

HT-29 Kolon Kanseri Hücre Hattında Senkronizasyon Başlatıcıların Sirkadiyen Ritimdeki Rolü

Dilek ÖZTÜRK¹ Beyza GÖNCÜ^{2*}

ÖZET: Memelilerde merkezi sirkadiyen saat, hipotalamusta konumlanmıştır. Periferel saatleri nöronal ve endokrin sinyaller ile koordine etmektedir. Sirkadiyen saat gen ve proteinlerinin, merkezi saatten bağımsız olarak da periferel hücre ve dokularda ritmik ekspresyona devam ettiği yapılan çalışmalar ile gösterilmiştir. İmmortalize hücre hatlarında da ritim devam etmekte ancak hücreler arası koordinasyon bozulmaktadır. Hücre hatları kanser ile ilgili yolaklar ve sirkadiyen ritim ilişkisini çalışmak için en elverişli araçlardır. Ancak öncelikle ritmik gen ekspresyonunun devam ettiğinin gösterilmesi gerekmektedir. Hücreler arası senkronizasyonun sağlanması için bazı araçlar kullanılmaktadır. Bu çalışmadaki amacımız; güçlü senkronizasyon başlatıcılar olan fetal bovin serum ve deksametazonun HT-29 kolon kanseri hücre hattında *PER2* saat geninin ekspresyonu üzerindeki rolünü incelemektir. Bu amaçla; fetal bovin serum veya deksametazon uygulamasını takiben HT-29 hücreleri altı farklı zamanda toplanarak RNA izole edilmiş ve *PER2* ve *ACTB* gen ekspresyonları gerçek zamanlı PZR deneyi ile kantifiye edilmiştir. Sonuçlar Lineer *Cosinor* analizleri ile değerlendirilmiştir. *PER2* genine ait mRNA ekspresyonlarındaki değişim *ACTB* referans geni ile kıyaslanarak değerlendirildiğinde, her iki başlatıcı ile de ritmik ekspresyonun sağlandığı gösterilmiştir. Her iki başlatıcı ile de *Cosinor* analizine göre 18 ve 24 saatlik periyot sürelerinde anlamlı ritmik değişim gösterilmiştir. Ek olarak deksametazon ile başlatılan senkronizasyonda, 24 saatlik periyot süresinde zaman dilimindeki güven aralığının anlamlı olduğu gözlenmiştir. HT-29 hücre hattında iki farklı başlatıcı ile yapılan bu çalışmada sirkadiyen periyot sürelerinin hesaplanmasında başlatıcıların değişkenlik gösterebildiği tespit edilmiştir.

Anahtar Kelimeler: Senkronizasyon, Sirkadiyen ritim, HT-29, FBS, Deksametazon

The Role of Synchronization Mediators in Circadian Rhythm in HT-29 Colon Cancer Cell Line

ABSTRACT: In mammals, the central circadian clock is located in the hypothalamus, coordinating peripheral clocks with neuronal and endocrine signals. It has been shown that circadian clock genes and proteins continue their rhythmic expression in peripheral cells and tissues independent of central clock. The rhythm continues even in the immortalized cell lines, but intercellular coordination is impaired. Cell lines are good mediators for studying cancer-related pathways and circadian rhythm relationships. However, it should first be shown that rhythmic gene expression continues. Some mediators are used to achieve intercellular synchronization. The aim of this study was to investigate the role of strong synchronization initiators, FBS, and dexamethasone, on the expression of the *PER2* clock gene in the HT-29 colon cancer cell line. For this purpose; following FBS or dexamethasone administration, HT-29 cells were harvested at 6 different times to isolate RNA and the *PER2* and *ACTB* gene expressions were quantified by real-time PCR assay. The results were evaluated by Linear *Cosinor* analysis. When the change in mRNA expression of the *PER2* gene was compared to the *ACTB* reference gene, it was shown that rhythmic expression was achieved with both initiators. According to the *Cosinor* analysis, a significant rhythmic change was observed in both 18 and 24 hour periods. However, in the synchronization with dexamethasone, the confidence interval in the time Period was also significant in the 24 hour period. In this study, it was determined that the initiators may vary in the calculation of circadian Periods which was carried out with two different initiators in HT-29 cell line.

Keywords: Synchronization, Circadian rhythm, HT-29, FBS, Dexamethasone

¹Dilek ÖZTÜRK (Orcid ID: 0000-0003-2485-891X), Bezmialem Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı, İstanbul, Türkiye

²Beyza GÖNCÜ (Orcid ID: 0000-0001-6026-8218), Bezmialem Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi, İstanbul, Türkiye

*Sorumlu Yazar / Corresponding Author: Beyza GÖNCÜ, e-mail: bgoncu@bezmialem.edu.tr

GİRİŞ

Sirkadiyen saatler, neredeyse tüm canlı organizmalarda bulunan son derece korunmuş, endojen zamanlayıcılardır. İnsanda bu saatler, uyku-uyanıklık döngüleri ve metabolizma dahil olmak üzere birçok davranışsal ve fizyolojik süreçte 24 saate yakın ritimleri düzenler. Memelilerde, bu günlük ritimler, iç hipotalamusta bulunan merkezi bir sirkadiyen zamanlayıcı olan, suprakiasmatik çekirdek (SCN) tarafından kontrol edilir. Çoğu periferik doku ve hücre, aynı zamanda sirkadiyen saat genlerinden ve proteinlerinden oluşan transkripsiyonel-translasyonel geri besleme döngüleri tarafından sürdürülen sirkadiyen osilatörleri içerir. Temel sarmal döngü proteinleri CLOCK ve BMAL1, bir transkripsiyonel aktivatör kompleksi oluşturmak için heterodimerize olur ve protein ürünleri kendi transkripsiyonunu baskılayan *PER* ve *CRY* baskılayıcı genlerini aktive eder (Dibner, Schibler ve ark. 2010, Tamai, Nakane ve ark. 2018).

Memeli sirkadiyen zamanlama sistemi, hiyerarşik bir yapıya sahiptir, SCN ana osilatör olarak hareket eder ve dokulardaki periferik saatleri koordine eder. Sirkadiyen saatler, zamanı yalnızca yaklaşık olarak ölçebilir ve bu nedenle jeofiziksel zamanla rezonansta kalabilmek için her gün senkronize edilmeleri gerekir. SCN nöronlarının osilatörleri, öncelikle fotik sinyaller aracılığıyla senkronize edilirken, periferik organlara ritmik bilgiyi nöronal ve endokrin sinyaller ile aktarır (Nagoshi, Saini ve ark. 2004, Dibner, Schibler ve ark. 2010).

Periferik dokularda SCN'den bağımsız olarak ritmisite devam etmektedir. Karaciğer, akciğer, böbrek, dalak, pankreas, kalp, mide, iskelet kası, kornea, tiroit ve adrenal bez doku kültürlerinde sirkadiyen saate bağlı gen ekspresyonları güçlü bir şekilde devam etmektedir. SCN lezyonu bulunan farelerde periferik saatler osile olmaya devam eder, ancak ritim eğrilerinin fazları koordine değildir. İmmortalize hücre kültürlerinde de ritim görülmüş ancak osilasyonun senkronize olmadığı tespit edilmiştir. Bu ritimlerin senkronize edilmesi için farklı ritim

başlatıcıları hücre kültürlerinde kullanılmıştır. Periferik saatler için baskın senkronize edicinin SCN'den daha çok besin alımı olduğu çalışmalar ile tespit edilmiştir (Balsalobre, Damiola ve ark. 1998, Nagoshi, Saini ve ark. 2004, Izumo, Sato ve ark. 2006).

Günümüzde, *in vitro* çalışmalarda sirkadiyen ritmin senkronizasyonunun başlatılması için farklı indükleyiciler kullanılmaktadır. Bilinen on farklı senkronizasyon başlatıcıdan en yüksek amplitüt oluşturanlar sırasıyla %50 at/bovin serum (FBS), deksametazon (Dex) (glukokortikoid reseptör agonisti), forsokolin (Fsk) ve epidermal büyüme faktörü (EGF)'dür (Izumo, Sato ve ark. 2006).

Çevresel faktörlerde yaşanan değişimlere bağlı olarak 24-saatlik periyot süresi saat genleri sayesinde esnetilerek, gecikme veya uzama gösterebilmektedir. Saat genlerinden Periyod 1 (*PER1*) ve Periyod 2 (*PER2*) ışığa-bağlı yeniden başlatma süresince yüksek hızda ekspresyonları değiştirilerek süreci dengelerler (Cheon, Park ve ark. 2013). Bütün bu süreçler hem periferik dokularda hem de hücre hatlarında senkronizasyon sinyalleri eşliğinde düzenlenir (Minami, Ode ve ark. 2013).

Bu çalışmada amacımız, HT-29 (insan epitelyal kolorektal adenokarsinom) kolon kanseri hücre hattında iki farklı aracı kullanılarak senkronizasyonun başlatılmasında oluşabilecek farklılığın belirlenmesidir. Çalışmada, senkronizasyon başlatıcı olarak besin ve glukokortikoid reseptör agonisti olan Dex kullanılmıştır. Kolon kanserinin dünyadaki en ölümcül üçüncü kanser tipi olması nedeniyle model olarak HT-29 kolon kanser hücreleri seçilmiştir (Siegel, Miller ve ark. 2017). Senkronizasyonun başlatılmasını takiben, sirkadiyen ritme bağlı genlerden *PER2* ekspresyonu kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

MATERYAL VE YÖNTEM

Hücre Kültürü: Çalışmada model olarak HT-29 hücre hattı kullanıldı. Bütün çalışma pasaj 17-25'e kadar olan sürede gerçekleştirildi. HT-29

hücreleri için DMEM/F12 medyum (Gibco, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) ve % 10 FBS (Panbiotech, Aidenbach, Germany), % 1 penisilin/streptomisin (Panbiotech) ile beraber kullanıldı. Hücreler 37°C'de % 5 CO₂ içeren hücre kültür inkübatörü kullanılarak, her 2-3 günde bir % 80 konflüent olduklarında pasajlandı. Her pasaj esnasında % 0,05 tripsin-EDTA (Panbiotech) kullanıldı.

Senkronizasyon: HT-29 hücreleri 6-kuyulu plakalara % 60-65 konflüent olacak şekilde kültüre edildi. Kültürün başlamasından 12 saat sonra 6-kuyulu plakalar iki ayrı grup olacak şekilde ayrılarak medyumları uzaklaştırıldı. İki gruba ayrılan 6-kuyulu plakalara sırasıyla; % 50 FBS ve 200nM (Kiessling, Beaulieu-Laroche ve ark. 2017) Dex içerecek şekilde hazırlanan hücre kültür medyumunu eklendi. İki saat kültüre bırakıldı. Besin ve kimyasal aracılı senkronizasyon şoku daha önce bildirilen protokole göre uygulandı (Balsalobre, Damiola ve ark. 1998, Izumo, Sato ve ark. 2006, van der Veen, Shao ve ark. 2012). Senkronizasyon şok süresi (iki saat) tamamlandıktan sonra hücreler normal kültür koşullarına alındı. Belirlenen zaman aralıklarında, ileri aşamalar için kültürden hücreler toplandı. HT-29 hücreleri için belirlenen zaman aralıkları sırasıyla; serum şok sonlandırıldığı andaki zaman dilimi sıfır olarak kabul edildi (T0), serum şok tamamlanmasını takiben 6. saat 'T6', 12. saat 'T12', 18. saat 'T18', 24. saat 'T24', ve 30. saat 'T30' olarak kabul edildi. Tüm zaman aralıkları için örnekler triplike olarak çalışıldı, standart hata (SH) değerleri Excel'de (2013, Microsoft Inc., USA) hesaplandı.

RNA İzolasyonu ve cDNA Sentezi: Gen ekspresyon analizleri için total RNA izolasyonu Hibrigen Total RNA İzolasyon Kiti (Hibrigen, İstanbul, Turkey) kullanılarak gerçekleştirildi.. Deney düzeneğindeki kültürden elde edilen her hücre grubu tripsinize edilerek toplandı ve 300 g'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı ve hücre pelleti 200 µl 1X PBS içerisinde süspanse edildi. Hücrelerin üzerine 400 µl lizis

tamponu eklendi. Karışım 15 saniye vorteks yardımıyla homojenize edildikten sonra cam lifli, filtreli tüplere aktarıldı. 8000 g'de 4°C'de 15 saniye santrifüj edildi. Filtrenin altına geçen süpernatant atıldı. 90 µl Dnase inkübasyon tamponu ve 10 µl DNase I'den oluşan karışım hazırlandı. Tamamı filtreli tüpe aktararak 15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. İnkübasyonu tamamlanmış örneklerin üzerine 500 µl yıkama tamponu I eklenip, 8000 g'de 4°C'de 15 saniye santrifüj edildi ve süpernatant uzaklaştırıldı. Devamında 500 µl yıkama tamponu II eklenip, 8000 g'de 4°C'de 15 saniye santrifüj edildi ve üçüncü yıkama işlemi için yeniden 200 µl yıkama tamponu II eklenerek 12000 g'de 4°C'de 2 dakika santrifüj edildi. Filtreli kısım yeni bir tüpe aktarıldı. Son olarak 40 µl elüsyon tamponu eklenerek, 8000 g'de 4°C'de 1 dakika santrifüj edilerek total RNA elüsyonu tamamlandı. Elde edilen RNA'nın miktarı, saflığı NanoDrop (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) cihazıyla belirlendi. İzole edilen total RNA'lardaki mRNA'ların Revers Transkriptaz - Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT-PZR) ile komplementer DNA'larının (cDNA) oluşturulması için *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* (Applied Biosystems, CA, USA) kullanıldı ve *thermal cycler* cihazı ile PZR'ları gerçekleştirildi.

RT-PZR: Elde edilen cDNA'lardan hedef gen olan *PER2* mRNA seviyesindeki değişim oranları referans gen olan *ACTB* (β-aktin, NCBI Gen No: 60) ekspresyonu ile kıyaslanması sonrasında saptandı. Özgül olarak dizayn edilen primerler; *PER2*: ileri AAATCCGCTACCACCCCTTC, geri AAGGCAGCAAAGCTGACTCTC ve *ACTB*: ileri CATGTACGTTGCTATCCAGGC, geri CTCCTTAATGTCACGCACGAT. Tasarlanan primerlerin erime sıcaklığı (T_m) 62,6°C olarak belirlendi ve qPZR işleminde *SensiFAST SYBR Mix* (Bioline, Luckenwalde, Germany) kullanıldı. Termal döngü, 95°C'de 2 dakika 1 siklus ön denatürasyonun ardından toplam 40 sikluluk 95°C 5 saniye denatürasyon, 62,6°C'de (T_m) 10

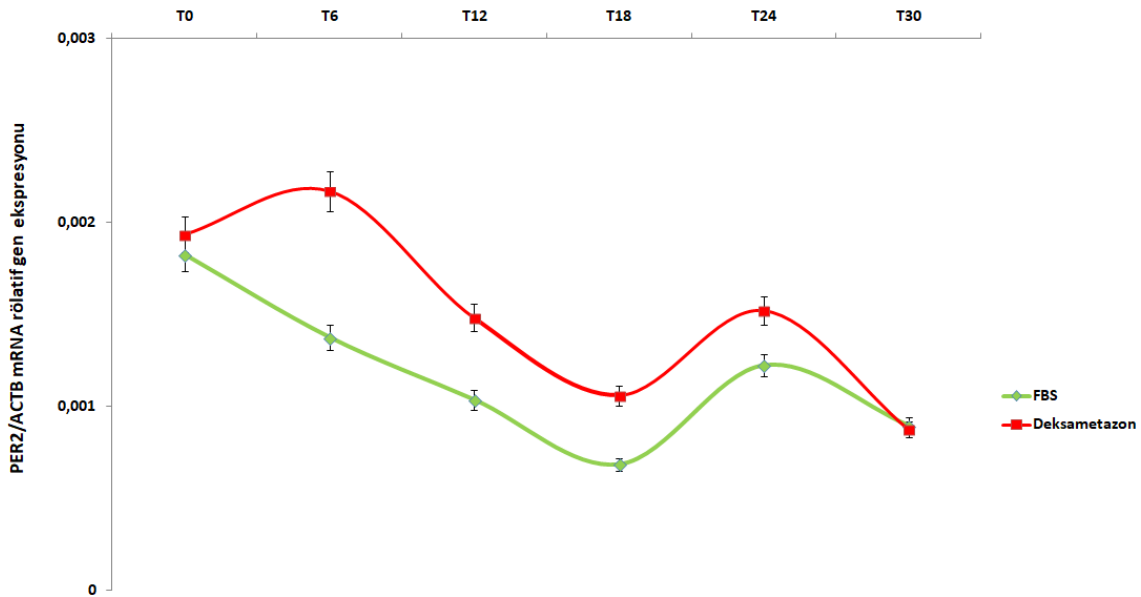
saniye bağlanma ve 72°C’de 20 saniye sentez ile tamamlandı. SYBR Green hidrolizine bağlı floresan artışı görülen inceleme örneklerinden elde edilen grafiklerdeki *cycle of threshold* (Ct) verileri değerlendirildi. Tüm örnekler ikili olarak çalışıldı. Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Genlerin değişim oranları $2^{-\Delta\Delta Ct}$ yöntemi kullanılarak hesaplandı (Livak and Schmittgen 2001).

İstatistiksel Analiz: Ritme bağlı değişimin sinüzoidal fonksiyonunun bir sirkadiyen ritimindeki anlamlılığı *Cosinor* algoritması (Fourier 1822, Nelson, Tong ve ark. 1979, Cornelissen 2014) kullanılarak Lineer *Cosinor* (MathLab, The MathWorks Inc., Massachusetts, USA) ile hesaplandı. Anlamlı bulunan “Bir Periyot” süresine ait güven aralığının zaman diliminde gösterimi MathLab programı (The MathWorks Inc., Massachusetts, USA)

kullanılarak çizildi. $P \leq 0,05$ olan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

BULGULAR VE TARTIŞMA

Dex ve FBS aracılı senkronizasyon şokunun tamamlanması ile belirlenen zaman aralıklarında (T0, T6, T12, T18, T24, T30 sürelerinde) HT-29 hücreleri kültürden toplanarak *PER2* genine ait mRNA ekspresyonlarındaki değişim *ACTB* referans geni ile kıyaslanarak değerlendirildi (Şekil 1). One-way ANOVA testi zaman aralıklarındaki iki farklı senkronizasyon başlatıcının, mRNA ekspresyonları arasındaki anlamlı değişiminin belirlenmesi için kullanıldı. mRNA rölatif gen ekspresyon değişimleri istatistiksel olarak T0, T12, T18, T24, T30 zaman aralıkları için anlamlı farklılık göstermedi. Sadece T6 zaman aralığında *PER2/ACTB* mRNA ekspresyonu, Dex ile FBS’e göre anlamlı şekilde artmıştır ($p=0,003$).



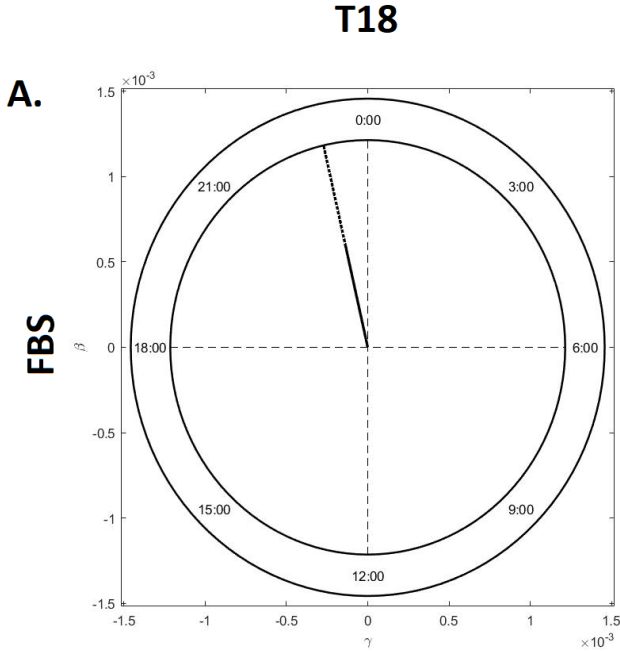
Şekil 1: *PER2/ACTB* mRNA rölatif gen ekspresyon FBS ve Dex kullanılarak senkronizasyon şoku sonrasında belirlenen zaman aralıklarına göre değişimi. Her nokta üç örneğe ait ortalama değeri göstermektedir, SH aşağı ve yukarı yönde hata çubukları ile gösterilmiştir.

PER2 mRNA ekspresyonunun *ACTB* referans geni ile farklı “Periyot” sürelerine bağlı olarak yapılan Lineer *Cosinor* analiz sonuçları ise Çizelge 1’de gösterilmektedir. Lineer *Cosinor* analiz sonuçları değerlendirildiğinde, sirkadiyen ritim sırasıyla Dex ve FBS için 18. saatte ($p=0,0073$ ve $p=0,0188$) ve 24. saatte ($p<0,0001$

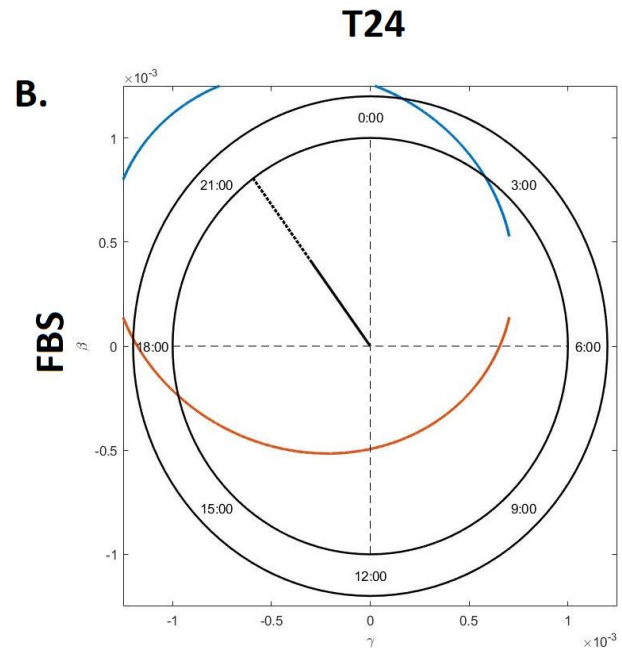
ve $p=0,0286$) “Bir Periyot” süresini tamamladığı belirlenmiştir. Lineer *Cosinor* hesaplamalarında senkronizasyon başlatıcılar; Dex ve FBS verilerine göre, “Bir Periyot” 18 saat kabul edildiğinde *PER2/ACTB* güven aralığı istatistiksel anlamlı bulunduğu halde zaman dilimi sınırlarının dışında kaldığı gözlenmiştir

(Şekil 2A ve 2C). Aynı şekilde “Bir Periyot” 24 saat kabul edildiğinde *PER2/ACTB* güven aralığı, FBS ile başlatılan senkronizasyonda zaman dilimi sınırlarında görülmektedir (Şekil 2B). Yalnızca

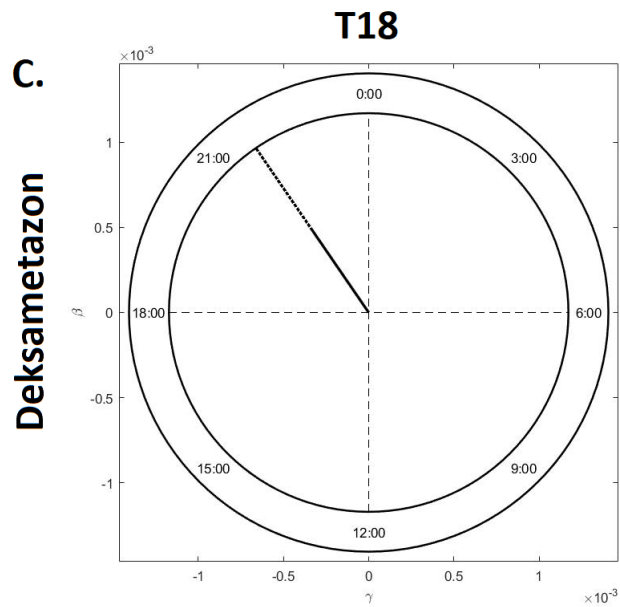
Dex ile başlatılan senkronizasyonda, “Bir Periyot” 24 saat kabul edildiğinde zaman dilimindeki güven aralığının anlamlı olduğu gözlenmiştir (Şekil 2D).



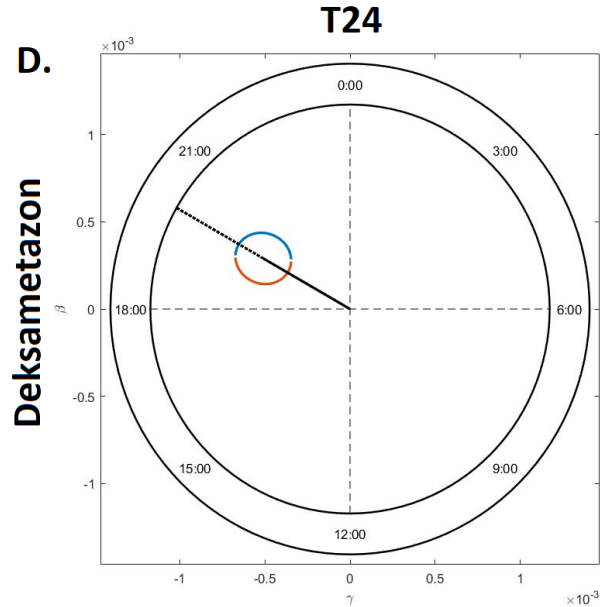
A. Senkronizasyon başlatıcısı olarak FBS kullanılan gruptaki *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* referans genine bağlı olarak değişiminin, 18 saatin "Bir Periyot" kabul edilerek zaman diliminde gösterimi.



B. Senkronizasyon başlatıcısı olarak FBS kullanılan gruptaki *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* referans genine bağlı olarak değişiminin, 24 saatin "Bir Periyot" kabul edilerek zaman diliminde gösterimi.



C. Senkronizasyon başlatıcısı olarak Dex kullanılan gruptaki *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* referans genine bağlı olarak değişiminin, 18 saatin "Bir Periyot" kabul edilerek zaman diliminde gösterimi.



D. Senkronizasyon başlatıcısı olarak Dex kullanılan gruptaki *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* referans genine bağlı olarak değişiminin, 24 saatin "Bir Periyot" kabul edilerek zaman diliminde gösterimi. Zaman dilimindeki daire çapı güven aralığının anlamlılığı arttıkça, zaman diliminde küçülmektedir

Şekil 2: “Bir Periyot” süresine ait güven aralığının zaman diliminde gösterimi.

Çizelge 1: *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* referans geni ile farklı senkronizasyon başlatıcılara ve farklı “Periyot” sürelerine bağlı olarak yapılan Lineer *Cosinor* analiz sonuçları. (FBS: fetal bovin serum, Dex: Deksametazon, glukokortikoid reseptör agonisti).

Periyot Süresi (saat)	Senkronizasyon Başlatıcı	Akrofaz	Amplitüt	p değeri
18	FBS	6,0576	0,00060	0,0188
	Dex	5,6828	0,00058	0,0073
24	FBS	5,6488	0,00049	0,0286
	Dex	5,2301	0,00058	<0,0001
30	FBS	1,0746	0,00066	0,4421
	Dex	1,3506	0,00071	0,6246

SONUÇ

Sirkadiyen ritmin senkronizasyonu bütün hücreler için önem arz etmektedir. Sirkadiyen zamanlama sistemi memeli doku ve organlarında her hücrenin belirli bir oranda ritmik gen ekspresyonu aracılığı ile fizyolojik ve biyokimyasal süreçlerini etkilemektedir. (Schibler 2005, Levi, Okyar ve ark. 2010).

Serum (FBS) şoku ilk kez Balsalobre ve ark. tarafından 1998 yılında memeli fibroblast kültüründe kullanılmıştır. Kısa süreli yüksek konsantrasyonda serumun saat genlerini senkronize edebildiği gösterilmiştir. Serum, Rat-1 fibroblast hücrelerinde *PER1* ve *PER2* genlerini aktive ederek senkronizasyonu başlatmıştır (Balsalobre, Damiola ve ark. 1998). Serum içerisinde pek çok nutrisyonel ve makromoleküler faktör bulunur. Büyüme faktörleri, hormonlar, amino asitler, lipitler gibi küçük moleküller, hücre büyümesi için gereklidir. Ayrıca periferik hücreler için besinin güçlü bir senkronize edici olduğu bilinmektedir (Nagoshi, Saini ve ark. 2004).

Balsalobre ve ark. glukokortikoid sinyalinin de hücre kültüründe sirkadiyen saati resetleyebildiğini ilk kez göstermişlerdir (Balsalobre, Brown ve ark. 2000, Balsalobre, Marcacci ve ark. 2000). Glukokortikoid glukoz ve lipit metabolizmasını, immün aktiviteyi, stres yanıtını, öğrenmeyi ve hafızayı düzenleyen multifonksiyonel bir hormondur. GC sirkadiyen ritim üzerinde de güçlü etkiye sahiptir. Varlığı perifer dokularda olduğu kadar, hücre hatlarında da sirkadiyen fazı ritmik olarak uyarabilmektedir

(Kassel and Herrlich 2007, Cheon, Park ve ark. 2013). GC reseptörünün ekspresyonu SCN’de değil yalnızca periferik dokularda bulunduğu için, ana osilatör mekanizmanın etkisi olmadan, GC’nin periferik saat ritmini düzenlemesinde de rol almaktadır (Cheon, Park ve ark. 2013, Zielinska, Van Moortel ve ark. 2016). Senkronize edici sinyaller dikkate alındığında glukokortikoid reseptör agonisti olan Dex’in iyi bir aday olduğunu göstermektedir (Izumo, Sato ve ark. 2006, Cheon, Park ve ark. 2013).

Senkronizasyon süreçlerinde *PER1* ve *PER2* hızlı şekilde ritim sürecini etkiler. Kromatin immünopresipitasyon (ChIP) sekanslama analizine göre *PER2* genine yakın üç ayrı *GC-response element* (GRE) bağlanma bölgesi bulunduğu bildirilmiştir. Bu intronik GRE bağlanma bölgeleri *PER2*’nin GC varlığındaki yanıtına etkir (Reddy, Pauli ve ark. 2009). Deney hayvanları ile gerçekleştirilen *in vivo* birçok çalışmada *PER2-knockout* farelerde; lokomotor aktiviterinde aritmi veya kısalmış sirkadiyen ritim ve beslenme bozuklukları gözlenmiştir (Zheng, Larkin ve ark. 1999, Albrecht, Zheng ve ark. 2001, Feillet, Ripperger ve ark. 2006, Pendergast, Friday ve ark. 2010). Bir başka *in vivo* çalışma da, özellikle dokuzuncu intronda bulunan GRE bağlanma bölgesi olmayan *PER2-knockout* fareler kullanılmıştır. Bu farelerde GC-bağımlı glukoz intoleransı, insülin direnci ve hatta leptin miktarında kısmi azalma gözlenmiştir (So, Bernal ve ark. 2009). Yabancıl tip farelere göre *PER2-knockout* farelerin ise erken uyandıkları bildirilmiştir (Kopp, Albrecht ve ark. 2002). Ayrıca insanlarda *PER2*

mutasyonlarının *PER2* geninin nükleer taşınımının ve degradasyonunun hızlanmasını indükleyerek ailesel uyku fazı bozukluklarına (*Familial advanced sleep phase syndrome* (FASPS)) sebep olduğu gösterilmiştir (Toh, Jones ve ark. 2001, Vanselow, Vanselow ve ark. 2006). *PER2* sirkadiyen ritmin senkronizasyonunda görev alan bir komponent olmasına rağmen, zamana bağlı birçok metabolizmanın düzenlenmesinde aktivitesi büyük önem arz etmektedir (Xu, Toh ve ark. 2007).

Kolon kanser hücre hatları ile daha önce yapılan çalışmalarda farklı senkronizasyon başlatıcılar denenmiştir. Pardini ve ark. Caco-2 ve HT-29 hücrelerinde % 50 FBS uyguladıktan sonra saat genlerinin düzeyine bakmışlar, ancak ritmik ekspresyonun başladığını göstermemişlerdir (Pardini, Kaeffer ve ark. 2005). Kiessling ve ark. HCT-116 hücrelerinde 200 nM Dex ile *PER2* ve *NR1D1* genlerinin ritmik ekspresyonunu göstermiştir (Kiessling, Beaulieu-Laroche ve ark. 2017). Ballesta ve ark ise Caco-2 hücre hattında serum şok uygulamasından sonra *REV-ERBa*, *PER2*, *BMAL1* saat genlerinin ekspresyonununun 26 saat 50 dakikalık bir periyot ile osile olduğunu göstermiştir (Ballesta, Dulong ve ark. 2011). HT-29 hücre hattında senkronizasyon başlatıcıların karşılaştırıldığı bir çalışma bulunmamaktadır.

Bilindiği üzere sirkadiyen ritim hesaplamaları için matematiksel modellemeler kullanılmaktadır. Bunlar arasında; *Rayleigh* Testi, *Enright* Periyotogram, *Lomb – Scargle* Periyotogram, *Fourier* Transformasyon Analizi ve *Lineer Cosinor* testi bulunmaktadır (Refinetti, Lissen ve ark. 2007). Çalışmamızda bu modellemelerden 1963'de Marquardt tarafından geliştirilen *Lineer Cosinor* testini uyguladık, çünkü bu test güven aralığına bağlı olarak optimum interpolasyonu tahmin etmeye yarayan, lineer olan ve olmayan “Bir Periyot”un kosinüs fonksiyonunun belirlenmesi için kullanılmaktadır (Marquardt 1963).

Testten çıkan sonuçların hesaplamalarının yapılabilmesi için ritmin senkronizasyonu 18, 24

ve 30 saatte tamamlandığı ön görülmüştür. Analizler sonucunda *PER2* mRNA ekspresyonuna bağlı olarak senkronizasyon başlatıcıların “Bir Periyot” süresinde istatistiksel olarak anlamlı farklılık oluşturduğu gösterilmiştir.

Güven aralığının zaman dilimi çemberindeki çapı, *Lineer Cosinor* verileri anlamlı olsa dahi, zaman dilimi çember alanında anlamlılığın artışı ile daralan bir çap oluşturmaktadır. Bu sonuçlar eşliğinde, *Lineer Cosinor* verilerinde anlamlı bulunan verilerin “Bir Periyot” süresi olan 24 saatlik zaman dilimindeki karşılığı, güven aralığının çapı ile doğru orantılıdır. Farklı matematiksel modellerin kullanımı, farklı anlamlılık ve güven aralıkları verebilmektedir. Sirkadiyen ritim çalışmalarının en zor yanı hesaplama yöntemlerinin farklı sabit ve periyodik değişimler üzerine tahmini geliştirilen fonksiyonların seçilmesiyle oluşturmaktadır.

Sonuç olarak, *Lineer Cosinor* analizi’ne göre Dex ile başlatılan senkronizasyon ileri anlamlılık göstermiştir. *PER2* genine ait mRNA ekspresyonundaki değişim iki ayrı başlatıcı ile değerlendirildiğinde HT-29 hücrelerinin sırasıyla 18 ve 24 saatte “Bir Periyot” gerçekleştirdiği gösterilmiştir. *Lineer Cosinor* analizi ve zaman diliminin güven aralığı beraber düşünüldüğünde Dex 24 saatlik bir ritimde FBS’e göre ileri anlamlılık taşıdığı ve ritmi oluşturduğu görülmektedir. Ayrıca kimyasal aracı olan Dex’in FBS’ye göre etkili oluşu ilerleyen çalışmalar için daha belirleyici olduğuna işaret etmektedir. Bu anlamlılığın diğer “Saat Genleri” ile değerlendirilmesinin gerekliliği dikkate alınmalıdır.

TEŞEKKÜR

Çalışmada kullanılan HT-29 hücre hattı temini için Dr. Belma Z. Kurt’a (Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya AD) teşekkür ederiz. Çalışmanın matematiksel modellemelerdeki yönlendirmeleri için Sadullah Göncü’ye (Fatih

Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü) teşekkür ederiz. Bu çalışma Bezmialem Vakıf Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Proje Destekleme Ofisi tarafından desteklenmiştir (Proje numarası:9.2016/9).

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

KAYNAKLAR

- Albrecht, U., B. Zheng, D. Larkin, Z. S. Sun and C. C. Lee (2001). "MPer1 and mper2 are essential for normal resetting of the circadian clock." *J Biol Rhythms* 16(2): 100-104.
- Ballesta, A., S. Dulong, C. Abbara, B. Cohen, A. Okyar, J. Clairambault and F. Levi (2011). "A combined experimental and mathematical approach for molecular-based optimization of irinotecan circadian delivery." *PLoS Comput Biol* 7(9): e1002143.
- Balsalobre, A., S. A. Brown, L. Marcacci, F. Tronche, C. Kellendonk, H. M. Reichardt, G. Schutz and U. Schibler (2000). "Resetting of circadian time in peripheral tissues by glucocorticoid signaling." *Science* 289(5488): 2344-2347.
- Balsalobre, A., F. Damiola and U. Schibler (1998). "A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells." *Cell* 93(6): 929-937.
- Balsalobre, A., L. Marcacci and U. Schibler (2000). "Multiple signaling pathways elicit circadian gene expression in cultured Rat-1 fibroblasts." *Curr Biol* 10(20): 1291-1294.
- Cheon, S., N. Park, S. Cho and K. Kim (2013). "Glucocorticoid-mediated Periyot2 induction delays the phase of circadian rhythm." *Nucleic Acids Res* 41(12): 6161-6174.
- Cornelissen, G. (2014). "Cosinor-based rhythmometry." *Theor Biol Med Model* 11: 16.
- Dibner, C., U. Schibler and U. Albrecht (2010). "The mammalian circadian timing system: organization and coordination of central and peripheral clocks." *Annu Rev Physiol* 72: 517-549.
- Feillet, C. A., J. A. Ripperger, M. C. Magnone, A. Dulloo, U. Albrecht and E. Challet (2006). "Lack of food anticipation in Per2 mutant mice." *Curr Biol* 16(20): 2016-2022.
- Fourier, J. (1822). *Théorie Analytique de la Chaleur*. Paris, France.
- Izumo, M., T. R. Sato, M. Straume and C. H. Johnson (2006). "Quantitative analyses of circadian gene expression in mammalian cell cultures." *PLoS Comput Biol* 2(10): e136.
- Kassel, O. and P. Herrlich (2007). "Crosstalk between the glucocorticoid receptor and other transcription factors: molecular aspects." *Mol Cell Endocrinol* 275(1-2): 13-29.
- Kiessling, S., L. Beaulieu-Laroche, I. D. Blum, D. Landgraf, D. K. Welsh, K. F. Storch, N. Labrecque and N. Cermakian (2017). "Enhancing circadian clock function in cancer cells inhibits tumor growth." *BMC Biol* 15(1): 13.
- Kopp, C., U. Albrecht, B. Zheng and I. Tobler (2002). "Homeostatic sleep regulation is preserved in mPer1 and mPer2 mutant mice." *Eur J Neurosci* 16(6): 1099-1106.
- Levi, F., A. Okyar, S. Dulong, P. F. Innominato and J. Clairambault (2010). "Circadian timing in cancer treatments." *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 50: 377-421.
- Livak, K. J. and T. D. Schmittgen (2001). "Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method." *Methods* 25(4): 402-408.
- Marquardt, D. W. (1963). "An Algorithm for Least-Squares Estimation of Nonlinear Parameters." *Journal of the Society for Industrial and Applied Mathematics* 11(2): 431-441.
- Minami, Y., K. L. Ode and H. R. Ueda (2013). "Mammalian circadian clock: the roles of transcriptional repression and delay." *Handb Exp Pharmacol*(217): 359-377.
- Nagoshi, E., C. Saini, C. Bauer, T. Laroche, F. Naef and U. Schibler (2004). "Circadian gene expression in individual fibroblasts: cell-autonomous and self-sustained oscillators pass time to daughter cells." *Cell* 119(5): 693-705.
- Nelson, W., Y. L. Tong, J. K. Lee and F. Halberg (1979). "Methods for cosinor-rhythmometry." *Chronobiologia* 6(4): 305-323.
- Pardini, L., B. Kaeffer, A. Trubuil, A. Bourreille and J. P. Galmiche (2005). "Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt." *Chronobiol Int* 22(6): 951-961.

- Pendergast, J. S., R. C. Friday and S. Yamazaki (2010). "Photic entrainment of Periyot mutant mice is predicted from their phase response curves." *J Neurosci* 30(36): 12179-12184.
- Reddy, T. E., F. Pauli, R. O. Sprouse, N. F. Neff, K. M. Newberry, M. J. Garabedian and R. M. Myers (2009). "Genomic determination of the glucocorticoid response reveals unexpected mechanisms of gene regulation." *Genome Res* 19(12): 2163-2171.
- Refinetti, R., G. C. Lissen and F. Halberg (2007). "Procedures for numerical analysis of circadian rhythms." *Biol Rhythm Res* 38(4): 275-325.
- Schibler, U. (2005). "The daily rhythms of genes, cells and organs. Biological clocks and circadian timing in cells." *EMBO Rep* 6 Spec No: S9-13.
- Siegel, R. L., K. D. Miller, S. A. Fedewa, D. J. Ahnen, R. G. S. Meester, A. Barzi and A. Jemal (2017). "Colorectal cancer statistics, 2017." *CA Cancer J Clin* 67(3): 177-193.
- So, A. Y., T. U. Bernal, M. L. Pillsbury, K. R. Yamamoto and B. J. Feldman (2009). "Glucocorticoid regulation of the circadian clock modulates glucose homeostasis." *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(41): 17582-17587.
- Tamai, T. K., Y. Nakane, W. Ota, A. Kobayashi, M. Ishiguro, N. Kadofusa, K. Ikegami, K. Yagita, Y. Shigeyoshi, M. Sudo, T. Nishiwaki-Ohkawa, A. Sato and T. Yoshimura (2018). "Identification of circadian clock modulators from existing drugs." *EMBO Mol Med* 10(5).
- Toh, K. L., C. R. Jones, Y. He, E. J. Eide, W. A. Hinz, D. M. Virshup, L. J. Ptacek and Y. H. Fu (2001). "An hPer2 phosphorylation site mutation in familial advanced sleep phase syndrome." *Science* 291(5506): 1040-1043.
- Van der Veen, D. R., J. Shao, Y. Xi, L. Li and G. E. Duffield (2012). "Cardiac atrial circadian rhythms in PER1YOT2::LUCIFERASE and per1:luc mice: amplitude and phase responses to glucocorticoid signaling and medium treatment." *PLoS One* 7(10): e47692.
- Vanselow, K., J. T. Vanselow, P. O. Westermarck, S. Reischl, B. Maier, T. Korte, A. Herrmann, H. Herzel, A. Schlosser and A. Kramer (2006). "Differential effects of PER2 phosphorylation: molecular basis for the human familial advanced sleep phase syndrome (FASPS)." *Genes Dev* 20(19): 2660-2672.
- Xu, Y., K. L. Toh, C. R. Jones, J. Y. Shin, Y. H. Fu and L. J. Ptacek (2007). "Modeling of a human circadian mutation yields insights into clock regulation by PER2." *Cell* 128(1): 59-70.
- Zheng, B., D. W. Larkin, U. Albrecht, Z. S. Sun, M. Sage, G. Eichele, C. C. Lee and A. Bradley (1999). "The mPer2 gene encodes a functional component of the mammalian circadian clock." *Nature* 400(6740): 169-173.
- Zielinska, K. A., L. Van Moortel, G. Opendakker, K. De Bosscher and P. E. Van den Steen (2016). "Endothelial Response to Glucocorticoids in Inflammatory Diseases." *Front Immunol* 7: 592.