

HT29 Hücre Hattında Sirkadiyen Ritme Bağlı Gen İfadesinin Kontrolünde Referans Gen Farklılığının Senkronizasyondaki Rolü

Beyza GÖNCÜ*¹, Dilek ÖZTÜRK ²

¹Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi
²Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmakoloji Anabilim Dalı

Geliş / Received: 06.02.2019, Kabul / Accepted: 09.10.2019

Öz

Sirkadiyen zamanlama sistemi, memeli organ ve hücrelerinde bulunan moleküler saatler aracılığı ile pek çok hayati fonksiyonu kontrol etmektedir. Son yıllarda yapılan çalışmalar ile sirkadiyen ritmin hastalıklardaki rolü daha iyi anlaşılmıştır. Bu kapsamda gerçekleştirilecek hücre kültürü çalışmalarında öncelikli olarak senkronizasyonun sağlanması ve kontrolü önem arz etmektedir. Sunduğumuz çalışmada besin aracılığı ile senkronize edilen HT-29 hücrelerinde, senkronizasyon saat geni olarak da bilinen *PER2* ve iki farklı referans gen ile kontrol edilmiştir. Amacımız senkronizasyon kontrolünde referans genlerin rolünü incelemektir. Bu amaçla; serum şokunu takiben HT-29 hücreleri T0 zamanından itibaren 6 farklı zamanda toplanarak RNA izole edilmiş ve *PER2*, *ACTB* ve *RPLP0* gen ekspresyonları gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) deneyi ile kantifiye edilmiştir. Sonuçlar Fourier transformasyon ve Lineer Cosinor analizleri ile değerlendirilmiştir. *ACTB* referans geni seçildiğinde Fourier transformasyon analizi ile 24 ve 30 saatlik periyotlar anlamlı değişim gösterirken, Lineer Cosinor analizi ile sadece 24 saatlik periyot süresi anlamlı değişim göstermiştir. *RPLP0* referans geni seçildiğinde her iki analiz ile de 18 saatlik periyot süresi anlamlılık göstermiştir. Bulguların gösterdiği gibi senkronizasyonun başlatılması ve kontrolünde referans gen ve analiz yöntemi gibi pek çok parametrenin birlikte değerlendirilmesi önem arz etmektedir. Yapılan çalışmanın bu alanda yapılacak *in vitro* çalışmalar için farkındalık yaratacağı düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: senkronizasyon, sirkadiyen ritim, HT29, *PER2*

The Role of Reference Gene Differences in Synchronization Control of Circadian Rhythm-Induced Gene Expression in the HT29 Cell Line

Abstract

Circadian timing system controls many important vital functions through molecular clocks in mammalian organs and cells. The role of circadian rhythm in diseases has been better understood in recent years. In cell culture studies to be carried out in this area, primarily important things are ensuring synchronization and its control. In this study, the synchronization was controlled by *PER2* clock gene and the two reference genes in nutrient-mediated synchronized HT-29 cells. Our aim is to investigate the role of reference genes in synchronization control. For this purpose, following serum shock HT-29 cells were harvested at 6 different times, RNA isolation was made and *PER2*, *ACTB*, and *RPLP0* gene expressions were quantified by real-time PCR (RT-PCR) assay. The results were evaluated with Fourier transformation and Linear Cosinor analysis. When the *ACTB* reference gene was selected, 24 and 30 hour periods showed a significant change by Fourier analysis and 24-hour period showed a significant change with Cosinor analysis. When the *RPLP0* reference gene was selected, the 18 hour cycle time was significant with both analyzes. As the findings show, it is important to evaluate several parameters such as reference gene and analysis method in the initiation and control of synchronization. It is thought that this study will create awareness for *in vitro* studies in this area.

Keywords: Synchronization, circadian rhythm, HT29, *PER2*

1. Giriş

Doku büyümesi, kan basıncının kontrolü, kalp atımı ve kan şekerinin düzenlenmesi gibi metabolik süreçler sirkadiyen ritim olarak adlandırılan biyolojik bir saat ile düzenlenmektedir. Memeli sirkadiyen sistemi, hipotalamusta bulunan ve merkezi osilatör olan Suprakiazmatik Çekirdek (SCN) aracılığıyla düzenlenir. Gün ışığına bağlı olarak SCN’de oluşan ritim, pek çok nöronal ve hormonal ritim aracılığı ile tüm hücrelerde bulunan periferik saatlerin senkronize olmasını sağlar. Periferik dokuların senkronizasyonu ise periferik saatler ile ilişkilidir. Aynı zamanda, SCN aracılı hormonların salınımları ile ilişkili olabildiği gibi besin alımı ve fiziksel aktivite gibi çevresel faktörlere de bağlıdır (Momma et al., 2017; Pardini, Kaeffer, Trubuil, Bourreille, & Galmiche, 2005; Reszka & Zienolddiny, 2018).

Senkronizasyon; bir diğer deyişle intrasellüler osilatör ritmin düzenlenmesi, farklı genler aracılığıyla meydana gelmektedir. Bugüne kadar bu genlerden 20’ye yakını tanımlanmıştır (Schibler et al., 2015). Senkronizasyonla ilişkili genler “saat genleri” olarak adlandırılır (Özbayer, 2011) ve komplike bir ağ aracılığıyla birbirinden bağımsız ve kendi kendine hareket eden, transkripsiyonel ve translasyonel geri bildirim döngüsüyle ritmi meydana getirirler (Reszka & Zienolddiny, 2018). Bu sistemin kontrolü üç ayrı otopregülatör: transkripsiyonel-translasyonel, pozitif ve negatif düzenleyici (*trans-* ve *cis-* elementleri dahil) elementler ile sağlanır.

Saat genlerinden *Periyot 2 (PER2)*, birçok memeli dokularında eksprese olarak yüksek amplitüt oluşturup ritim senkronizasyonunda görev alır. Birçok *in vitro* çalışmada, malign

hücrelerde *PER2* ekspresyon artışının artan apoptoz ve azalan hücre proliferasyonu ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Mteyrek, Filipki, Guettier, Okyar, & Levi, 2016).

Literatürde *in vitro* çalışmalarda hücre hatlarında sirkadiyen ritmin senkronizasyonunun başlatılması için farklı indükleyiciler kullanılmıştır. Bunlar; % 50 at/bovin serum (FBS) içeren medyum, deksametazon (Dex) (glukokortikoid reseptör agonisti), forskolin (Fsk), epidermal büyüme faktörü (EGF), iyonomin, 8-bromo-cAMP, fibroblast büyüme faktörü (bFGF), ET-1 (mitojen aktivasyon yolağında protein kinaz aktivatörü bir protein kinaz C), ve prostaglandin E’dir (PGE) (Izumo, Sato, Straume, & Johnson, 2006).

Bu çalışmada amacımız, HT29 (insan epitelyal kolorektal adenokarsinom) hücre hattında besin aracılı senkronizasyonun başlatılmasında iki farklı referans genin etkisinin incelenmesidir. Çalışmada, model olarak HT29 kolon kanser hücreleri seçilmiştir. Bunun nedeni kolon kanserinin dünyadaki en ölümcül üçüncü kanser tipi olmasıdır (Siegel et al., 2017). Besin aracılı (%50 FBS içeren kültür medyum) senkronizasyonun başlatılmasını takiben, sirkadiyen ritme bağlı genlerden *PER2* gen ekspresyonu, iki farklı referans gen olan β -aktin (*ACTB*), *RPLP0* kullanılarak değerlendirilmiştir.

2. Materyal ve Metot

Hücre Kültürü: Çalışmada, HT29 hücre hattı kullanıldı ve çalışmanın tamamı pasaj 17-25’e kadar olan sürede gerçekleştirildi. HT29 hücreleri için DMEM/F12 medyum (Gibco, ThermoFisher, Waltham, MA, USA) ve %10 FBS (Panbiotech, Aidenbach, Germany), %1 penisilin/streptomisin (Panbiotech, Aidenbach, Germany) 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, Aidenbach, Germany) kullanıldı.

Senkronizasyon: HT29 hücreleri 6-kuyulu plakalara %15-20 konflüent olacak şekilde kültüre edildi. Kültürün başlamasından 12 saat sonra 6-kuyulu plakalar iki ayrı grup olacak şekilde ayrıldı ve medyumları uzaklaştırıldı. Hücrelere %50 FBS içeren kültür medyumunu eklendi. İki saat süre ile FBS aracılı senkronizasyon şoku daha önce bildirildiği gibi uygulandı (Balsalobre, Damiola, & Schibler, 1998; Izumo et al., 2006). Senkronizasyon şok süresi tamamlandıktan sonra hücreler normal kültür medyum koşullarına alındı. Belirlenen zaman aralıklarında, ileri aşamalar için kültürden hücreler toplandı. HT29 hücreleri için belirlenen zaman aralıkları sırasıyla; serum şok sonlandırıldığı an 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 triplike olarak çalışıldı.

RNA izolasyonu: Gen ekspresyon analizleri için *High Pure RNA Isolation Kit* (Roche, Mannheim, Germany) kullanılarak total RNA'lar izole edildi. Deney düzeneğindeki kültürden elde edilen her hücre grubu tripsinize edilerek toplandı. 320 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 aktarılarak 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 50-70 µl elüsyon tamponu eklenerek, 8000 g'de +4°C'de 1 dakika santrifüj edilerek total RNA elüsyonu tamamlandı. Elde edilen RNA'nın miktarı ve saflığı ve miktarı NanoDrop (ThermoFisher, Waltham, MA, USA) cihazıyla spektrofotometrik olarak belirlendi.

cDNA Sentezi: İzole edilen total RNA'lardaki mRNA'ların RT-PZR (Revers Transkriptaz - Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile komplementer DNA'larının (cDNA) oluşturulması için uygun kit kullanılarak *thermal cycler* cihazı ile PZR'ları gerçekleştirildi. Bu amaçla *High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit* kullanıldı. cDNA sentezi için 10 µl total RNA kullanılarak cDNA reaksiyonu tamamlandı.

RT-PZR: Elde edilen cDNA'lardan hedef gen olan *PER2* mRNA seviyesindeki değişim oranları iki ayrı referans gen olan *ACTB* ve *RPLP0* ekspresyonu ile kıyaslanması sonrasında saptandı. Özgül olarak dizayn edilen primerler; *PER2*: ileri AAAT-CCGCTACCACCCCTTC, geri AAGGCAGCAAAGCTGACTCTC, *ACTB*: ileri CATG-TACGTTGCTATCCAGGC, geri CTCCTT-AATGTCACGCACGAT ve *RPLP0*: ileri AGCCCAGAACACTGGTCTC, geri ACTC-AGGATTTCAATGGTGCC. Tasarlanan

primerlerin erime sıcaklığı (T_m) 62,6°C olarak belirlenmiştir. RT-PZR işleminde; her bir örnek için 6 µl distile su, 1 µl ileri primer, 1 µl geri primer, 10 µl *SensiFAST SYBR Mix* (Bioline, Luckenwalde, Germany) eklenerek mikrosantrifüj tüpüne konuldu. Hazırlanan PZR karışımı homojen hale getirilmesi için kısa süreli vortekslendi. PZR karışımı, her bir örnek için *lightcycler* kapiller tüplere 18 µl olacak şekilde aktarıldı ve 2 µl cDNA örnekleri eklendi.

Termal döngü, 95°C'de 2 dakika 1 siklus ön denatürasyonun ardından toplam 40 siklusk 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. mRNA ekspresyon değerlerinin belirlenmesi için yapılan gerçek zamanlı PZR (RT-PZR) deneylerinde kullanılan örnekler ikili olarak çalışıldı. Elde edilen Ct değerlerinin ortalaması alındı. Genlerin değişim oranları $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (hedef gen / referans gen) yöntemi kullanılarak hesaplandı.

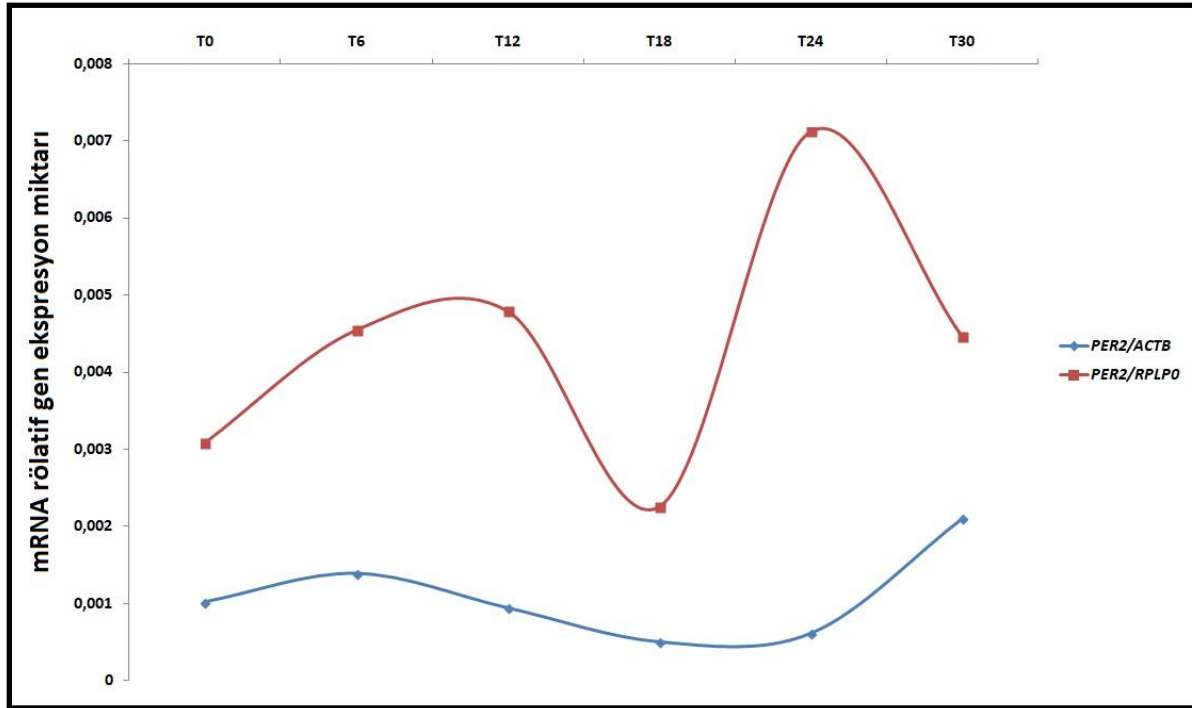
İstatistiksel Analiz: Ritme bağlı zaman aralıklarına ait one-way ANOVA analizi Prism 7.0 programı (GraphPad Software, Inc., CA, USA) kullanılarak yapıldı. Ritme bağlı değişimin sinüzoidal fonksiyonunun bir sirkadiyen ritmindeki anlamlılığı *Cosinor* algoritması (Cornelissen, 2014; Fourier, 1822; Nelson, Tong, Lee, & Halberg, 1979) kullanılarak *Fourier* transformasyon (SPSS, IBM Corp.) analizi ve *Linear 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≤0,05 olan değerler istatistiki olarak anlamlı kabul edildi.

3. Bulgular

FBS aracılı senkronizasyon şokun tamamlanması ile belirlenen zaman aralıklarında (6 saatte bir); T₀, T₆, T₁₂, T₁₈, T₂₄, T₃₀ sürelerinde, HT29 hücreleri kültürden toplanarak *PER2* genine ait mRNA ekspresyonlarındaki değişim belirlendi ve *ACTB* ile *RPLP0* ekspresyon değerleriyle kıyaslanarak değerlendirildi (Şekil 1).

One-way ANOVA testi zaman aralıklarındaki mRNA ekspresyonlarının, birbirleri arasındaki anlamlı değişiminin belirlenmesi için kullanılmıştır. mRNA rölatif gen ekspresyon değişimleri; T₀, T₁₈ ve T₃₀ zaman aralıkları için anlamlı farklılık göstermemiştir. Ancak T₆, T₁₂, T₂₄ zaman aralıklarında *PER2/ACTB* oranı *PER2/RPLP0* a göre anlamlı şekilde az bulunmuştur (sırasıyla p=0,0163 (T₆), p=0,0026 (T₁₂), p<0,0001 (T₂₄)). Çalışmada zaman serisine bağlı değişimin anlamlılığı *Fourier* transformasyon analizi ile yapıldı. Ek olarak, HT29 hücreleri için 30 saat bir periyot süresi olarak (Bairoch, 2018) kabul edildi. Fakat yapılan tüm analizlerde ilave olarak 18., 24. ve 30. saatlerdeki veriler, her analizin tekrarı için "Bir Periyot" süresi olarak kabul edilerek tamamlandı.



Şekil 1: *PER2* mRNA rölatif gen ekspresyonunun *ACTB* ve *RPLP0* referans genlerine bağlı senkronizasyon şoku sonrası belirlenen zaman aralıklarına göre değişimi.

Tablo 1’de *PER2/ACTB* ve *PER2/RPLP0*’a hesaplamalarda kullanılan “Bir Periyot” göre *Fourier* transformasyon analizinde elde edilen akrofaz, amplitüt ve p değerlerinin, süresince değişimi gösterilmektedir.

Tablo 1: *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* ve *RPLP0* referans genleri ile farklı “Periyot” sürelerine bağlı olarak yapılan *Fourier* transformasyon analiz sonuçları.

	Period Süresi (saat)	Akrofaz	Amplitüt	p değeri
<i>PER2/ACTB</i>	18	11,10262	0,00044	0,1779
	24	6,593487	0,00066	0,0127
	30	3,503404	0,00059	0,0358
<i>PER2/RPLP0</i>	18	7,890150	0,001846	0,0166
	24	4,285075	0,000958	0,4458
	30	25,82534	0,000502	0,8003

Referans gen olarak yalnızca *ACTB* verileri değerlendirildiğinde sirkadiyen ritim sırasıyla 24. ve 30. saatte “Bir Periyot” olarak tamamlanmaktadır (T24 p=0,0127, T30 p=0,0358). Referans gen olarak yalnızca *RPLP0* verileri değerlendirildiğinde ise sirkadiyen ritim yalnızca 18 saatte bir “Bir Periyot” olarak tamamlanmaktadır (T18

p=0,0166). *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* ve *RPLP0* referans genleri ile farklı “Periyot” sürelerine bağlı olarak yapılan Lineer *Cosinor* analiz sonuçları ise Tablo 2’de gösterilmektedir. Lineer *Cosinor* hesaplamalarında referans gen *ACTB* verilerine göre “Bir Periyot” 18 saat kabul edildiğinde *PER2/ACTB* güven aralığı,

zaman dilimi sınırlarının dışında kalmış ve akrofaz, amplitüt değerleri hesaplanamamıştır. Güven aralığı sınırlarında kalan ve referans gen olarak; *ACTB* verileri değerlendirildiğinde sirkadiyen ritim 24.

saatte ($p= 0,0005$) ve *RPLP0* verileri değerlendirildiğinde ise 18. saatte ($p<0,0001$) “Bir Periyot” süresini tamamladığı belirlenmiştir.

Tablo 2: *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* ve *RPLP0* referans genleri ile farklı “Periyot” sürelerine bağlı olarak yapılan Lineer *Cosinor* analiz sonuçları.

	Period Süresi (saat)	Akrofaz	Amplitüt	p değeri
<i>PER2/ACTB</i>	18	-	-	-
	24	0,00047	4,8617	0,0005
	30	0,00132	4,4615	0,2681
<i>PER2/RPLP0</i>	18	0,00148	4,5013	<0,0001
	24	0,00066	5,7821	0,8528
	30	0,00327	4,6252	0,1916

PER2 mRNA ekspresyonunun referans genler ile gösterilen rölatif mRNA ekspresyonunun; *Fourier* transformasyon ve Lineer *Cosinor* analiz sonuçlarıyla anlamlı bulunan referans gen *ACTB* için T24 ve *RPLP0* için T18 “Bir Periyot” ritmine ait, güven aralığının zaman diliminde gösterimi ise Şekil 2’de verilmiştir.

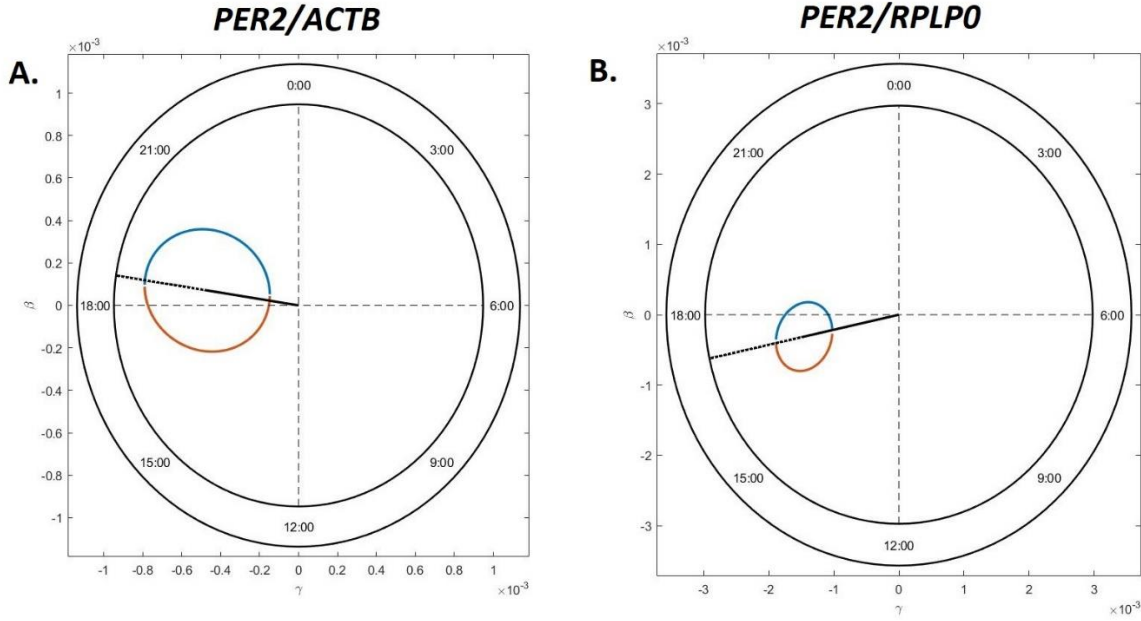
4. Sonuç

Sonuç ve Tartışma

Memeli doku ve organlarında her hücrenin belirli bir oranda ritmik gen ekspresyonuna sahip olduğu bilinmektedir Sirkadiyen zamanlama sistemi bu ritmik ekspresyonlar aracılığı ile uyku-uyanıklık, aktivite-dinlenme, vücut sıcaklığı, besin alımı, hormon salınımı, hücre siklusu, DNA onarımı ve apoptoz gibi fizyolojik ve biyokimyasal süreçleri etkilemektedir ve bu nedenle sirkadiyen ritmin senkronizasyonu tüm hücreler için hayati önem arz etmektedir (Levi, Okyar, Dulong, Innominato, & Clairambault, 2010; Schibler, 2005).

Senkronizasyonda görevli oto-regülatör elementler sırasıyla; *Morning-Time* (E-box), *Day-Time* (D-box) ve *Night-Time ROR elements* (RRE) olarak bilinir (Minami, Ode, & Ueda, 2013; Zhang, Dong, Fujimoto, & Okamura, 2004). *CLOCK* ve *BMAL* genleri (E-box transkripsiyon faktörleri-aktivatörleri) ve bu genlerin hedefi olan *Periyot* (*PER 1, 2, 3*), *Kriptokrom* (*CRY 1, 2*) genleri (E-box transkripsiyon faktörleri-inhibitörleri) ile “Saat” kontrol altındadır.

PER genlerinin ürünleri olan proteinler *BMAL* genlerinin transkripsiyonlarını ilerletmek için pozitif etki oluştururlar. *BMAL* ile *CLOCK* genlerinin heterodimerizasyonu ile senkronizasyon yeniden başlar (Reszka & Zienolddiny, 2018). Epidemiyolojik çalışmalar, sirkadiyen ritme ait düzenin bozulmasının prostat, meme, endometriyal ve kolorektal kanser tiplerinin gelişme riskini artırdığını göstermiştir (Reszka & Zienolddiny, 2018).



Şekil 2: “Bir Periyot” süresine ait güven aralığının zaman diliminde gösterimi. **A.** *PER2* mRNA ekspresyonunun *ACTB* referans genine bağlı olarak anlamlılığı belirlenen 24 saatte tamamlanan "Bir Periyot" süresinin güven aralığının zaman diliminde gösterimi. **B.** *PER2* mRNA ekspresyonunun *RPLP0* referans genine bağlı olarak anlamlılığı belirlenen 18 saatte tamamlanan "Bir Periyot" süresinin güven aralığının zaman diliminde gösterimi. Zaman dilimindeki daire çapı, güven aralığının anlamlılığı arttıkça küçülmektedir.

Kronik miyeloid lösemi (Yang et al., 2011), akut miyeloid lösemi (Puram et al., 2016), ailesel ve sporadik meme kanseri (Lesicka et al., 2018; Winter, Bosnoyan-Collins, Pinnaduwege, & Andrulis, 2007) ve kolon kanseri (Mazzoccoli, Vinciguerra, Papa, & Piepoli, 2014) gibi hastalıklarda sirkadiyen ritmin senkronizasyonunun bozulduğu gösterilmiştir. Kolon kanserinin etiolojisi, aşırı alkol tüketimi, sigara, düşük fiziksel aktivite, vücut kitle indeksindeki artış gibi birçok risk faktörü içermektedir; mortalite oranı yılda 700.000 kişidir (Brody, 2015). Türkiye'de ise bu oran her yüz bin kişi de 23,4'dür ("Türkiye Kanser İstatistikleri," 2015). Kolon kanseri üzerine son yıllarda yapılan çalışmalarla terapötik yaklaşımlar önem kazanmıştır (Dallmann, Okyar, & Levi, 2016; Ozturk, Ozturk, Kavakli, & Okyar, 2017). Bu kapsamda kemoterapi uygulamasının sirkadiyen ritme bağlı olarak günün farklı zamanlarında uygulanması ile

yapılan kronoterapi çalışmaları hız kazanmıştır (Pilanci et al., 2016).

Yapılan çalışmalarla "Saat Genleri"ne ait senkronizasyonun dokulara spesifik bir şekilde düzenlendiği gösterilmiştir. Literatürde, hem mRNA ekspresyon değişimlerinin hem de iki ayrı osilatör mekanizmanın bu ekspresyon değişimindeki etkinliğinin (SCN ve Periferik Sistem) dokular arasındaki farklılığı bildirilmiştir (Akashi & Takumi, 2005; Sato et al., 2004). Ayrıca, deney hayvanları ile gerçekleştirilen *in vivo* bir çalışmada *CLOCK-deficient* olan fare karaciğerinde *Periyot* mRNA ritminin stabil olduğu fakat SCN' deki ekspresyonunun kaybolduğu gösterilmiştir (Debruyne et al., 2006). Başka bir çalışmada, *PER1* ve *PER2* genlerinin beta-katenin yolağını ve hücre proliferasyonunu düzenlediği ve özellikle, kolon kanseri tümörleri ve diğer tümörlerin bir kısmında,

Periyot genlerinde mutasyon olduğu bildirilmiştir (Wood, Yang, & Hrushesky, 2009). *PER2* geninin sirkadiyen düzendeki etkinliği sayesinde malign transformasyonu baskıladığı Katamune ve arkadaşlarının yaptığı çalışma ile gösterilmiştir. Bu çalışmada, *PER2*-mutant embriyonik fibroblast hücrelerinde hem spontan hem de radyasyonla indüklenen tümör gelişimi ve rutin kemoterapötik ilaçlara da direnç geliştirdiği *in vivo* olarak gösterilmiştir (Katamune et al., 2018).

Bilindiği üzere sirkadiyen ritim hesaplamaları için matematiksel modeller kullanılmaktadır. Bunlar arasında; *Fourier* Transformasyon Analizi, *Rayleigh* Testi, *Enright* Periyotogram, *Lomb – Scargle* Periyotogram ve Lineer *Cosinor* testleri bulunmaktadır (Refinetti, Lissen, & Halberg, 2007). *Fourier* transformasyon analizi Joseph Fourier tarafından 1822'de gösterilmiştir (Fourier, 1822). Herhangi bir zaman serisinde, şekle veya düzenliliğe (*regularity*) bağlı olmaksızın, bir seride yer alan çeşitli frekanslardaki sinüs ve kosinüs dalgası olarak tanımlanmaktadır (Refinetti et al., 2007). Ayrıca tahmin edilen bir ritim zamanında, “bir Periyot”un kosinüs fonksiyonunun belirlenmesi için Lineer *Cosinor* kullanılmaktadır. Güven aralığına bağlı olarak optimum interpolasyonu tahmin etmeye yarayan, lineer olan ve olmayan *Cosinor* yöntemi 1963'de Marquardt tarafından gösterilmiştir (Marquardt, 1963).

Çalışmada, ritme bağlı değişimin anlamlılığı *Fourier* transformasyon ve Lineer *Cosinor* analizi ile değerlendirilmiştir. Hesaplamaların yapılabilmesi için ritmin senkronizasyonu 18, 24 ve 30 saatte tamamlandığı tahmin edilmiştir. Analizler sonucunda referans gen farklılığı net bir şekilde *PER2* mRNA ekspresyonuna bağlı

olarak “Bir Periyot” süresinin değişkenliğini ortaya koymuştur. *Fourier* transformasyon analizinde *ACTB* referans geni seçildiğinde “Bir Periyot” 24. veya 30. saatler seçilerek anlamlı kabul edilebilirken, *RPLP0* açısından yalnızca 18 saat anlamlı bulunmuştur. Diğer yandan Lineer *Cosinor* analizi'ne göre *ACTB* referans geni için yalnızca 24. saat ve *RPLP0* referans geni açısından 18. saat “Bir Periyot” süresini tamamladığı gösterilmiştir. Ek olarak, HT29 hücrelerinde senkronizasyonun başlatılması için kullanılan FBS'nin kimyasal bir aracı gerektirmeden sirkadiyen ritmin indüksiyonu için yeterli olduğu gözlenmiştir.

Sonuç olarak, *PER2* genine ait mRNA ekspresyonundaki değişim iki ayrı matematiksel hesaplama ile anlamlı bulunan ve iki ayrı referans gen olan *ACTB* ve *RPLP0* ile değerlendirildiğinde HT29 hücrelerinin sırasıyla 24 ve 18 saatte bir senkronizasyonu (“Bir Periyot”) gerçekleştirdiği gösterilmiştir. Bu veriler; matematiksel modellerin ve referans genlere bağlı olarak “Bir Periyot” süresinin değişiminin, ilerleyen çalışmalar için daha belirleyici parametrelerin gerektiğine işaret etmektedir. Referans gen'e bağlı olarak ritim süresindeki anlamlılığın diğer “Saat Genleri” ile beraber değerlendirilmesinin gerekliliği unutulmamalıdır.

Öneriler

In vitro çalışmaların tek tip hücre hatlarında gerçekleştirilmesi, genlerin fonksiyonel durumlarının belirlenmesi için uygulamada kolaylık sağlamaktadır ancak, sirkadiyen ritmin iki osilatör mekanizmadaki etkilerinin iyi anlaşılması ve terapötik yaklaşımların geliştirilebilmesi için *in vivo* olarak senkronizasyonun modellenmesi eş zamanlı olarak matematiksel analizlerin de geliştirilmesi önem taşımaktadır.

Teşekkür: Çalışmada kullanılan HT29 hücre hattının teminindeki yardımları için Dr. Belma Zengin'e (Bezmialem Vakıf Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Farmasötik Kimya Anabilim Dalı) teşekkür ederiz. Çalışmanın matematiksel modellerdeki yönlendirmeleri için Sadullah Göncü'ye (Fatih Sultan Mehmet Vakıf Üniversitesi, Mühendislik Fakültesi, İnşaat Mühendisliği Bölümü) teşekkür ederiz.

Çıkar Çatışması Beyanı: Yazarlar çıkar çatışması olmadığını bildirmişlerdir.

5. Kaynaklar:

- Akashi, M., & Takumi, T. (2005). The orphan nuclear receptor RORalpha regulates circadian transcription of the mammalian core-clock Bmal1. *Nat Struct Mol Biol*, 12(5), 441-448. doi:10.1038/nsmb925
- Bairoch, A. (2018). The Cellosaurus, a Cell-Line Knowledge Resource. *J Biomol Tech*, 29(2), 25-38. doi:10.7171/jbt.18-2902-002
- Balsalobre, A., Damiola, F., & Schibler, U. (1998). A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. *Cell*, 93(6), 929-937.
- Brody, H. (2015). Colorectal cancer. *Nature*, 521(7551), S1. doi:10.1038/521S1a
- Cornelissen, G. (2014). Cosinor-based rhythmometry. *Theor Biol Med Model*, 11, 16. doi:10.1186/1742-4682-11-16
- Dallmann, R., Okyar, A., & Levi, F. (2016). Dosing-Time Makes the Poison: Circadian Regulation and Pharmacotherapy. *Trends Mol Med*, 22(5), 430-445. doi:10.1016/j.molmed.2016.03.004
- Debruyne, J. P., Noton, E., Lambert, C. M., Maywood, E. S., Weaver, D. R., & Reppert, S. M. (2006). A clock shock: mouse CLOCK is not required for circadian oscillator function. *Neuron*, 50(3), 465-477. doi:10.1016/j.neuron.2006.03.041
- Fourier, J. (1822). *Théorie Analytique de la Chaleur*. Paris, France.
- Izumo, M., Sato, T. R., Straume, M., & Johnson, C. H. (2006). Quantitative analyses of circadian gene expression in mammalian cell cultures. *PLoS Comput Biol*, 2(10), e136. doi:10.1371/journal.pcbi.0020136
- Katamune, C., Koyanagi, S., Hashikawa, K. I., Kusunose, N., Akamine, T., Matsunaga, N., & Ohdo, S. (2018). Mutation of the gene encoding the circadian clock component PERIOD2 in oncogenic cells confers chemoresistance by up-regulating the Aldh3a1 gene. *J Biol Chem*. doi:10.1074/jbc.RA118.004942
- Lesicka, M., Jablonska, E., Wieczorek, E., Seroczynska, B., Siekierzycka, A., Skokowski, J., . . . Reszka, E. (2018). Altered circadian genes expression in breast cancer tissue according to the clinical characteristics. *PLoS One*, 13(6), e0199622. doi:10.1371/journal.pone.0199622
- Levi, F., Okyar, A., Dulong, S., Innominato, P. F., & Clairambault, J. (2010). Circadian timing in cancer treatments. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 50, 377-421. doi:10.1146/annurev.pharmtox.48.113006.094626
- 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. doi:https://doi.org/10.1137/0111030
- Mazzocchi, G., Vinciguerra, M., Papa, G., & Piepoli, A. (2014). Circadian clock circuitry in colorectal cancer. *World J Gastroenterol*, 20(15), 4197-4207. doi:10.3748/wjg.v20.i15.4197
- Minami, Y., Ode, K. L., & Ueda, H. R. (2013). Mammalian circadian clock: the roles of transcriptional repression and delay. *Handb Exp Pharmacol*(217), 359-377. doi:10.1007/978-3-642-25950-0_15
- Momma, T., Okayama, H., Saitou, M., Sugeno, H., Yoshimoto, N., Takebayashi, Y., . . . Takenoshita, S. (2017). Expression of circadian clock genes in human colorectal

- adenoma and carcinoma. *Oncol Lett*, 14(5), 5319-5325. doi:10.3892/ol.2017.6876
- Mteyrek, A., Filipski, E., Guettier, C., Okyar, A., & Levi, F. (2016). Clock gene Per2 as a controller of liver carcinogenesis. *Oncotarget*, 7(52), 85832-85847. doi:10.18632/oncotarget.11037
- Nelson, W., Tong, Y. L., Lee, J. K., & Halberg, F. (1979). Methods for cosinor-rhythmometry. *Chronobiologia*, 6(4), 305-323.
- Ozturk, N., Ozturk, D., Kavakli, I. H., & Okyar, A. (2017). Molecular Aspects of Circadian Pharmacology and Relevance for Cancer Chronotherapy. *Int J Mol Sci*, 18(10). doi:10.3390/ijms18102168
- Özbayer, C. (2011). Circadian clock, cell cycle and cancer. *Dicle Medical Journal / Dicle tıp Dergisi*, 38(4), 514-518. doi:10.5798/diclemedj.0921.2011.04.0080
- Pardini, L., Kaeffer, B., Trubuil, A., Bourreille, A., & Galmiche, J. P. (2005). Human intestinal circadian clock: expression of clock genes in colonocytes lining the crypt. *Chronobiol Int*, 22(6), 951-961. doi:10.1080/07420520500395011
- Pilanci, K. N., Saglam, S., Okyar, A., Yucel, S., Pala-Kara, Z., Ordu, C., . . . Kaytan-Saglam, E. (2016). Chronomodulated oxaliplatin plus Capecitabine (XELOX) as a first line chemotherapy in metastatic colorectal cancer: A Phase II Brunch regimen study. *Cancer Chemother Pharmacol*, 78(1), 143-150. doi:10.1007/s00280-016-3067-x
- Puram, R. V., Kowalczyk, M. S., de Boer, C. G., Schneider, R. K., Miller, P. G., McConkey, M., . . . Ebert, B. L. (2016). Core Circadian Clock Genes Regulate Leukemia Stem Cells in AML. *Cell*, 165(2), 303-316. doi:10.1016/j.cell.2016.03.015
- Refinetti, R., Lissen, G. C., & Halberg, F. (2007). Procedures for numerical analysis of circadian rhythms. *Biol Rhythm Res*, 38(4), 275-325. doi:10.1080/09291010600903692
- Reszka, E., & Zienolddiny, S. (2018). Epigenetic Basis of Circadian Rhythm Disruption in Cancer. *Methods Mol Biol*, 1856, 173-201. doi:10.1007/978-1-4939-8751-1_10
- Sato, T. K., Panda, S., Miraglia, L. J., Reyes, T. M., Rudic, R. D., McNamara, P., . . . Hogenesch, J. B. (2004). A functional genomics strategy reveals Rora as a component of the mammalian circadian clock. *Neuron*, 43(4), 527-537. doi:10.1016/j.neuron.2004.07.018
- 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. doi:10.1038/sj.embor.7400424
- Schibler, U., Gotic, I., Saini, C., Gos, P., Curie, T., Emmenegger, Y., . . . Franken, P. (2015). Clock-Talk: Interactions between Central and Peripheral Circadian Oscillators in Mammals. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 80, 223-232. doi:10.1101/sqb.2015.80.027490
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fedewa, S. A., Ahnen, D. J., Meester, R. G. S., Barzi, A., & Jemal, A. (2017). Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*, 67(3), 177-193. doi:10.3322/caac.21395
- Türkiye Kanser İstatistikleri. (2015).
- Winter, S. L., Bosnoyan-Collins, L., Pinnaduwege, D., & Andrulis, I. L. (2007). Expression of the circadian clock genes Per1 and Per2 in sporadic and familial breast tumors. *Neoplasia*, 9(10), 797-800.
- Wood, P. A., Yang, X., & Hrushesky, W. J. (2009). Clock genes and cancer. *Integr Cancer Ther*, 8(4), 303-308. doi:10.1177/1534735409355292
- Yang, M. Y., Yang, W. C., Lin, P. M., Hsu, J. F., Hsiao, H. H., Liu, Y. C., . . . Lin, S. F. (2011). Altered expression of circadian clock genes in human chronic myeloid leukemia. *J Biol Rhythms*, 26(2), 136-148. doi:10.1177/0748730410395527

Zhang, J., Dong, X., Fujimoto, Y., & Okamura, H. (2004). Molecular signals of Mammalian circadian clock. *Kobe J Med Sci*, 50(3-4), 101-109.