

Sayın: Selim ZIRH
Hacettepe Üniversitesi Ankara

mRNA Gen Ekspresyon Analiz Raporu



Konutkent Mh.3028 Cd. No:2 West Gate C Blok No:9 Çankaya-Ankara

Tel: 0312 232 66 16 Faks: 0312 232 66 19

info@baranmedikal.com.tr www.baranmedikal.com.tr

İçindekiler

Proje Plan Özeti.....	3
Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar.....	4
1- Total RNA Ekstraksiyon.....	4
2- Nükleik Asitlerin spektrofotometrik Ölçümleri(nano gram değerleri) ve konsantrasyonlarının belirlenmesi.....	4
3- Reverse Transkriptaz (cDNA) İşlemi.....	5
4- qPCR mRNA Gen Ekspresyon Analizleri.....	6
TRIzol Total RNA Ekstraksiyon İşlemi.....	7
NucleoZOL Total RNA Ekstraksiyon İşlemi.....	8
Nükleik Asit Miktar Tayini ve DNase işlemi.....	9
ABM OneScript Plus Reverse Transcriptase İşlemi.....	10
Gen Ekspresyon Primer Tasarım Ve Bağlanma Sıcaklıkları (Tm).....	11
Numune Bilgileri Ve qPCR Ct Ortalama Sonuçları.....	13
2 ^{-ddCt} (log2) Ekspresyon Katsayı Sonuçları.....	15
Grup içi İstatistiksel Analizler PCOS SMO/GLI1 Gen Exp.....	17
Grup içi İstatistiksel Analizler Kontrol SMO/GLI1 Gen Exp.....	18
İstatistiksel Analizler SMO GenExp PCOS-Kontrol.....	19
İstatistiksel Analizler GLI1 GenExp PCOS-Kontrol.....	20
İstatistiksel Analizler GLI1 GenExp PCOS-HGL.....	21
Ekler.....	22

Proje Plan Özeti

- mRNA gen ekspresyon çalışması kapsamında 60 numunenin RNA ekstraksiyonları ve SMO ve GLI1 genlerinin real time PCR analizleri yapılmıştır. Deney uygulamalarında normalizatör olarak housekeeping geni ACTB kullanılmıştır.
- Analiz gurupları içerisinde tüm grupların gen ekspresyon analizlerini çıkartmak için $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak, 2001) metodu kullanılmıştır. Kontrol grubu numuneleri baz alınarak ekspresyon katsayısı değişimleri (Fold change, FC) hesaplanmıştır.
- Analiz grupları için istatistik analizler;
 - PCOS grubu ve alt grupları
 - PCOS FF-MAS, PCOS FF-MAS+Siklopamin, PCOS Siklopamin, PCOS Kontrol
 - HGL5 grubu ve alt grupları
 - HGL5 FF-MAS, HGL5 FF-MAS+Siklopamin, HGL5 Siklopamin, HGL5 Kontrol
 - Kontrol grubu ve alt grupları
 - Kontrol FF-MAS, Kontrol FF-MAS+Siklopamin, Kontrol Siklopamin, Kontrol Kontrol

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

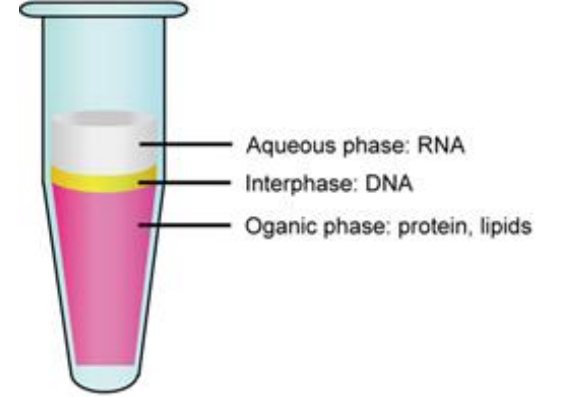
Çoklu grup kıyaslamalarının birlikte değerlendirilmesi için ANOVA testi uygulanmıştır.

Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar

1- Total RNA Ekstraksiyon

Hücre Kültürü numunelerinden yüksek kalitede Total RNA ekstraksiyonu sağlamak için TRIzol Reagent ve NucleoZOL kullanılmıştır.

Trizol Reagent kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemleri faz ayrımı ve bir dizi nükleik asit çöktürme yöntemine dayanmaktadır.



NucleoZOL kullanılarak yapılan ekstraksiyon işlemleri DNA, polisakkarit ve proteinleri uzaklaştırmak için su ilavesi ile çöktürme yöntemine dayanmaktadır.

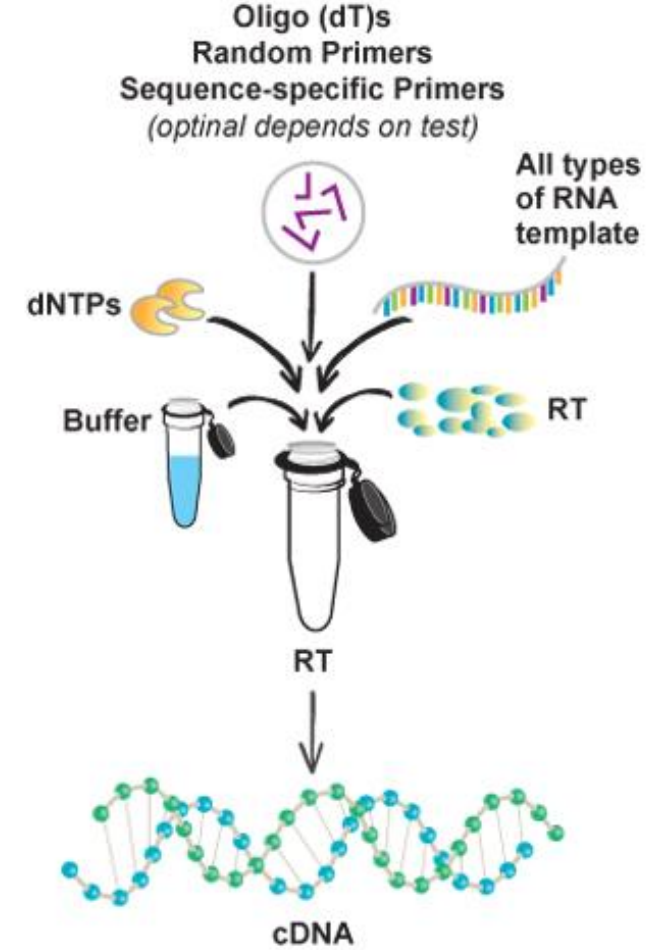
2- Nükleik Asitlerin spektrofotometrik Ölçümleri(nano gram değerleri) ve konsantrasyonlarının belirlenmesi

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.

Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar

3- Reverse Transkriptaz (cDNA) İşlemi

mRNA gen ekspresyonu çalışmalarında pre-mRNA ve mature-mRNA yapılarının tespiti için Oligo(dT) ve Random Hexamer primerleri ile Revers Transkriptaz işlemi yapılmaktadır. Bu primerler mRNA zincirini uzatarak bir yapıyı kararlı hale getirmektedir. Daha sonra Reverse Transkriptaz enzimi mRNA dizisinin karşı kopyasını sentezler. Elde edilen cDNA, standart PCR için bir şablon olarak kullanılabilir.

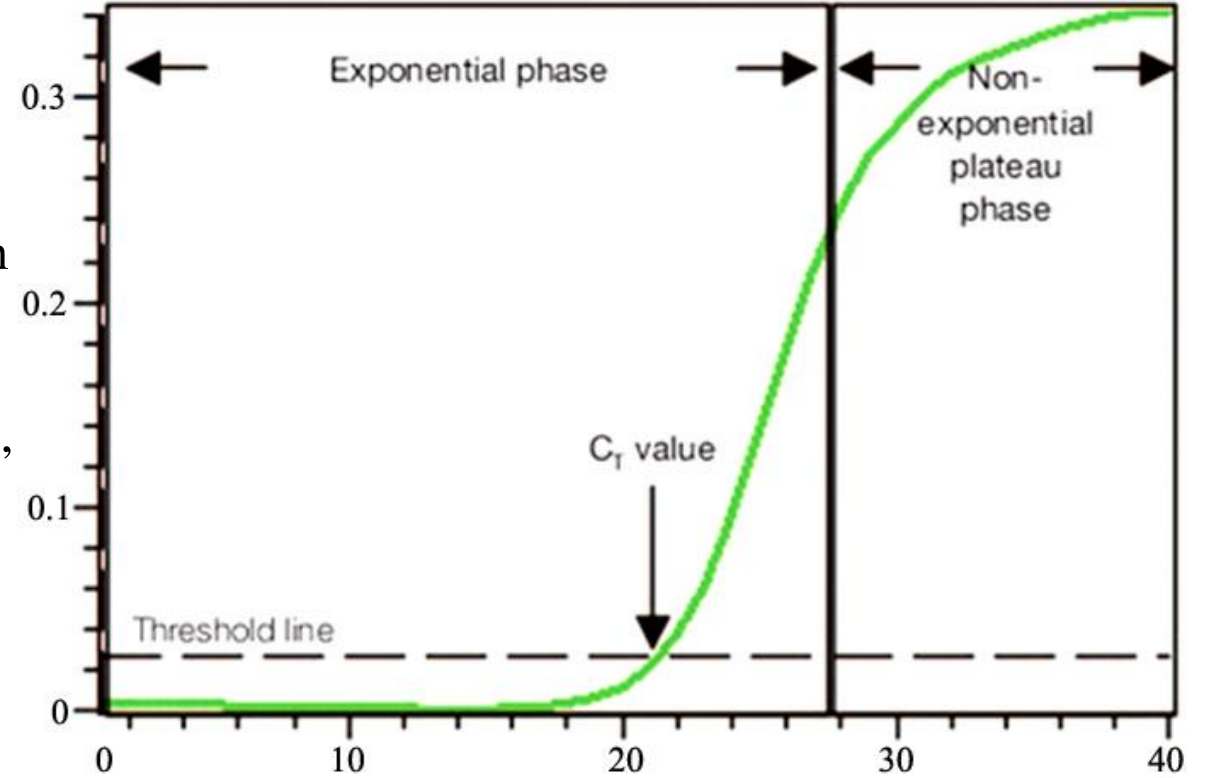


Projede Kullanılan Yöntem ve Kavramlar

4- qPCR mRNA Gen Ekspresyon Analizleri

Son aşamada mRNA dizileriyle oluşturulan cDNA zincirleri, relative ekspresyon analizlerinde kullanılır. Hasta ve kontrol gruplarında bulunan numunelerin herbiri için, ilgili mRNA 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		



TRIzol Total RNA Ekstraksiyon İşlemi

1. Hücre kültürlerinin pasajlanma aşamasında plakalara 1 ml TRIzol Reagent eklenerek 1,5 ml mikrosantrifuj tüplerine aktarılmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.
2. TRIzol eklenmiş hücre süspansiyonları oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
3. Hücre süspansiyonuna 200 µl kloroform eklenerek, dikkatlice karıştırılmış ve oda sıcaklığında 5 dk bekletilmiştir.
4. Oda sıcaklığında 5 dk bekletildikten sonra 12000 G hızda 10 dk +4 °C sıcaklıkta santrifuj işlemi uygulanmıştır. Tüpler içerisinde faz ayrımı meydana gelerek 3 farklı katman oluşmuştur.
5. En üstte bulunan ve RNA içeren süpernatant kısım farklı bir mikrosantrifuj tüpe aktarılarak içerisine 500 µl izopropanol eklenmiş ve dikkatlice karıştırılmıştır.
6. RNA süspansiyonu 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12,000 G hızda 10 dk +4°C sıcaklıkta santrifuj işlemi uygulanmıştır.
7. Santrifuj sonrasında tüplerin alt kısımlarında RNA pelleti oluşmuştur.
8. Süpernatant kısmı atılarak alt kısımda bulunan pelleti 1 ml %70 etanol ile 7500 G hızda 5 dk +4°C sıcaklıkta santrifuj yapılarak yıkanmıştır.
9. Üst faz mikrosantrifuj tüpünden uzaklaştırılarak, RNA pelleti kuruyana kadar 15 dk oda sıcaklığında bekletilmiştir.
10. 30 µl nükleaz-free su eklenerek pellet süspanse edilmiştir. Numunelere ait total RNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

NucleoZOL Total RNA Ekstraksiyon İşlemi

1. Hücre kültürlerinin pasajlanma aşamasında plakalara 1 ml NucleoZOL solüsyonu eklenerek 1,5 ml mikrosantrifuj tüplerine aktarılmış ve -80 °C'de muhafaza edilmiştir.
2. 1 ml NucleoZOL eklenmiş hücre süspansiyonuna 200 µl Rnase-free su eklenerek, 15 sn dikkatlice karıştırılmıştır.
3. Süspansiyon oda sıcaklığında 5 dk inkübe edilmiştir.
4. Oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12000 G hızda 15 dk +4 °C sıcaklıkta santrifuj işlemi uygulanmıştır. Çöktürme işlemi sonrasında tüplerin alt kısımda DNA, polisakkarit ve proteinlerin oluşturduğu pellet ve RNA içeren süpernatant kısmı ayrılmıştır.
5. Üst fazda RNA içeren kısımdan 500 µl süpernatant farklı bir mikrosantrifuj tüpe aktarılarak içerisine 500 µl izopropanol eklenmiş ve dikkatlice karıştırılmıştır.
6. RNA süspansiyonu 10 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 12,000 G hızda 10 dk +4°C sıcaklıkta santrifuj işlemi uygulanmıştır.
7. Santrifuj sonrasında tüplerin alt kısımlarında RNA pelleti oluşmuştur.
8. Süpernatant kısmı atılarak alt kısımda bulunan RNA pelleti 500 µl %75 etanol ile 8000 G hızda 3 dk +4°C sıcaklıkta santrifuj yapılarak yıkanmıştır.
9. Üst faz mikrosantrifuj tüpünden uzaklaştırılmış ve RNA pelleti 30 µl nükleaz-free su eklenerek süspanse edilmiştir.
10. Numunelere ait total RNA'lar -20 °C'de muhafaza edilmiştir.

Nükleik Asit Miktar Tayini ve DNase işlemi

- **Colibri Titertek Berthold cihazı kullanılarak** Numunelerin 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 ayarlanmıştır.
 2. Cihaz kapağı açıldıktan sonra elüsyon bufferdan 2 μ l eklenerek körleme (blank) işlemi yapılmıştır.
 3. Numunelerden sırasıyla 2 μ l alınıp ölçüm seçeneği kullanılarak RNA ölçme işlemi tamamlanmaktadır.

ABM OneScript Plus Reverse Transcriptase İşlemi

Hücre hattı örneklerinden elde edilen Total RNA’ların her birinden 1000 ng kullanılarak OneScript® Plus cDNA Synthesis Kit (ABM, Canada) yardımıyla cDNA işlemi aşağıdaki protokole uygun olarak yapılmıştır.

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

Komponentler	Miktar	Final konsantrasyonu
Total RNA	Değişken	500 µg/reaksiyon
dNTP (10M)	1 µl	500 µM
Oligo(dT) (10 µM)	1 µl	0,5 µM
Random Hexamer(10 µM)	1 µl	0,5 µM
Nükleaz içermeyen H ₂ O	14,5 µl ’ye tamamla	-

2. 65°C de 5 dk primer denatüre edilmiştir. Cihazdan çıkarılan tüpler 1 dk buz üzerinde inkübe edilmiş ve , kısa bir spin yapılmıştır.
3. Kalan bileşenler aşağıdaki tabloda olduğu gibi eklenmiştir.

Komponentler	Miktar	Final konsantrasyonu
5X RT buffer	4 µl	1X
OneScript Plus RTase (200 U/µl)	1 µl	200 U/reaksiyon
RNaseOFF Ribonuclease Inhibitor (40 U/µl)	0,5 µl	20 U/reaksiyon

4. 20 µl mRNA komponenti 50 °C’de 15 dk inkübasyona tabi tutulmuştur.
5. Reaksiyon sonunda enzim, 85 °C’de 5 dk ’da inaktive edilerek, cDNA ürünleri -20 °C’de uzun süre muhafaza edilmiştir.

Gen Ekspresyon Primer Tasarım Ve Bağlanma Sıcaklıkları (T_m)

- Çalışma kapsamında RT-qPCR yöntemi kullanılarak SMO ve GLI1 genlerinin ekspresyon seviyeleri saptanmıştır.
- RT-qPCR işlemleri RT-qPCR cihazları her döngü sonunda floresan şiddetini saptayan fluometre ve thermal cycler dan meydana gelmektedir. Terz transkriptaz işlemiyle RNA'lerden çift iplikli yapıya dönüştürülen cDNA zincirleri arasına girerek floresan ışığa veren SYBR Green I boyası, gen ekspresyon analizlerinde sıklıkla kullanılmaktadır. Çalışma kapsamında gen ekspresyon seviyelerinin belirlenmesi için BrightGreen qPCR MasterMix (ABM, Canada) kullanılmıştır. Tasarımları tamamlanan primer setlerinin optimizasyonları yapılarak bağlanma sıcaklıkları belirlenmiştir.
- Her bir Gen bölgesi için uygun T_m değerinde kurulumlar gerçekleştirilmiş ve döngü eğrileri ve Melting Curve verileri incelenmiştir.

Primer Adı	Sekans (5'→3')	Uzunluk	T _m °C	Amplikon length
SMO_hsa_F	CAAGATCAACGAGACCAT	18 bp	57 °C	146 bp
SMO_hsa_R	CCTGACATAGCACATAGT	18 bp		
GLI1_hsa_F1	GCCTGAATCTGTGTATGA	18 bp	53 °C	84 bp
GLI1_hsa_R1	GATGTGCTCGCTGTTGAT	18 bp		
ACTB_ej_hsa_F	TGAAGATCAAGATCATTG	18 bp	55 °C	179 bp
ACTB_ej_hsa_R	TAACGCAACTAAGTCATA	18 bp		

Gen Ekspresyon Primer Tasarım Ve Bağlanma Sıcaklıkları (Tm)

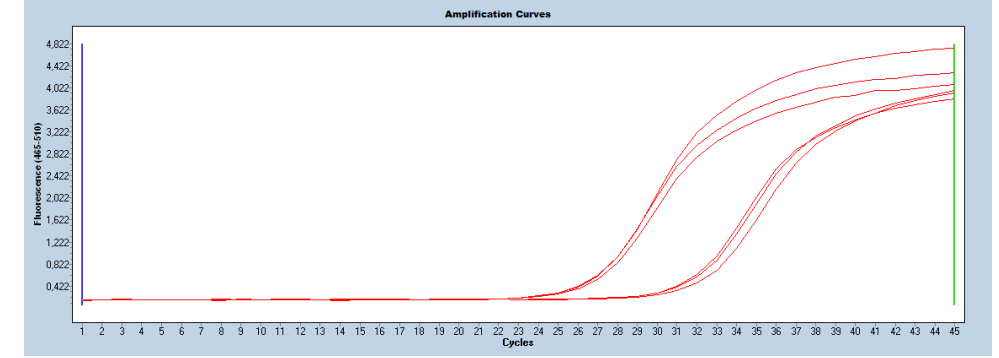
1. Soğuk blok üzerinde aşağıdaki tabloya göre bileşenler hazırlanmıştır.

Komponentler	Derişim	Miktar 1X
BrightGreen 2X qPCR MasterMix	1X	10 µl
MixB (F & R Primer) (2,4 mM)	300 nM/µl	2,5 µl
cDNA	25 ng/µl	2 µl
Nükleaz içermeyen H ₂ O	-	5,5 µl

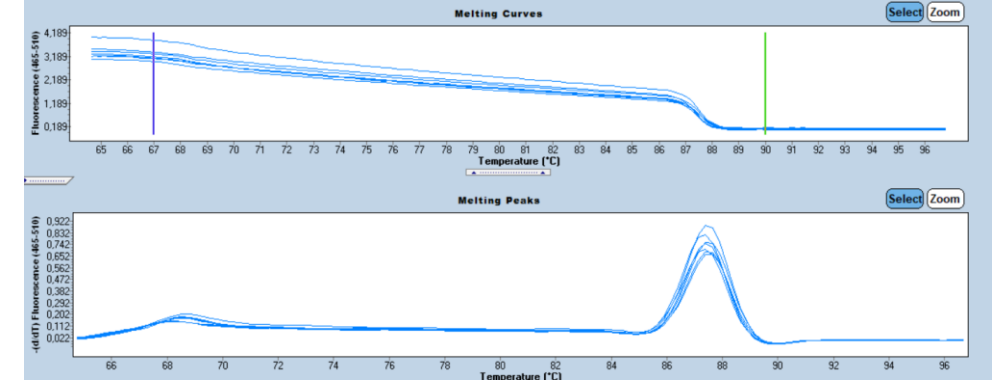
2. Real-time PCR prosedürü aşağıdaki tabloya göre ayarlanmıştır.

PCR Aşaması	İşlem	Sıcaklık - Derece	Tekrar
İlk Denatürasyon	Denatürasyon	95 °C 5 dk	1
PCR Aplikasyon	Denatürasyon	95 °C 10 sn	40
	Bağlanma	53 – 57 °C 30 sn (Okuma)	
Melting Curve	Denatürasyon	95 °C 5 sn	1
	Holding	65 °C 1 dk	
	Melting	95 °C sürekli	
Final	Soğutma	40 °C 30 sn	1

3. PCR ürünlerine ait pikler incelenerek sonuçlar değerlendirilmiştir.



RT-qPCR Döngü görseli



RT-qPCR Melting Curve görseli

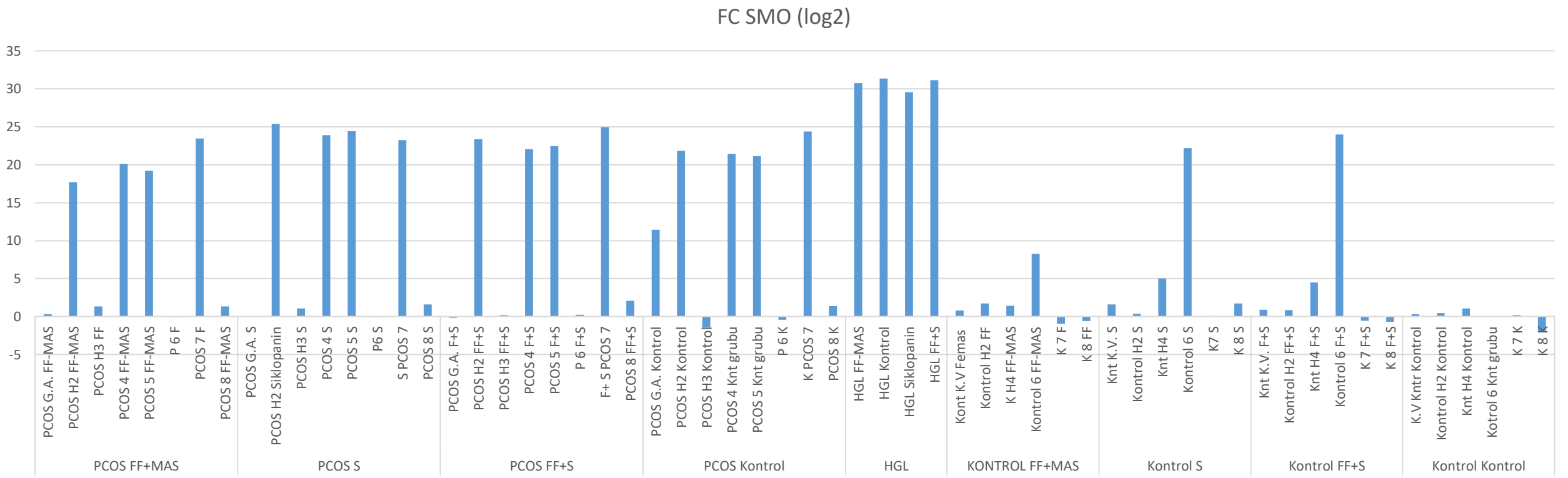
Numune Bilgileri Ve qPCR Ct Ortalama Sonuçları

Numune Üzerinde Yazan İsim	N.A. Kod	Numune Listesi (Araştırmacıdan Gelen)	Numune Türü	Numune Miktarı (µl)	Nükleik Asit Miktarı (ng)	SMO replika 1	SMO replika 2	SMO Ct Mean	GLI1 replika 1	GLI1 replika 2	GLI1 Ct Mean	ACTB replika 1	ACTB replika 2	ACTB Ct Mean	SMO dCt	GLI1 dCt	SMO ddCt	GLI1 ddCt	FC SMO 2^~ddCt	FC GLI1 2^~ddCt	FC SMO log2	FC GLI1 log2
Kont K.V Femas	1		H. Kültür	750	106	30,87	30,54	30,705	34,92	UNDETERMINED	34,92	18,75	20,12	19,435	11,27	15,485	-0,815	-0,087	1,759298152	1,062159186	0,815	0,087
K.V Kntr Kontrol	2		H. Kültür	1000	116	33,69	UNDETERMINED	33,69	33,58	UNDETERMINED	33,58	21,91	21,9	21,905	11,785	11,675	-0,3	-3,897	1,231144413	14,89751712	0,3	3,897
Knt K.V. S	3		H. Kültür	750	294	33,43	34,79	34,11	34,16	UNDETERMINED	34,16	23,52	23,75	23,635	10,475	10,525	-1,61	-5,047	3,052518418	33,05966041	1,61	5,047
Knt K.V. F+S	4		H. Kültür	750	152	30,46	30,26	30,36	UNDETERMINED	UNDETERMINED	#SAYI/0!	19,11	19,22	19,165	11,195	UNDETERMINED	-0,89	UNDETERMINED	1,853176124	UNDETERMINED	0,89	UNDETERMINED
Kontrol H2 FF	5		H. Kültür	1000	176	25,41	25,21	25,31	30,3	30,94	30,62	14,94	14,94	14,94	10,37	15,68	-1,715	0,108	3,282966435	0,927873476	1,715	-0,108
Kontrol H2 Kontrol	6		H. Kültür	1000	135	25,43	25,09	25,26	29,49	29,56	29,525	13,56	13,71	13,635	11,625	15,89	-0,46	0,318	1,375541818	0,802181166	0,46	-0,318
Kontrol H2 S	7		H. Kültür	1000	162	30,41	30,63	30,52	33,55	UNDETERMINED	33,55	18,34	19,3	18,82	11,7	14,73	-0,385	-0,842	1,305859787	1,792533399	0,385	0,842
Kontrol H2 FF+S	8		H. Kültür	1000	104	25,62	25,74	25,68	30,87	31,31	31,09	14,4	14,49	14,445	11,235	16,645	-0,85	1,073	1,802500925	0,475329551	0,85	-1,073
K H4 FF-MAS	9		H. Kültür	750	169	32,69	32,91	32,8	UNDETERMINED	UNDETERMINED	#SAYI/0!	22,04	22,25	22,145	10,655	UNDETERMINED	-1,43	UNDETERMINED	2,694467154	UNDETERMINED	1,43	UNDETERMINED
Knt H4 Kontrol	10		H. Kültür	1000	113	29,39	29	29,195	35,76	UNDETERMINED	35,76	18,06	18,28	18,17	11,025	17,59	-1,06	2,018	2,084931522	0,246900215	1,06	-2,018
Knt H4 S	11		H. Kültür	750	151	33,43	34,79	34,11	32,52	UNDETERMINED	32,52	27,27	26,79	27,03	7,08	5,49	-5,005	-10,082	32,11109595	1083,88802	5,005	10,082
Knt H4 F+S	12		H. Kültür	500	197	33,07	UNDETERMINED	33,07	36,48	UNDETERMINED	36,48	25,43	25,56	25,495	7,575	10,985	-4,51	-4,587	22,78480313	24,03391883	4,51	4,587
Kontrol 6 FF-MAS	13		H. Kültür	750	703	24,67	23,6	24,135	30,6	32,7	31,65	20,3	UNDETERMINED	20,3	3,835	11,35	-8,25	-4,222	304,4370214	18,66158992	8,25	4,222
Kotrol 6 Knt grubu	14		H. Kültür	750	596	23,68	23,35	23,515	29,38	29,65	29,515	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED	UNDETERMINED
Kontrol 6 S	15		H. Kültür	750	686	23,88	24,52	24,2	29,4	29,23	29,315	34,71	33,89	34,3	-10,1	-4,985	-22,185	-20,557	4768155,978	1542672,085	22,185	20,557
Kontrol 6 F+S	16		H. Kültür	750	862	23,65	23,45	23,55	29,55	30,32	29,935	35,45	36,4	35,45	-11,9	-5,515	-23,985	-21,087	16603683,49	2227509,262	23,985	21,087
K 7 F	17		H. Kültür	500	1198	26,43	25,53	25,98	29,33	29,3	29,315	12,95	12,97	12,96	13,02	16,355	0,935	0,783	0,52304247	0,581157054	-0,935	-0,783
K 7 K	18		H. Kültür	500	1700	25,98	25,63	25,805	29,05	28,96	29,005	13,9	13,96	13,93	11,875	15,075	-0,21	-0,497	1,156688184	1,411275843	0,21	0,497
K7 S	19		H. Kültür	750	1789	25,92	25,36	25,64	29,29	29,83	29,56	13,58	13,56	13,57	12,07	15,99	-0,015	0,418	1,010451446	0,748461493	0,015	-0,418
K 7 F+S	20		H. Kültür	750	1319	26,41	26,36	26,385	29,63	29,47	29,55	13,69	13,8	13,745	12,64	15,805	0,555	0,233	0,680657058	0,85086373	-0,555	-0,233
K 8 FF	21		H. Kültür	1000	1146	33,43	36,34	34,885	32,7	UNDETERMINED	32,7	22,15	22,27	22,21	12,675	10,49	0,59	-5,082	0,664342907	33,87150064	-0,59	5,082
K 8 K	22		H. Kültür	1000	1157	33,37	34,86	34,115	37,63	UNDETERMINED	37,63	19,91	20,09	20	14,115	17,63	2,03	2,058	0,244855074	0,240148716	-2,03	-2,058
K 8 S	23		H. Kültür	1000	1185	32,37	36,77	34,57	35,46	37,97	36,715	24,24	24,18	24,21	10,36	12,505	-1,725	-3,067	3,305801273	8,380289017	1,725	3,067
K 8 F+S	24		H. Kültür	1000	928	35,39	UNDETERMINED	35,39	32,56	33,82	33,19	22,86	22,33	22,595	12,795	10,595	0,71	-4,977	0,611320139	31,49388871	-0,71	4,977
HGL FF-MAS	25		H. Kültür	1000	1083	22,57	21,94	22,255	29,04	28,87	28,955	29,85	29,89	29,87	-7,615	-0,915	-19,7	-16,487	851708,3688	91850,5029	19,7	16,487
HGL Kontrol	26		H. Kültür	500	943	22,57	21,95	22,26	28,99	28,89	28,94	30,42	30,51	30,465	-8,205	-1,525	-20,29	-17,097	1282031,252	140187,6759	20,29	17,097
HGL Siklopanin	27		H. Kültür	750	1583	21,33	21,59	21,46	29,21	29,84	29,525	27,75	28	27,875	-6,415	1,65	-18,5	-13,922	370727,6001	15521,71124	18,5	13,922
HGL FF+S	28		H. Kültür	750	882	21,86	21,29	21,575	29,8	29,6	29,7	29,49	29,63	29,56	-7,985	0,14	-20,07	-15,432	1100707,721	44207,39185	20,07	15,432
PCOS G.A. FF-MAS	29		H. Kültür	750	308	27,72	27,95	27,835	32,51	UNDETERMINED	32,51	15,97	16,19	16,08	11,755	16,43	-0,33	0,858	1,257013375	0,55171687	0,33	-0,858
PCOS G.A. Kontrol	30		H. Kültür	1250	295	29,66	29,64	29,65	33,67	33,9	33,785	17,92	17,93	17,925	11,725	15,86	-0,36	0,288	1,283425898	0,819036698	0,36	-0,288

Numune Bilgileri Ve qPCR Ct Ortalama Sonuçları

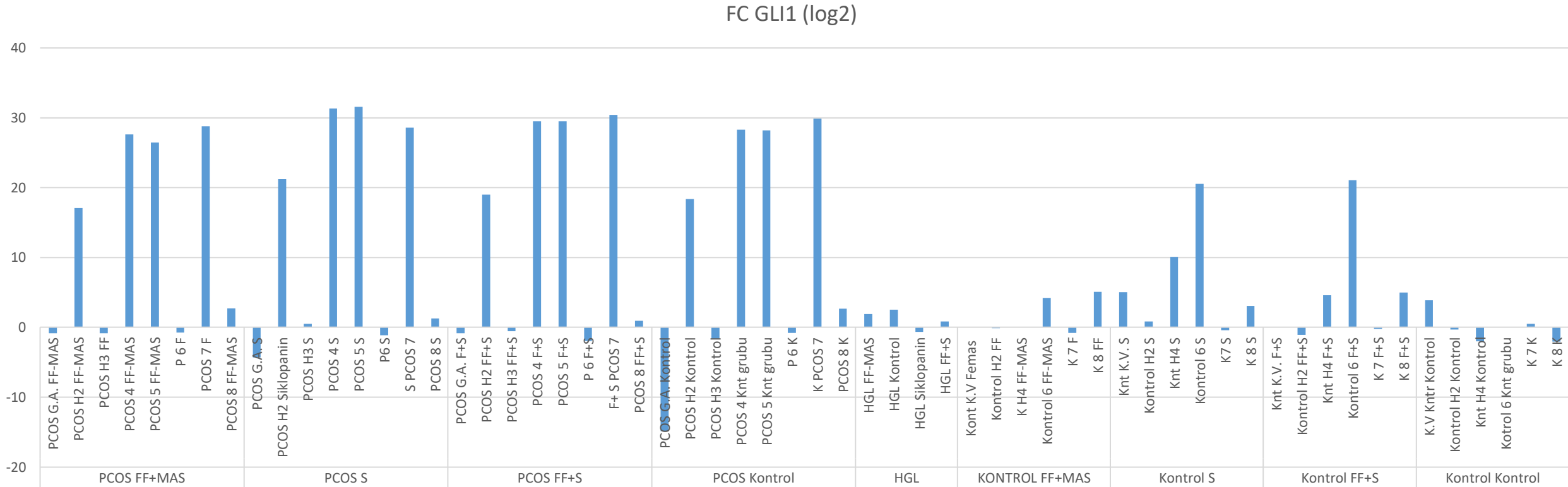
Numune Üzerinde Yazan İsim	N.A. Kod	Numune Listesi (Araştırmacıdan Gelen)	Numune Türü	Numune Miktarı (µl)	Nükleik Asit Miktarı (ng)	SMO replika 1	SMO replika 2	SMO Ct Mean	GLI1 replika 1	GLI1 replika 2	GLI1 Ct Mean	ACTB replika 1	ACTB replika 2	ACTB Ct Mean	SMO dCt	GLI1 dCt	SMO ddCt	GLI1 ddCt	FC SMO 2^Δ-ΔdCt	FC GLI1 2^Δ-ΔdCt	FC SMO log2	FC GLI1 log2
PCOS G.A. S	31		H. Kültür	750	176	28,36	28,93	28,645	36,45	UNDETERMINED	36,45	17,79	15,33	16,56	12,085	19,89	0	4,318	1	0,050136323	0	-4,318
PCOS G.A. F+S	32		H. Kültür	750	95	28,85	28,67	28,76	33,75	32,07	32,91	16,61	16,38	16,495	12,265	16,415	0,18	0,843	0,882702996	0,557483109	-0,18	-0,843
PCOS H2 FF-MAS	33		H. Kültür	500	95	25,11	25,19	25,15	29,44	29,11	29,275	32,98	28,56	30,77	-5,62	-1,495	-17,705	-17,067	213666,3215	137302,6553	17,705	17,067
PCOS H2 Kontrol	34		H. Kültür	500	1038	22,49	22,58	22,535	29,4	29,57	29,485	UNDETERMINED	32,28	32,28	-9,745	-2,795	-21,83	-18,367	3728076,413	338078,7939	21,83	18,367
PCOS H2 Siklopanin	35		H. Kültür	500	596	22,3	21,88	22,09	29,55	29,91	29,73	35,38	UNDETERMINED	35,38	-13,29	-5,65	-25,375	-21,222	43514714,65	2446011,914	25,375	21,222
PCOS H2 FF+S	36		H. Kültür	500	831	21,5	21,64	21,57	29,58	29,34	29,46	32,92	32,84	32,88	-11,31	-3,42	-23,395	-18,992	11030539,36	521388,7758	23,395	18,992
PCOS H3 FF	37		H. Kültür	1000	171	25,73	25,67	25,7	31,71	30,95	31,33	14,96	14,91	14,935	10,765	16,395	-1,32	0,823	2,496661098	0,565265284	1,32	-0,823
PCOS H3 Kontrol	38		H. Kültür	1000	118	24,3	23,57	23,935	27,84	27,48	27,66	10,46	10,44	10,45	13,485	17,21	1,4	1,638	0,378929142	0,321301584	-1,4	-1,638
PCOS H3 S	39		H. Kültür	1000	136	29,52	28,58	29,05	32,57	33,62	33,095	18,35	17,72	18,035	11,015	15,06	-1,07	-0,512	2,099433367	1,426025717	1,07	0,512
PCOS H3 FF+S	40		H. Kültür	1000	123	27,75	27,17	27,46	31,9	31,5	31,7	15,71	15,45	15,58	11,88	16,12	-0,205	0,548	1,152686347	0,683967652	0,205	-0,548
PCOS 4 FF-MAS	41		H. Kültür	250	440	23,71	22,47	23,09	18,84	19,22	19,03	30,68	31,54	31,11	-8,02	-12,08	-20,105	-27,652	1127737,606	210902360,3	20,105	27,652
PCOS 4 Knt grubu	42		H. Kültür	250	753	23,13	23,17	23,15	19,81	19,74	19,775	32,24	32,75	32,495	-9,345	-12,72	-21,43	-28,292	2825353,59	328655297,8	21,43	28,292
PCOS 4 S	43		H. Kültür	500	416	22,54	22,71	22,625	18,69	18,59	18,64	34,43	UNDETERMINED	34,43	-11,805	-15,79	-23,89	-31,362	15545568,06	2759959594	23,89	31,362
PCOS 4 F+S	44		H. Kültür	500	432	23,51	23,75	23,63	19,8	19,44	19,62	33,5	33,67	33,585	-9,955	-13,965	-22,04	-29,537	4312221,936	778974035,1	22,04	29,537
PCOS 5 FF-MAS	45		H. Kültür	500	208	23,65	23,59	23,62	19,81	19,86	19,835	30,66	30,79	30,725	-7,105	-10,89	-19,19	-26,462	598088,7271	92439107,83	19,19	26,462
PCOS 5 Knt grubu	46		H. Kültür	250	436	23,32	23,09	23,205	19,58	19,73	19,655	31,57	32,98	32,275	-9,07	-12,62	-21,155	-28,192	2335014,374	306646235,7	21,155	28,192
PCOS 5 S	47		H. Kültür	250	523	22,53	22,28	22,405	18,67	18,78	18,725	UNDETERMINED	34,76	34,76	-12,355	-16,035	-24,44	-31,607	22760043,83	3270808163	24,44	31,607
PCOS 5 F+S	48		H. Kültür	500	539	22,81	23,07	22,94	19,43	19,3	19,365	34,34	32,31	33,325	-10,385	-13,96	-22,47	-29,532	5809570,183	776278989,7	22,47	29,532
P 6 F	49		H. Kültür	500	1198	24,88	25,67	25,275	28,93	29,96	29,445	12,89	13,34	13,115	12,16	16,33	0,075	0,758	0,949342121	0,5913155	-0,075	-0,758
P 6 K	50		H. Kültür	500	780	25,58	24,9	25,24	29,34	28,85	29,095	12,75	12,75	12,75	12,49	16,345	0,405	0,773	0,755236293	0,585199321	-0,405	-0,773
P6 S	51		H. Kültür	500	888	25,45	25,48	25,465	29,53	30,48	30,005	13,01	13,61	13,31	12,155	16,695	0,07	1,123	0,952637998	0,459138081	-0,07	-1,123
P 6 F+S	52		H. Kültür	500	1336	25,68	24,99	25,335	30,51	31,52	31,015	13,42	13,54	13,48	11,855	17,535	-0,23	1,963	1,172834949	0,256494536	0,23	-1,963
PCOS 7 F	53		H. Kültür	1000	2664	23,8	23,59	23,695	21,77	21,96	21,865	34,8	35,36	35,08	-11,385	-13,215	-23,47	-28,787	11619140,37	463180732,5	23,47	28,787
K PCOS 7	54		H. Kültür	1000	3143	23,1	23,59	23,345	21,21	21,41	21,31	UNDETERMINED	35,65	35,65	-12,305	-14,34	-24,39	-29,912	21984753,18	1010204341	24,39	29,912
S PCOS 7	55		H. Kültür	1000	2819	23,48	23,31	23,395	21,4	21,58	21,49	UNDETERMINED	34,54	34,54	-11,145	-13,05	-23,23	-28,622	9838452,638	413124104,9	23,23	28,622
F+ S PCOS 7	56		H. Kültür	1000	2281	23,89	23,69	23,79	21,74	21,92	21,83	36,67	UNDETERMINED	36,67	-12,88	-14,84	-24,965	-30,412	32750191,35	1428644679	24,965	30,412
PCOS 8 FF-MAS	57		H. Kültür	1000	1343	25,49	25,67	25,58	27,65	27,67	27,66	14,74	14,89	14,815	10,765	12,845	-1,32	-2,727	2,496661098	6,620774529	1,32	2,727
PCOS 8 K	58		H. Kültür	1000	615	23,5	24,2	23,85	25,83	26,32	26,075	13,17	13,15	13,16	10,69	12,915	-1,395	-2,657	2,62988552	6,307201392	1,395	2,657
PCOS 8 S	59		H. Kültür	1000	837	26,95	26,88	26,915	30,89	30,55	30,72	16,39	16,47	16,43	10,485	14,29	-1,6	-1,282	3,031433133	2,431758566	1,6	1,282
PCOS 8 FF+S	60		H. Kültür	1000	986	23,96	23,88	23,92	28,66	28,46	28,56	13,91	13,93	13,92	10	14,64	-2,085	-0,932	4,242750965	1,907919101	2,085	0,932

2^{-ddCt} (log2) Ekspresyon Katsayı Sonuçları



SMO gen ekspresyonları kapsamında numunelere ait katsayı (Fold Change,FC) değişimleri hesaplanmıştır. Gen ekspresyon normalizasyon hesaplamalarında ACTB geni kontrol olarak kullanılmıştır. PCOS, HGL ve Kontrol numunelerinin normalizasyon hesaplamaları için normalizatör olarak Kontrol-Kontrol numunelerinin ortalamaları kullanılmıştır. FC SMO (log2) grafiğinde numune bazlı katsayı (FC) değişimleri gösterilmiştir.

2^{-ddCt} (log2) Ekspresyon Katsayı Sonuçları

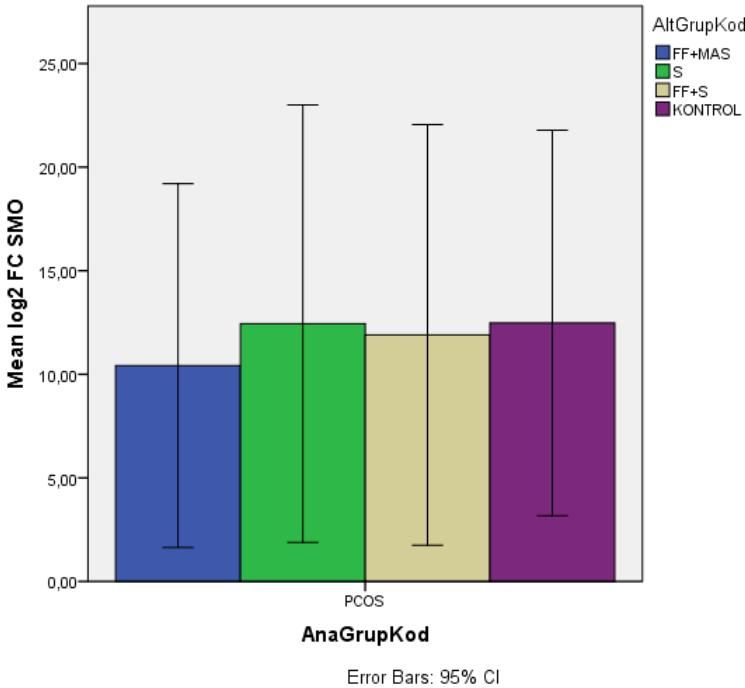


GLI1 gen ekspresyonları kapsamında numunelere ait katsayı (Fold Change,FC) değişimleri hesaplanmıştır. Gen ekspresyon normalizasyon hesaplamalarında ACTB geni kontrol olarak kullanılmıştır. PCOS, HGL ve Kontrol numunelerinin normalizasyon hesaplamaları için normalizatör olarak Kontrol-Kontrol numunelerinin ortalamaları kullanılmıştır. FC SMO (log2) grafiğinde numune bazlı katsayı değişimleri gösterilmiştir.

Grup içi İstatistiksel Analizler PCOS SMO/GLI1 Gen Exp

Grup	Alt Grup	FC SMO (log2)	p	FC GLI1 (log2)	p
PCOS	FF MAS				
	S				
	FF MAS + S	11,81 ±11,08	,824	12,67 ±14,83	,954
	Kontrol				

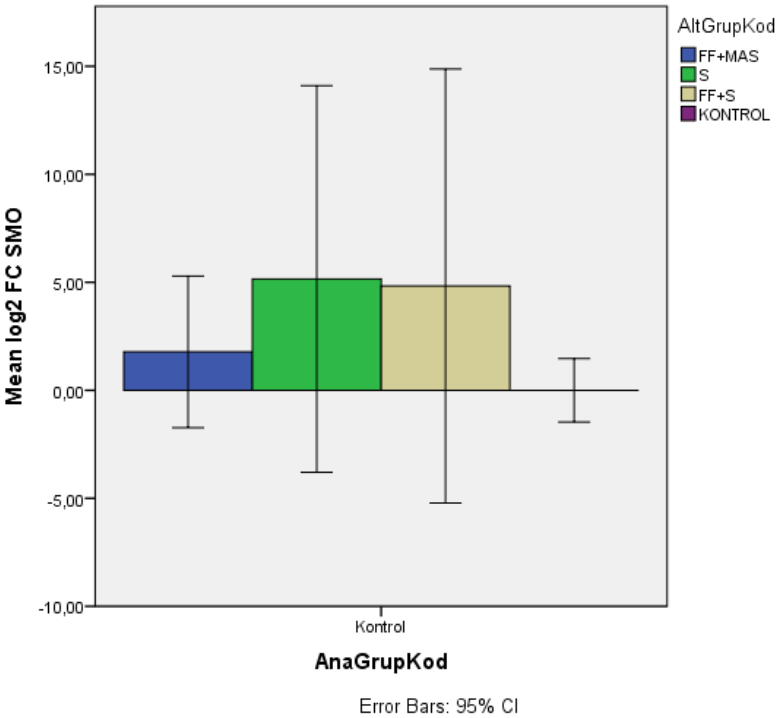
SMO ve GLI1 gen ekspresyon analizleri kapsamında grup içi (PCOS FF+MAS, PCOS S, PCOS FF+S ve PCOS Kontrol) kıyaslamalarında Kruskal-Wallis Test kullanılmıştır. Alt grupların analizi için Post-Hoc analiz yapılmıştır. PCOS alt gruplarında grup için anlamlı bir farklılık görülmemiştir(p-değeri>0,005).



Grup içi İstatistiksel Analizler Kontrol SMO/GLI1 Gen Exp

Grup	Alt Grup	FC SMO (log2)	p	FC GLI1 (log2)	p
Kontrol	FF MAS				
	S	3,06 ±6,69	,377	3,66 ±6,47	,219
	FF MAS + S				
	Kontrol				

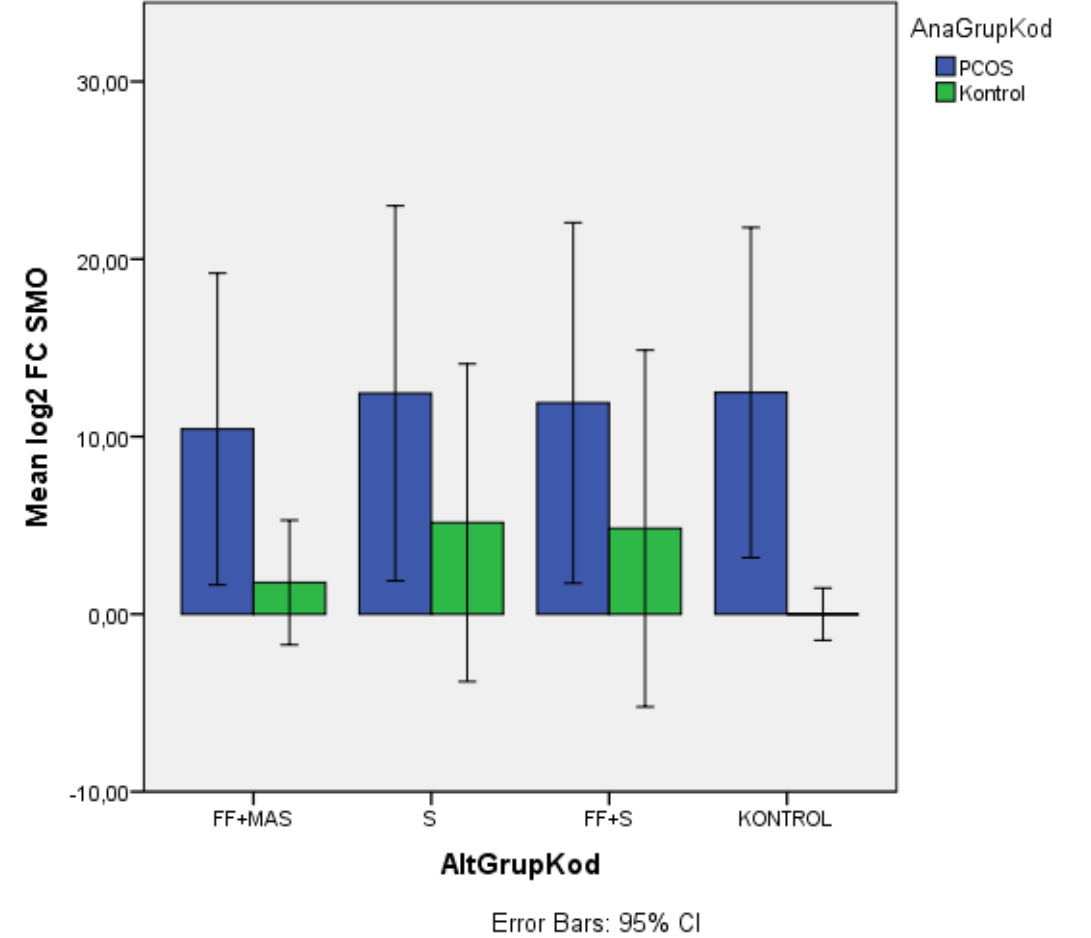
SMO ve GLI1 gen ekspresyon analizleri kapsamında grup içi (Kontrol FF+MAS, Kontrol S, Kontrol FF+S ve Kontrol Kontrol) kıyaslamalarında Kruskal-Wallis Test kullanılmıştır. Alt grupların analizi için Post-Hoc analiz yapılmıştır. Kontrol alt gruplarında grup içi anlamlı bir farklılık görülmemiştir(p-değeri>0,005).



İstatistiksel Analizler SMO GenExp PCOS-Kontrol

	PCOS	Kontrol	P
FF MAS (FC SMO)	10,42 ±10,49	1,78 ±2,34	,196
S (FC SMO)	12,44 ±12,63	5,15 ±8,52	,606
FF MAS + S (FC SMO)	11,90 ±12,14	4,82 ±9,57	,366
Kontrol (FC SMO)	12,47 ± 12,47	0 ±1,18	,063

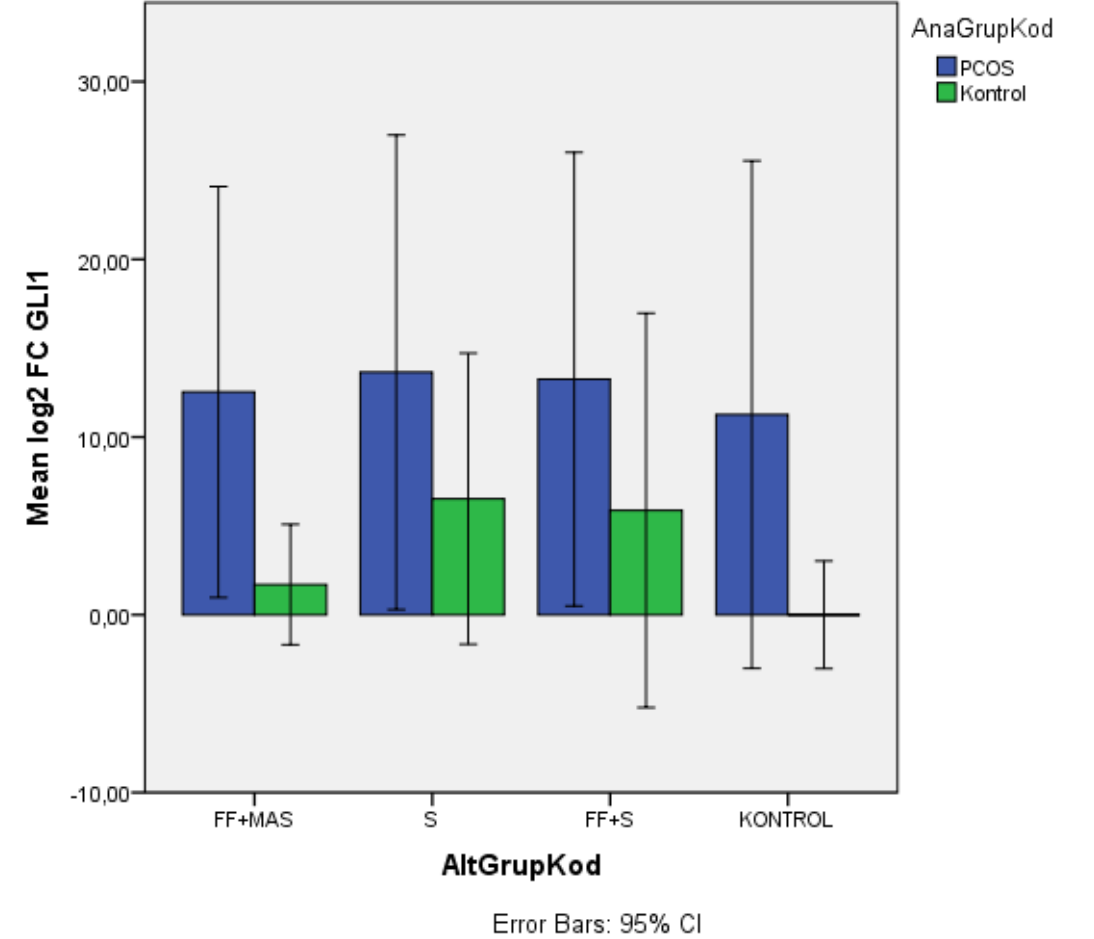
SMO gen ekspresyon PCOS ve Kontrol grup kıyaslamalarının istatistiksel analizleri kapsamında grupların ikili kıyaslaması için Mann-Whitney Test kullanılmıştır. PCOS ve Kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (tüm gruplar için p-değeri>0,005).



İstatistiksel Analizler GLI1 GenExp PCOS-Kontrol

	PCOS	Kontrol	P
FF MAS (FC GLI1 log2)	12,53 ±12,82	1,70 ±2,73	,558
S (FC GLI1 log2)	12,44 ±15,98	6,52 ±7,79	,699
FF MAS + S (FC GLI1 log2)	13,25 ±15,25	5,86 ±8,93	,661
Kontrol (FC GLI1 log2)	11,26 ±17,08	0 ±2,44	,425

GLI1 gen ekspresyon PCOS ve Kontrol grup kıyaslamalarının istatistiksel analizleri kapsamında grupların ikili kıyaslaması için Mann-Whitney Test kullanılmıştır. PCOS ve Kontrol grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (tüm gruplar için p-değeri>0,005).



İstatistiksel Analizler GLI1 GenExp PCOS-HGL

	PCOS	HGL	P
FF MAS (FC SMO)	10,42 ±10,49	30,77	,120
S (FC SMO)	12,44 ±12,63	31,36	,121
FF MAS + S (FC SMO)	11,90 ±12,14	29,57	,121
Kontrol (FC SMO)	12,47 ± 12,47	31,14	,121

	PCOS	HGL	P
FF MAS (FC SMO)	12,53 ±12,82	1,91	,120
S (FC SMO)	12,44 ±15,98	2,52	1
FF MAS + S (FC SMO)	13,25 ±15,25	-0,66	,439
Kontrol (FC SMO)	11,26 ±17,08	0,85	,699

SMO ve GLI1 gen ekspresyon PCOS ve HGL grup kıyaslamalarının istatikselsel analizleri kapsamında grupların ikili kıyaslaması için Mann-Whitney Test kullanılmıştır. HGL grubu tek bir numuneden oluştuğu için grafik çizilememiştir. PCOS ve HGL grupları arasında anlamlı bir farklılık bulunamamıştır (tüm gruplar için p-değeri>0,005).

Ekler

RT-qPCR: Kantitatif eş zamanlı PCR işlemi, hücre hatları içindeki her bir hücrede ifade edilen gen ekspresyon düzeylerinin belirlemek amacıyla kullanılan hassas bir yöntemdir.

Melting Curve Eğrisi: DNA zincirinin ayrılma özelliğinden faydalanarak çift iplik yapının denatüre olduğu sıcaklığın tespit edilmesini sağlayan RT-qPCR erime erisi analizidir.

Ct (Cp-Cq): real time PCR cihazlarında amplikasyon döngüleri sırasında alınan floresan ışımaaya ait threshold çizgisi üzerinde bulunan eşik değeri.

dCt (Δ Ct): Ekspresyon seviyesini belirlemek istediğimiz genin Ct değeri ile normalizatör genin Ct değerinin farkı

ddCt (Δ Ct): Ekspresyon seviyesi hesaplanmak istenilen genin gruplar arasında ki farkı

2^{-ddCt} (2^{- Δ Ct}):Ekspresyon seviyesi belirlenmek istenilen genin gruplar arasında ki katsayı (FC) değeri, gen ekspresyon çalışmalarında katsayı değişimi verileri kullanılmaktadır.

İstatiksel Analiz;

Çalışmanın istatiksel analizlerinin gerçekleştirilmesi amacıyla SPSS 22 paket programı kullanılmıştır. RT-qPCR analizleri ile elde edilen SMO ve GLI1 genlerinin ekspresyon seviyelerinin hesaplanmasıyla elde edilen verilerin değerlerin sonuçları Kontrol-Kontrol grup ortalamasına karşı test edilmiştir. Sonuçlar ortalama \pm standart sapma şeklinde özetlenmiştir. Grup analizlerinin normal dağılımı sağlamamasından dolayı kıyaslamalar için Mann-Whitney Test ve Kruskal-Wallis test kullanılmıştır. Gruplar arası farklılıkların belirlenmesi için Post-Hoc çoklu karşılaştırma testlerinden yararlanılmıştır.

Log transformasyon hakkında;

Cihaz kayıtları sonrasında normalizasyon işlemi (livak metod) gerçekleştirilen verilerin aşırı düşük veya yüksek ifadeli gen ekspresyon katasyıları vermeleri istatistik analizlerde veri dağılımlarını etkilemektedir. Normalize edilmiş nispi gen ekspresyon seviyelerinin logaritmik transformasyonları gerçekleştirilerek aşırı ve düşük ifadeli gen ekspresyon seviyelerine eşit ağırlık atfederek veri dağılımları daha simetrik hale getirilmiştir. Böylelikle aykırı değerlerin etkisibüyük ölçüde ortadan kaldırılarak daha sade bir hal alması sağlanmıştır(1).

Referance

1. Willems E, Leyns L, Vandesompele J. Standardization of real-time PCR gene expression data from independent biological replicates. Anal Biochem 2008;379:127–9.
2. Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- Δ CT} method. methods, 25(4), 402-408.