloroform eklenerek, dikkatlice karıştırılır.
4. Oda sıcaklığında 2 dk bekletildikten sonra 12000 G hızda 10 dk +4 °C sıcaklıkta santrifuj işlemi uygulanır.
5. Farklı bir mikrosantrifuj tüpe aktarılan süpernatant içerisine 0,5 ml isopropanol eklenerek dikkatlice karıştırılır.
6. Karışım 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12,000 G hızda 10 dk +4°C sıcaklıkta santrifuj işlemi uygulanır.
7. Süpernatant kısmı atılarak oluşan nükleik asit pelleti 1 ml %70 etanol ile 7500 G hızda 5 dk +4°C sıcaklıkta tekrar santrifuj yapılarak yıkanır.
8. Üst faz mikrosantrifuj tüpünden uzaklaştırılarak, RNA pelleti kuruyana kadar (15-30 dk) oda sıcaklığında bekletilir.
9. 30 µl nükleaz-free elution bufer eklenerek pellet süspansiyon edilerek, numunelere ait total RNA'lar -20 °C'de muhafaza edilir.



# Nükleik Asit Miktar Tayini ve DNase işlemleri



- **Colibri Titertek Berthold cihazı kullanılarak** Serum örneklerinin RNA ölçümleri gerçekleştirilmiştir. Bu işlemin aşamaları;

1. Cihaz çalıştırıldıktan sonra nükleik asit sekmesi seçilerek, örnek tipi RNA-40, ışık yolu uzunluğu otomatik olacak şekilde parametreler ayarlanmalıdır.
2. Cihaz kapağı açıldıktan sonra elüsyon bufferdan 2 µl eklenerek körleme işlemi yapılır.
3. Numunelerden sırasıyla 2 µl alınıp ölçüm seçeneği kullanılarak RNA ölçme işlemi tamamlanmaktadır.

- **Serum numunelerine ait nükleik asit çözeltilerinin;**

1. RNA konsantrasyonları 1 µg/ 10 µl olacak şekilde ayarlanır.
2. DNase I enzim (Arcticzymes, Norveç) protokolüne göre; 0,5 µg/ 5 µl total RNA üzerine 1 µl DNase I buffer eklenerek 5 µl tamamlayacak şekilde nükleaz free su eklenir.
3. Süspansiyon 37 °C sıcaklıkta 30 dk inkübasyon işlemi gerçekleştirilir.
4. İnkübasyon işlemi sonucunda 1 µl EDTA ilave edilerek 65 °C sıcaklıkta 10 dk süre ile DNase I enzimi inaktive edilerek, cDNA işlemine hazır hale getirilmiştir.



# Poly(A) Polymerase İşlemi



1. Buz üzerinde aşağıdaki bileşenler hazırlanmalıdır.

Komponentler	Miktar	Final konsantrasyonu
microRNA	Değişken	0,2 ug
ATP (10mM)	1,25 µl	0,5 mM
Poly(A) Polymerase, Yeast (1 U/µl)	1 µl	1 U
5X Poly(A) Polymerase, Yeast Reaction Buffer	5 µl	1X
25 mM MnCl <sub>2</sub>	2,5 µl	2,5 mM
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	total 25 µl	-

2. Tüm bileşenler karıştırılmak üzere kısa bir spin yapılarak, 37 °C’de 20 dk inkübasyon yapılır.

3. Reaksiyon, 20 dk 65 ° C’de sonlandırılarak, Poly(A) kuyruğu eklenmiş microRNA ürünleri -80 de muhafaza edilmiştir.





# M-MuLV Reverse Transcriptase İşlemi

1. Birinci basamak için buz üzerinde steril tüp içerisinde aşağıdaki bileşenler hazırlanmalıdır.

Komponentler	Miktar	Final konsantrasyonu
Poly(A) kuyruklu microRNA	Değişken	0,2 ug
dNTP (10mM)	1,25 µl	1 mM
RT primer (10 mM)	1 µl	1 mM
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	10 µl 'ye tamamla	-

1. 65°C de 5 dk primer denatüre edilerek, kısa bir spin yapılır.
2. Kalan bileşenler aşağıdaki tabloda olduğu gibi eklenir.

Komponentler	Miktar	Final konsantrasyonu
M-MuLV buffer	2 µl	1X
M-MuLV RT (200 U/µl)	1 µl	1U
RNase Inhibitor (40 U/µl)	0,2 µl	
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	8 µl	-

1. 20 µl microRNA komponenti 42 °C'de 60 dk inkübasyona tabi tutulur.
2. Reaksiyon sonunda enzim, 65 °C'de 20 dk 'da inaktive edilerek, microRNA Reverse Transkriptaz ürünleri -20 °C'de uzun süre muhafaza edilmiştir.



# Hidroliz Prob Tabanlı MicroRNA Deteksiyonu



1. Soğuk blok üzerinde aşağıdaki tabloya göre bileşenler hazırlanmalıdır.

Komponentler	Derişim	Miktar 1X
microRNA MixA	S10 (1,5) buffer	10 µl
microRNA MixB (Primer/Probe)	F & R /P	3,5 µl
cDNA	10-50 ng	3 µl
Taq Polimeraz	1U	0,2 µl
Nükleaz içermeyen H <sub>2</sub> O	-	3,5 µl

1. Thermocycler prosedürü aşağıdaki tabloya göre ayarlanmalıdır.

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık/Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95°C-5 dk	1
PCR Aplikasyon	Denatürasyon	95°C-5 sn	40
	Bağlanma	55°C - 30 sn (Okuma)	
	Polimerizasyon	72 °C - 10 sn	
Final	Soğutma	40 °C 30 sn	1

2. PCR ürünlerine ait pikler incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.



# Numune Bilgileri Ve qPCR Ct Mean Sonuçları



Grup Adı	Numune adı	Nükleik asit kodu	Numunenin ait olduğu kurum	ng Değeri	Ct Mean miR155 OKMÖ	Ct Mean SNORD47 OKMÖ	dCT_H OKMÖ
A grubu	a	1		2,19	26,95	22,35	4,59732
	b	2		15,62	25,71	23,50	2,21139
	c	3		13,51	25,87	23,32	2,54547
	d	4		92,92	29,20	19,85	9,34907
	e	5		179,23	31,77	18,56	13,20830
	f	6		40,39	30,39	20,72	9,67081
	g	7		44,30	31,21	21,53	9,68165
	h	8		83,84	28,60	19,05	9,55939
	ı	9		117,67	26,23	19,06	7,16369
	i	10		17,83	27,76	20,83	6,93000
	j	11		100,83	23,85	19,75	4,09776
	k	12		4,43	25,00	22,96	2,03650
	l	13		51,99	25,07	20,97	4,10114
	m	14		89,75	24,55	20,25	4,30340
B grubu	a	15		3,47	28,49	21,21	7,28000
	b	16		19,41	26,92	19,87	7,05190
	c	17		85,82	23,90	21,03	2,87000
	d	18		4,60	25,65	19,09	6,55811
	e	19		60,74	25,18	19,65	5,52516
	f	20		1,46	27,07	19,77	7,30096
	g	21		2,48	29,56	18,55	11,00861
	h	22		7,60	23,92	19,32	4,60185
	ı	23		58,22	26,02	20,40	5,62027
	i	24		6,73	25,76	17,32	8,44359
	j	25		12,46	24,28	21,07	3,21058
	k	26		6,08	26,22	20,83	5,39117
	l	27		15,98	27,29	19,70	7,58655
	m	28		58,93	26,73	19,75	6,98501
Ortalama CT OKMÜ					26,75	20,37	



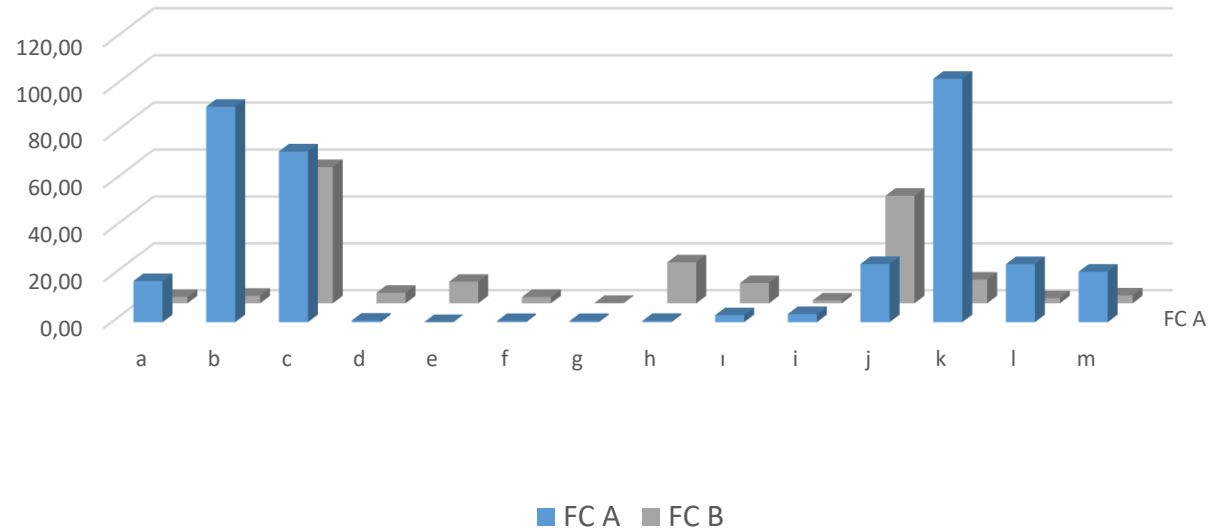
# qPCR Gen Ekspresyon Analizleri



Numune adı	ddCt A-E(ort)	FC A	Numune adı	ddCt B-E(ort)	FC B
a	-4,14	17,57	a	-1,45	2,74
b	-6,52	91,85	b	-1,68	3,21
c	-6,19	72,87	c	-5,86	58,19
d	0,62	0,65	d	-2,17	4,51
e	4,48	0,04	e	-3,21	9,24
f	0,94	0,52	f	-1,43	2,70
g	0,95	0,52	g	2,28	0,21
h	0,83	0,56	h	-4,13	17,52
i	-1,57	2,97	i	-3,11	8,65
i	-1,80	3,49	i	-0,29	1,22
j	-4,63	24,84	j	-5,52	45,95
k	-6,70	103,69	k	-3,34	10,14
l	-4,63	24,79	l	-1,15	2,21
m	-4,43	21,54	m	-1,75	3,36



## miRNA Gen Ekspresyon Analizi



# Grup İçi İstatistiksel Analizler



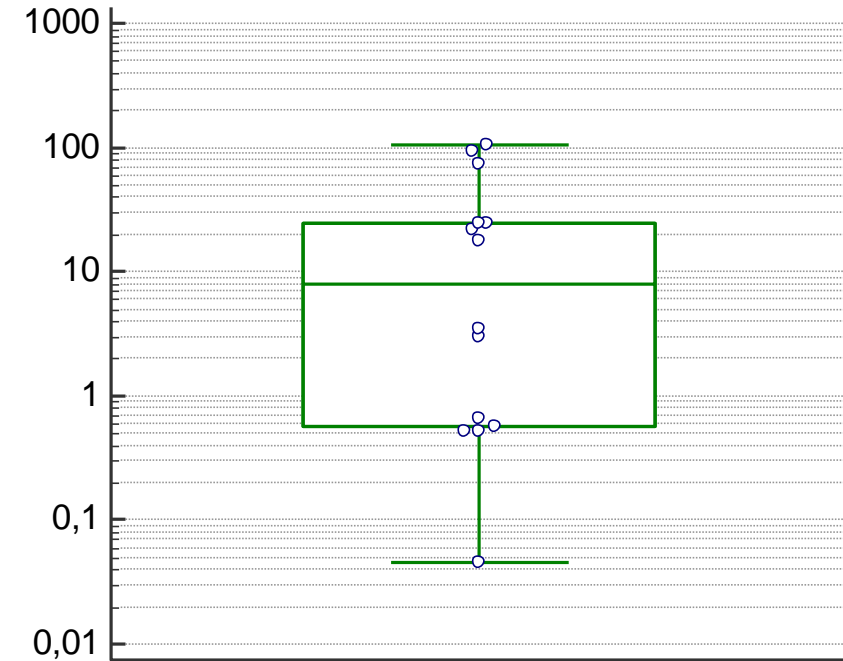
## Summary statistics

Variable	FC_A FC A
Back-transformed after logarithmic transformation.	
Sample size	14
Lowest value	0,04495
Highest value	103,6912
Geometric mean	5,0734
95% CI for the mean	1,2624 to 20,3883
Median	7,8298
95% CI for the median	0,5593 to 27,7941
Coefficient of Skewness	-0,4174 (P=0,4650)
Coefficient of Kurtosis	-0,8723 (P=0,4358)
Kolmogorov-Smirnov test <sup>a</sup> for Normal distribution	D=0,1970 accept Normality (P>0.10)

<sup>a</sup> Lilliefors significance correction

Percentiles		95% Confidence interval
2,5		
5	0,07329	
10	0,4057	
25	0,5638	0,06543 to 6,1023
75	24,8450	10,0464 to 101,7780
90	92,9732	
95	101,2074	
97,5		

Box-and-Whisker plot



# Grup İçi İstatistiksel Analizler

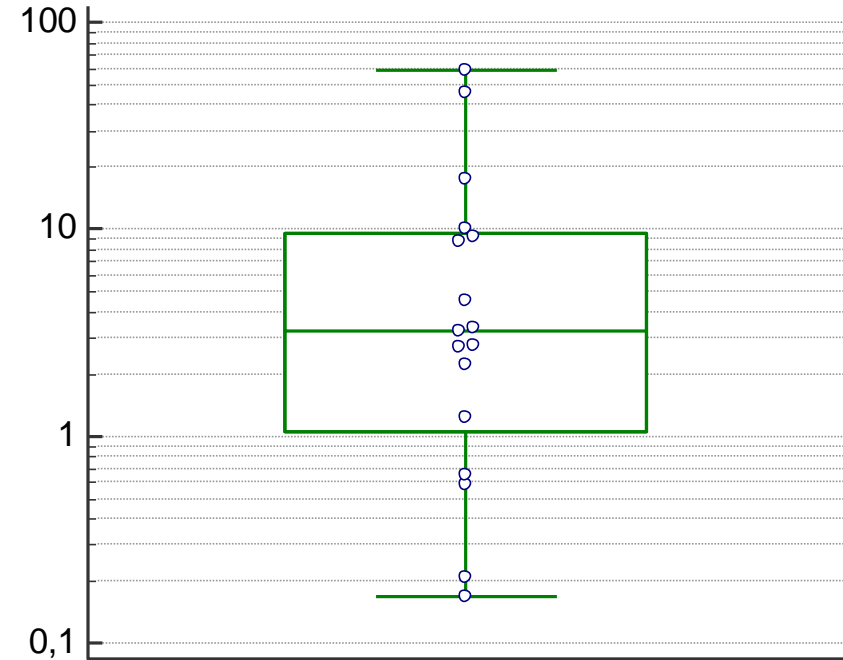


## Summary statistics

Variable	FC_B FC B
Back-transformed after logarithmic transformation.	
Sample size	17
Lowest value	0,1678
Highest value	58,1879
Geometric mean	3,2421
95% CI for the mean	1,3725 to 7,6586
Median	3,2059
95% CI for the median	1,2336 to 9,2276
Coefficient of Skewness	-0,08987 (P=0,8624)
Coefficient of Kurtosis	-0,3755 (P=0,8490)
Kolmogorov-Smirnov test <sup>a</sup> for Normal distribution	D=0,1156 accept Normality (P>0.10)

<sup>a</sup> Lilliefors significance correction

Percentiles		95% Confidence interval
2,5		
5	0,1804	
10	0,2539	
25	1,0442	0,1889 to 2,9273
75	9,4544	3,2926 to 50,8524
90	37,8918	
95	53,5733	
97,5		



# Gruplar Arası İstatistiksel Analizler

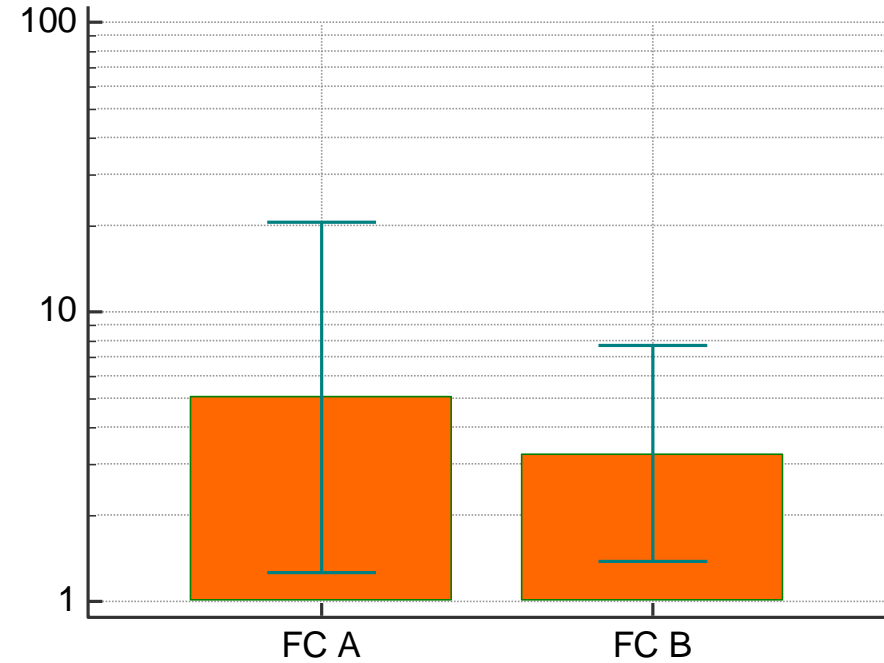


## Independent samples t-test

Sample 1		
Variable	FC_A	
	FC A	
Sample 2		
Variable	FC_B	
	FC B	
Back-transformed after logarithmic transformation.		
	Sample 1	Sample 2
Sample size	14	17
Geometric mean	5,0734	3,2421
95% CI for the mean	1,2624 to 20,3883	1,3725 to 7,6586
Variance of Logs	1,0946	0,5272
F-test for equal variances		P = 0,167

## T-test (assuming equal variances)

Difference on Log-transformed scale	
Difference	-0,1945
Standard Error	0,3191
95% CI of difference	-0,8470 to 0,4581
Test statistic t	-0,610
Degrees of Freedom (DF)	29
Two-tailed probability	P = 0,5469
Back-transformed results	
Ratio of geometric means	0,6390
95% CI of ratio	0,1422 to 2,8714





# Gruplar Arası İstatistiksel Analizler



## One-way analysis of variance

Data	FC XYZ
Factor codes	Grup_numerik_XYZ Grup numerik XYZ
Sample size	50

## Levene's test for equality of error variances

Levene statistic	3,037
DF 1	2
DF 2	47
Significance level	P = 0,057

## ANOVA on log-transformed data

Source of variation	Sum of Squares	DF	Mean Square
Between groups (influence factor)	4,5121	2	2,2560
Within groups (other fluctuations)	31,5209	47	0,6707
Total	36,0330	49	
F-ratio			3,364
Significance level			P = 0,043

## Tukey-Kramer test for all pairwise comparisons

Factor	n	Geom. Mean	Different (P<0,05) from factor nr
(1) 1	14	5,0734	(3)
(2) 2	17	3,2421	
(3) 5	19	1,0000	(1)

