

Atf İçin: Kankılıç, T., Civelek, İ. ve Köse, B. 2024. *Nannospalax* Kemirgenlerinde *MTNRIA* Genetik Varyasyonlarının Karakterizasyonu. *İğdır Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Dergisi*, 15(1), 353-363.

To Cite: Kankılıç, T., Civelek, İ. & Köse, B. 2024. Characterization of *MTNRIA* Genetic Variations in *Nannospalax* Rodents. *Journal of the Institute of Science and Technology*, 15(1), 353-363.

***Nannospalax* Kemirgenlerinde *MTNRIA* Genetik Varyasyonlarının Karakterizasyonu**

Teoman KANKILIÇ¹, İlkay CİVELEK^{1*}, Burcu KÖSE¹

Öne Çıkanlar:

- *Nannospalax*
- Varyasyon
- Sirkadiyen ritim

Anahtar Kelimeler:

- *Nannospalax*
- Körfare
- Varyasyon
- *MTNRIA*
- Melatonin

ÖZET:

Nannospalax cinsi üyesi körfareler toprakaltı ekolojik nişinde yaşamını sürdüren, düşük oksijenli ortama uyum sağlamış kemirgenlerdir. Olağanüstü uzun ömürleri ve hem spontan hem de indüklenmiş tümör oluşumuna karşı dirençleri ile karakterize edilen kemirgenlerdir. Bu kemirgenlerin kansere olan direncinin sebebi bilinmemekle beraber, yüzyıllardır yaşadıkları toprak altı nişinde sirkadiyen ritim veya bu yolla görev alan genlerle ilişkili olacak şekilde bir kanser mekanizması geliştirebildikleri varsayılmaktadır. Bu çalışmada körfarelerde sirkadiyen ritimde ve melatonin yolağında görev alan *MTNRIA* genindeki varyasyonların varlığı ve tespit edilen varyasyonların veritabanındaki diğer türlere (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Heterocephalus glaber*, *Rattus norvegicus*) ait dizilerle karşılaştırılması amaçlanmıştır. Bu amaçla, Türkiye’de dağılım gösteren dört *Nannospalax* türüne ait (*Nannospalax xanthodon*, *Nannospalax ehrenbergi*, *Nannospalax leucodon* ve *Nannospalax tuncelicus*) 9 farklı sitotip içeren toplam 18 adet örneğe ait dokulardan elde edilen DNA örneklerinin PCR analizi gerçekleştirilerek bu ürünler sekanslanmıştır. Sekans sonuçları ile referans genom (*Nannospalax galili*) karşılaştırılarak ilgili DNA baz farklılıkları tespit edilmiştir. Tespit edilen baz farklılıkları referans dizi ve diğer türlere ait amino asit dizileri ile karşılaştırılarak var olan/olması muhtemel varyasyonlar belirlenmiştir. Buna göre DNA dizilerindeki tek nükleotid değişimlerinden yalnızca biri amino asit dizisinde değişikliğe sebep olmuş; insanda 10. amino asite denk gelen p.N10Q (p.Asp10Glu) varyasyonu, Polyphen-2 veritabanında yaklaşık 0.5 skoru ile değerlendirilmiş ve mevcut değişimin muhtemel zararlı/patojenik etkileri olabileceği sonucuna varılmıştır.

Characterization of *MTNRIA* Genetic Variations in *Nannospalax* Rodents

Highlights:

- *Nannospalax*
- Variation
- Circadian rhythm

Keywords:

- *Nannospalax*
- Blind Mole Rat
- Variation
- *MTNRIA*
- Melatonin

ABSTRACT:

Members of the genus *Nannospalax*, commonly known as blind mole rats, are subterranean rodents adapted to low-oxygen environments. These rodents are characterized by their extraordinarily long lifespans and resistance to both spontaneous and induced tumor formation. Although the cause of their cancer resistance is unknown, it is hypothesized that, over centuries of living in their underground niche, these rodents may have developed a cancer resistance mechanism related to circadian rhythms or genes involved in these pathways. This study aims to identify variations in the *MTNRIA* gene, which is involved in circadian rhythm and melatonin pathway in blind mole rats, and to compare the detected variations with sequences from other species (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Heterocephalus glaber*, *Rattus norvegicus*) in databases. For this purpose, PCR analysis of DNA samples obtained from tissues of 18 specimens representing nine different cytotypes belonging four *Nannospalax* species distributed in Turkey (*Nannospalax xanthodon*, *Nannospalax ehrenbergi*, *Nannospalax leucodon*, and *Nannospalax tuncelicus*) was performed and these products were sequenced. The relevant DNA base differences were identified by comparing the sequencing results with the reference genome (*Nannospalax galili*). The detected base differences were compared with the amino acid sequences of the reference and other species to identify existing or potential variations. Accordingly, only one of the single nucleotide changes in the DNA sequences resulted in an amino acid sequence change. It was concluded that the variation p.N10Q (p.Asp10Glu), corresponding to the 10th amino acid in humans, has been evaluated in the Polyphen-2 database, yielding a score of approximately 0.5, suggesting that this change may have potentially harmful/pathogenic effects.

¹Teoman KANKILIÇ (Orcid ID: 0000-0002-9576-5887), İlkay CİVELEK (Orcid ID: 0000-0002-8241-1596), Burcu KÖSE (Orcid ID: 0000-0003-1068-0196), Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoteknoloji Bölümü, Niğde, Türkiye

*Sorumlu Yazar/Corresponding Author: İlkay CİVELEK, e-mail: ilkaycivelekk@gmail.com

Etik Kurul Onayı / Ethics Committee Approval: Etik kurul kararı, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi hayvan deneyleri yerel etik kurul kararlarının 10.11.2023 tarihli toplantısında, E-86837521-050.99-437911 (Kimlik/Dosya No); 05 sayılı toplantısının 2023/12 sayılı kararı ile çıkmıştır.

GİRİŞ

Körfareler yer altına uyum sağlamış memeli kemirgenlerdir. Dış kulakları bulunmaz ve körelmiş bir kuyruğa sahip silindirik gövdeli hayvanlardır. Yaşamlarının tümünü yer altında kendi kazdıkları yer altı tünellerinde geçirirler (Németh ve ark., 2016; Nevo, 2022; Topachevskii, 1969). Aşırı hipoksik koşullar altında yaşayan körfareler güçlü hipoksik tolerans geliştirmiştir ve boyutlarına göre çok uzun ömürlüdür. Hayvan tesislerinde tutulan bu hayvanlar için maksimum yaşam süresinin 21 yıl olduğu belgelenmiştir. Buna karşılık, aynı üst familyaya ait fare ve sıçanların maksimum yaşam süresi 4 yıldır. Uzun ömürlerinin yanı sıra körfareler kansere karşı çarpıcı bir direnç göstermektedir. Binlerce hayvan üzerinde yapılan gözlemlerde, 40 yıllık bir süre boyunca tek bir spontane tümör gelişimi vakasına rastlanmamıştır (Flesher ve ark., 1998; Manov ve ark., 2013). Öte yandan, kanser insan ölümlerinin %23' ünü oluştururken, bu oran fare ve sıçanlarda çok yüksek olup bazı türlerde %90' a kadar ulaşmaktadır (Gorbunova ve ark., 2012).

Körfarelerin gözlerindeki ciddi dejenerasyona rağmen retinohipotalamik sistemleri korunmuştur ve bu sayede de sirkadiyen ritimleri çevresel aydınlık/karanlık döngüsüne göre ayarlayabilmektedirler (Hannibal ve ark., 2002). Bu kemirgenler, yeraltında yaşadıkları için genellikle ışıkla nadir karşılaşır. Bu nedenle, körfarelerin sirkadiyen ritimlerini sürdürmeleri, çevresel ışık döngülerine dayanmak yerine içsel faktörlere dayanarak gerçekleşir. Özellikle, vücut sıcaklığı bu kemirgenlerin iç saatlerini düzenlemede kritik bir öneme sahiptir. Körfarelerin bu adaptasyonu, yeraltında yaşarken dış dünyanın güneş ışığına daha az maruz kaldıkları bir yaşam tarzını sürdürebilmelerine yardımcı olur (David-Gray ve ark., 1999; Hannibal ve ark., 2002).

Sirkadiyen ritimler, canlı organizmaların biyolojik saatlerini düzenleyen temel süreçlerdir. Bu ritimler, ışık ve karanlık döngülerine bağlı olarak çeşitli biyokimyasal ve fizyolojik süreçlerin düzenlenmesine yardımcı olur ve vücudumuzun günlük aktivitelerini senkronize eder. Bu süreçler arasında uyku-uyanıklık döngüsü, metabolizma, hormon üretimi, bağışıklık sistemi fonksiyonları ve hücre çoğalması yer alır (Steele ve ark., 2021). Bu ritimler birçok canlı organizmada evrimsel olarak korunmuşlardır. Sirkadiyen ve mevsimsel ritim, uzun vadeli fizyolojik adaptasyonları ortaya çıkaran gen ifadesindeki değişikliklerle aracılık edilen birçok hormonun etkisini tanımlar. Hayvanların zamansal uyumları onların içsel fizyolojik saat sistemine dayanır. Günlük olarak ışık ve diğer uyarıcılar, bu saati sürekli olarak ayarlar ve çevreyle uyumlu hale getirir. Saatin etkileri daha sonra fizyolojinin çeşitli alanlarını düzenler. Bu saatin ana işlevlerinden biri, geceleri melatonin hormonunun salgılanmasıdır. Omurgalılarda bu hormon, epifiz bezi tarafından üretilir (Foulkes ve ark., 1997).

Epifiz bezi, melatonin sentezinin ana bölgesi olarak kabul edilirken, retina, Harderian bezi, gastrointestinal sistem, yumurtalık, deri, bağışıklık sistemi ve bazı serebral yapılar gibi diğer dokular da melatonin üretme kapasitesine sahiptir (Jimenes-Jorge ve ark., 2007). Memelilerde melatonin yaklaşık 24 saatlik bir salınımına sahiptir. Çalışmalarda serum melatonin düzeylerinin geceleri yüksek (80-120 pg/mL) ve gündüzleri düşük (2-20 pg/mL) olduğu tespit edilmiştir (Jung-Hynes ve ark., 2010). Melatonin dolaşımının zirvesi gece karanlıkta gerçekleşir ve uyku döngüsü, pubertal gelişim ve nöroendokrin aktivite dahil olmak üzere sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinden sorumludur. Endojen bir hormon olan melatonin, kanserde koruyucu bir role sahiptir. Örneğin melatonin, radyoterapi ve kemoterapinin neden olduğu hasarlara karşı beyin, kalp, böbrek, karaciğer ve bağırsak gibi birçok organ üzerinde koruyucu etkiye sahip olabilir. Bu koruma, melatoninin anti-inflamatuar, antioksidan, anti-apoptotik ve bağışıklık düzenleyici etkileri aracılığıyla gerçekleşmektedir. Ayrıca, melatonin, hücrelerin savunma sistemini güçlendirerek, radyasyon ve kemoterapinin yan etkilerini hafifletme potansiyeli de taşımaktadır (Dehdari ve ark., 2023; Ma ve ark., 2020; Najafi ve ark., 2017). Melatonin

sirkadiyen ritimleri, uykuyu ve nöroendokrin aktiviteyi düzenlemenin yanı sıra (Zhang ve ark., 2021), Bcl-xL, JNK1/2, ERK1/2, Raf-1, MEK1/2 ve NF-κB gibi çeşitli hayatta kalma yollarında da işlev görmektedir (Wang, 2009).

Işığa maruz kalmanın melatonin düzeyini azalttığı ve dolayısıyla da düşük melatonin düzeylerinin meme, endometriyum, kolon, prostat, Hodgkin olmayan lenfoma da dahil olmak üzere çeşitli kanserlerin artmasıyla bağlantı olduğu düşünülmektedir (Jung-Hynes ve ark., 2010). Öte yandan, melatonin hormonunun sirkadiyen salınımı, melatonin 1 ve 2 reseptörlerinin (MT1 ve MT2) aktivasyonu yoluyla uykuyu ve sirkadiyen fazı düzenlemek için suprakiazmatik çekirdek (SCN) tarafından düzenlenir (Dubocovich, 2007).

Melatoninin fizyolojik etkilerine temel olarak iki tip melatonin reseptörü aracılık eder: MT1/Mel1a ve MT2/Mel1b (sırasıyla *MTNR1A* ve *MTNR1B* olarak adlandırılan genler). Melatonin reseptörleri MT1 ve MT2, mevsimsel olarak üreyen hayvanlarda sirkadiyen ritimlerin, bağışıklık sisteminin ve üremenin melatonin aracılı düzenlenmesinde önemli roller oynar (Gao ve ark., 2019). Sirkadiyen genler veya melatonin yolağı genleriyle ilişkili genetik polimorfizmler, sirkadiyen bozulma ve gen ekspresyonu değişiklikleriyle olan ilişkileri nedeniyle artan hastalık riskine aday olarak kabul edilmiştir. Saat genlerindeki herhangi bir bozulma onların ifadesini değiştirir ve böylece meme kanseri riskini artırabilir. Ayrıca, melatonin yolağı genleriyle ilişkili meme kanseri görülme sıklığının artmasının, melatoninin, *MTNR1A* ve *MTNR1B* genleri tarafından kodlanan melatonin reseptörleri olan MT1 ve MT2'ye bağlanması ve aktivasyonundan kaynaklandığı ve insan meme kanserinde anti-onkostatik etkileri tetiklediği düşünülmektedir (Pham ve ark., 2019).

Körfareler, sirkadiyen ritimlerin evrimsel olarak nasıl geliştiğini ve çevresel zorluklara nasıl uyum sağladığını anlamamıza yardımcı olan önemli bir model organizmadır. Bu kemirgenler, iç saatlerini çevresel faktörlerden daha bağımsız bir şekilde sürdürebilme yetenekleri ile sirkadiyen ritimlerin temel mekanizmalarını araştırmamıza yardımcı olur (David-Gray ve ark., 1999; Hannibal ve ark., 2002). Ayrıca körfarelerin sirkadiyen ritimlerinin altında yatan temel genetik mekanizmanın multifazik, polimorfik ve mevsimsel biyolojik sirkadiyen düzenlerden yoksun olan insanlar ve fareler gibi gündüz veya gece yaşayan ve gören memelilerden farklı olabileceği fikri öne sürülmüştür (Avivi ve ark., 2001). Işık karanlık döngülerine bağlı olarak değişen melatonin seviyeleri bilindiği gibi canlıların kansere yakalanma oranını etkilemektedir. Bu açıdan yaşamının tamamını ışısız bir ortamda geçiren körfarelerin sirkadiyen ritimlerinin temel prensiplerini anlamamız önemlidir. Benzersiz mekanizmaları sayesinde körfareler, kansere dirençliliklerinin sahip oldukları sirkadiyen ritimle ilişkisini araştırmak için önemli bir araştırma modeli olmuştur. En önemlisi bu tür araştırmalar kanser araştırmalarında ve bu araştırmaların geliştirilerek insanlara uyarlanmasında yardımcı olabilir. Bu çalışmadaki Türkiye'de farklı filocoğrafik bölgelerde dağılıma sahip dört körfare türünde melatonin yolağında görev alan *MTNR1A* genindeki varyasyonların varlığı araştırılması ve tespit edilen varyasyonların diğer türlerle karşılaştırılarak var olan varyasyonun herhangi bir patojenik etkiye sahip olup olmadığının ortaya çıkarılması hedeflenmiştir.

MATERYAL VE METOT

Çalışmada Kullanılan Körfare Sitotipleri ve Bölgesel Dağılımları

Türkiye'de dağılım gösteren üç farklı körfare türüne ait toplam 9 sitotipten oluşan; *N. xanthodon* için 2n = 54, 56, 58 (n=6); *N. ehrenbergi* için 2n = 48, 52, 53, 56 (n=8); *N. leucodon* için 2n = 56 (n=2) ve *N. tuncelicus* için 2n = 54 (n=2)) toplam 18 adet birey ile çalışılmıştır. Birey sayısı kromozomal formlarına ve bu farklılaşmaya neden olduğu düşünülen coğrafi sınırlara (farklı bölgelerden) göre belirlenmiş ve her sitotipi temsilen bir erkek ve bir dişi ile çalışılması kararlaştırılmıştır. Çalışmada

kullanılan dokular, daha önce çalışılan projelerimiz için yakalanan ve -80 °C' de muhafaza edilen körfare örneklerinden alınmıştır.

DNA İzolasyonu ve PCR Reaksiyonu

Dokulardan DNA izolasyonu CTAB (Setil trimetil amonyum bromür) metodu (Doyle, 1991) kullanılarak gerçekleştirilmiştir ve izole edilen DNA'lar kullanılabilecek şekilde -80 °C'de saklanmıştır. İzole DNA örneklerinin konsantrasyonları Nanodrop cihazında A260/280 dalga boylarında ölçülerek DNA'nın saflığı kontrol edilmiştir ve 1.7-1.9 µg/mL arası konsantrasyona sahip olan örnekler çalışmada kullanılmıştır. Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0>) veritabanı, primer çiftinin (ileri primer 5'-GAGCCATAAAAAGTGAC-3' ve geri primer 5'-GATGAGCAGGCTAAAGAA-3') tasarlanmasında kullanılmıştır ve tasarlanan aday primerlerin BLAST veritabanı (Basic Local Alignment Search Tool veritabanı, 2024) kullanılarak non-spesifik bağlanma olup olmadığı kontrol edilmiştir. Elde edilen PCR ürünleri %1'lik agaroz jel elektroforezinde yürütülerek görüntülenmiş ve istenilen bölgelerin bant profilleri marker ile karşılaştırılarak doğrulanmıştır. Ayrıca, *N. galili* referans türüne ait *MTNR1A* geninin kromozom lokasyonu, NCBI veritabanında NW_008355790.1 olarak belirlenmiş olup, genin pozisyonu 3987656 ile 4030636 arasında yer almaktadır (NCBI Genom Veritabanı, 2024).

DNA Dizi Analizi

Seçilen PCR ürünleri DNA dizi analizi için özel bir firma tarafından sekanslanmıştır (BM Laboratuvar Sistemleri, Türkiye). DNA Dizi analizinden elde edilen ham veriler, her bir birey için ayrı ayrı BioEdit (ver. 7.0.5.3) (Hall, 1999) yazılım programı ile kontrol edilmiş ve düzenlenmiştir. Ensembl genom veritabanı (www.ensembl.org) kullanılarak, veritabanındaki Orta Doğu körfaresi veya Filistin körfaresi (*N. galili*, Upper Galilee mountains blind mole rat) ait *MTNR1A* DNA dizileri (Kaynak: NCBI gene; Acc: 103750495) referans alınarak karşılaştırılmıştır. Ayrıca çalışmada kullanılan *Nannospalax* örneklerindeki amino asit varyasyonları, *H.sapiens*, *M. musculus*, *R. norvegicus* ve *H. glaber*'e ait kodonlardaki amino asit karşılıkları ile Ensembl veritabanından faydalanılarak karşılaştırılmış ve bu türlerdeki varyasyon varlığı araştırılmıştır.

İnsanda tespit edilen varyantların hastalık oluşturu, patojenik özelliğinin olup olmadığını belirlemek amacı ile kullanılan PolyPhen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) yazılım programı, yapısal ve karşılaştırmalı evrimsel değerlendirmeleri kullanarak amino asit ikamelerinin insan proteinlerinin stabilitesi ve işlevi üzerindeki olası etkisini tahmin eder. Her amino asit ikamesi için hem nitel bir tahmin ("probably damaging-muhtemelen zarar verici", "possibly damaging-muhtemelen zarar verici", "benign-iyi huylu" veya "unknown-bilinmeyen") hem de bir olasılık skoru elde edilir. Elde edilen PolyPhen-2 puanı, bu amino asit değişiminin zarar verme olasılığını temsil eder, bu nedenle 1 skoruna yakın değerlerin zararlı olduğu tahmin edilir (Adzhubei ve ark., 2013). Bu çalışmada da tespit edilen olası varyant/ların insandaki karşılıkları değerlendirilerek Polyphen-2 değerleri belirlenmiştir.

BULGULAR VE TARTIŞMA

BLAST veritabanındaki XM_008853606.1 erişim numaralı *N. galili* türü ile eşleşen toplam 18 örnekten 9 tanesi *N. galili* türü ile %100 benzerliğe sahipken, 8 örnek 3 baz farkla %94,45 oranında ve 1 örnek de 2 baz farkla %98,70 oranında benzerlik göstermiştir (Basic Local Alignment Search Tool veritabanı, 2024). Farklı türler arasındaki amino asit korunumunun değerlendirilmesi için, ilgili genlere ait protein dizileri Ensembl veritabanından (www.ensembl.org) temin edilmiştir. DNA dizilerinde tespit edilen baz değişimlerinin tümü tek nükleotid değişimleri olup bunlardan yalnızca bir tanesi

kodonda amino asit değişikliğine sebep olmuştur. Buna göre Çizelge 1’de belirtilen örneklerde tespit edilen varyasyonlar p.Q13* (CAA>CAG), p.R25* (CGG>CGC) ve p.S27T (TCG>ACG) Serin>Treonin şeklindedir.

Çizelge 1. Çalışılan örnekler için tür, sitotip, lokalite bilgileri ile BLAST taraması sonucunda veritabanında yer alan *N. galili* türüne ait *MTNR1A* gen dizisi ile benzerlik yüzdeleri ve baz farkı sayıları

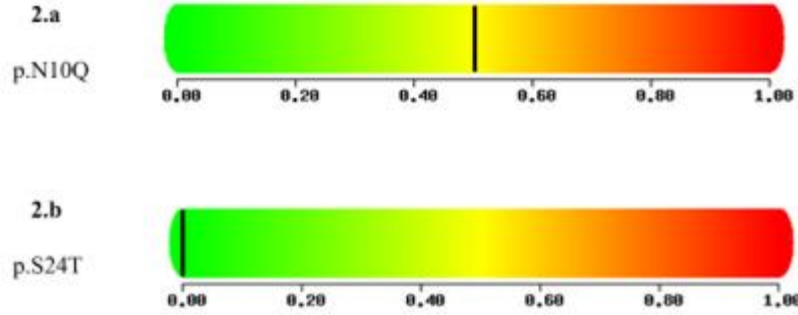
No	Tür	Örnek No	Lokalite	Sitotip	BLAST Benzerlik (%)	Baz farkı
1	<i>N. ehrenbergi</i>	41	Hatay, Şenköy	2n=48	100	YOK
2	<i>N. ehrenbergi</i>	51	Hatay, Şenköy	2n=48	100	YOK
3	<i>N. ehrenbergi</i>	43	Osmaniye, Bahçe	2n=52	98,45	3
4	<i>N. ehrenbergi</i>	53	Osmaniye, Bahçe	2n=52	100	YOK
5	<i>N. ehrenbergi</i>	54	Adana, Yüreğir	2n=56	100	YOK
6	<i>N. ehrenbergi</i>	52	Adana, Çukuroava Üniversitesi	2n=56	100	YOK
7	<i>N. ehrenbergi</i>	603	Adana, Ceyhan	2n=53	100	YOK
8	<i>N. ehrenbergi</i>	604	Adana, Ceyhan	2n=53	98,45	3
9	<i>N. leucodon</i>	10	Kırklareli, Merkez	2n=56	98,45	3
10	<i>N. leucodon</i>	16	Kırklareli, Merkez	2n=56	98,45	3
11	<i>N. tuncelicus</i>	59	Tunceli, Pertek Yolu	2n=54	98,45	3
12	<i>N. tuncelicus</i>	73	Tunceli, Kırmızı Köprü	2n=54	100	YOK
13	<i>N. xanthodon</i>	565	Adana, Karaisalı	2n=54	98,45	3
14	<i>N. xanthodon</i>	571	Adana, Karaisalı	2n=54	98,45	3
15	<i>N. xanthodon</i>	36	Niğde, Çamardı	2n=58	98,45	3
16	<i>N. xanthodon</i>	56	Niğde, Bor	2n=58	98,45	3
17	<i>N. xanthodon</i>	4794	Isparta, Yılanlı Köyü	2n=56	98,45	3
18	<i>N. xanthodon</i>	6270	Isparta, Yılanlı Köyü	2n=56	98,70	2

1	Q-Q-A-P-G-G-E-E-G-A-R-P-R-P-S-W	<i>Nannospalax galili</i>
2	Q-Q-A-P-G-G-E-E-G-A-R-P-R-P-T-W	<i>Nannospalax</i> (Türkiye)
3	Q-Q-A-P-G-G-G-E-G-G-R-P-R-P-S-W	<i>Mus musculus</i>
	N-A-S-Q-P-V-L-R-G-D-G-A-R-P-S-W	<i>Homo sapiens</i>
	Q-P-S-P-G-G-G-E-G-A-R-P-R-P-S-W	<i>Heterocephalus glaber</i>
	Q-Q-A-P-G-G-G-E-E-I-R-S-R-P-S-W	<i>Rattus norvegicus</i>

Şekil 1. *MTNR1A* genine ait amino asit dizisinde görülen varyasyonların farklı türler arasında karşılaştırılması (1. p.Q13*, 2. p.R25*, 3. p.S27T)

Şekil 1’de gösterilen amino asit dizilerinde türler arasındaki farklılıklar incelendiğinde, 1 numaralı varyasyon Türkiye *Nannospalax* türlerinde herhangi bir amino asit değişimine sebep olmamış ve insan hariç tüm türlerde korunmuştur. İnsanda 10. amino asite denk gelen bu varyasyon (p.N10Q; p.Asp10Glu) Polyphen-2 (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) veritabanında incelendiğinde Polyphen-2 değeri 0 ile 1.00 arasında yaklaşık 0.5 değerinde tespit edilmiş olup (Şekil 2.a), mevcut değişimin insanda muhtemel zararlı olabilecek bir değişim olduğu ve olası bir patojenik etkiye sebep olabileceği sonucuna varılmıştır. 2 numaralı varyasyon da aynı şekilde herhangi bir amino asit değişimine sebep olmamış ve tüm türlerde değişmeden kalmıştır. Son olarak 3 numaralı varyasyon Türkiye *Nannospalax* türlerinde referans genom *N. galili*’ye göre Serin amino asitinden Treonin amino asitine (p.Ser27Tre) değişmiştir. Bu çalışmadaki *Nannospalax* türleri dışında karşılaştırılan diğer türlerde bu amino asit korunmuştur. İnsanda ise aynı varyasyon 24. amino asite (p.S24T; p.Ser24Tre)

denk gelmiştir. Bu varyasyon PolyPhen-2 yazılım programında değerlendirildiğinde, PolyPhen-2 değeri 0 olarak tespit edilmiş (Şekil 2.b) ve herhangi bir patojenik etkiye sebep olmadığı (benign) görülmüştür. Tespit edilen tüm varyasyonlar 13, 25 ve 27. amino asit dizilerinde meydana gelmiştir ve bu varyasyonların her üçü de *Nannospalax* türünün MT1 melatonin reseptör protein ailesinde yer almaktadır (Ensembl Genome Browser, 2024; PRINTS Database, 2024; UniProt Knowledgebase, 2024).



Şekil 2. *MTNR1A* geninde tespit edilen p.N10Q ve p.S24T varyantlarının onkogenik-patojenik etkilerinin Polyphen-2 analizi ile değerlendirilmesi

Melatonin, meme kanseri üzerinde olumlu etkiler gösteren bir bileşik olarak tanımlanmaktadır. Hem laboratuvar ortamında hem de hayvan deneylerinde kanser hücrelerinin büyümesini durdurma özelliği göstermiştir. Melatoninin, özellikle tamoksifen gibi diğer tedavilerle birlikte kullanıldığında meme lezyonlarının boyutunu azalttığı ve tedaviye dirençli hastalarda yaşam süresini artırdığı belirtilmiştir. Gece ışığına maruz kalmanın endojen melatonin düzeylerini düşürebileceği ve bu durumun meme kanseri riskini artırabileceği vurgulanmıştır. Ayrıca, melatonin takviyesinin bu etkileri tersine çevirebileceği ve meme kanseri oluşumunu engelleyebileceği gözlemlenmiştir (Liu ve ark., 2016). Melatoninin, MT1 ve MT2 reseptör genlerini aktive ederek SCN, gözler ve karaciğer gibi çeşitli hedef dokularda sirkadiyen ritim süreçlerinin koordinasyonuna yardımcı olduğuna inanılmaktadır. MT1 ve MT2, yüksek afiniteli guanin nükleotid bağlayıcı protein (G proteini) ile eşleşen spesifik reseptörlerdir ve dizileri memelilerde klonlanmış ve tanımlanmıştır. MT1/2'nin kodlanmış amino asit dizileri, zar protein bölgeleri, tipik transmembran alanları, bir N-hücre dışı bölge ve bir hücre içi C-terminal kuyruk içerir. Farklı fotoperiyotların yanı sıra, evrim sürecinde meydana gelen ve çeşitli bölgelerde bulunan mutasyon bölgelerinin MT1/2 transkripsiyonunda ifade kalıplarını yönlendirdiğine dair kanıtlar vardır (Sun ve ark., 2022).

SONUÇ

Bu çalışmada, Türkiye’de dağılım gösteren, yüksek derece heterojineteğe sahip ve farklı coğrafik bölgelerde yaşamını sürdüren 9 farklı sitotipten oluşturulan toplam 18 *Nannospalax* üyesine ait *MTNR1A* genindeki genetik varyantların varlığı değerlendirilmiştir. Bu çalışma Türkiye körfarelerine ait *MTNR1A* genindeki varyasyonların tarandığı ilk çalışmadır. Referans genom *N. galili MTNR1A* dizilerindeki incelemelerde, çalışılan Türkiye *Nannospalax* türlerindeki DNA değişimlerinin tek nükleotid değişimleri olduğu ve üç değişimden sadece bir tanesinin amino asit dizisinde de (p.S27T) değişikliğe yol açtığı belirlenmiştir. Varyasyonların insandaki patojenik etkisi incelendiğinde, yalnızca p.N10Q varyasyonunun insanda muhtemel zararlı özelliğe sahip olabileceği sonucuna varılmıştır. Ayrıca bu varyasyonların *Nannospalax* türünün MT1 melatonin reseptör protein ailesinde yer aldığı görülmüştür. Körfarelerde p.S27T varyasyonunun *MTNR1A* geni üzerindeki olası etkileri henüz net olarak belirlenmemiş olup teorik verilere dayanarak değerlendirilebilir. Bu tür bir amino asit

değişikliği, melatonin reseptörünün yapısal veya işlevsel özelliklerini etkileyerek melatonin sinyalizasyonunda değişikliklere neden olabilir. Melatonin reseptörleri, hayvanlarda ve insanlarda sirkadiyen ritimlerin düzenlenmesinde kritik bir rol oynamaktadır. Bu nedenle p.S27T gibi bir varyasyonun körfarelerin fizyolojik ve davranışsal özellikleri üzerinde potansiyel etkileri olabileceği öngörülmektedir. Ancak şimdiye kadar körfareler ile yapılan herhangi bir çalışmada *MTNR1A* genindeki varyasyonlar daha önce tanımlanmamış olsa da, diğer çalışmalarda yer alan farklı genlerde p.S27T varyasyonu görülmüştür. Çizelge 2’de bu gen üzerinde tespit edilen NCBI-ClinVar veritabanında (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) yer alan tüm p.S27T varyasyonlarını göstermektedir. Çizelge 2’de mitochondrial trifunctional protein eksikliği, kalıtsal genetik hastalıklar, akut myeloid lösemi, Schwannomatozis 2 ve belirtilmeyen diğer durumlarda tespit edilen bu varyantın kanserle olan ilişkisi belirtilmemiştir. Ayrıca tespit edilen tüm p.S27T varyasyonlarının patojenlik durumunun belirsiz değere sahip olduğu görülmüştür.

Ayrıca, *MTNR1A* geni üzerinde gerçekleştirilen diğer çalışmalarda tespit edilen varyasyonlar, NCBI-ClinVar veritabanında (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>) bulunmaktadır ve bu varyasyonlar Çizelge 3’te sunulmuştur. Çizelgede *MTNR1A* geni üzerindeki farklı varyasyonların patojenlik durumları gösterilmiştir. Buna göre yalnızca bir varyasyon patojenik etkiye sahipken, diğer varyasyonlar iyi huylu, muhtemelen iyi huylu ve belirsiz değer olacak şekilde sınıflandırılmıştır.

Çizelge 2. *MTNR1A* geninde tespit edilen tüm p.S27T varyasyonları

İsim	Gen	Erişim Numarası	Durum	Moleküler Sonuç	Patojenlik Durumu	Varyant Tipi
NM_000183.3(HADHB).80G>C	HADHB	VCV001950365	Mitochondrial trifunctional protein eksikliği	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_001085049.3(MRAS).80G>C	MRAS	VCV000986261	Kalıtsal genetik hastalıklar	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_015562.2(UBXN7).80G>C	UBXN7	VCV002491084	Belirtilmemiş	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_018051.5(DYNC2I1).79T>A	DYNC2I1	VCV003086532	Kalıtsal genetik hastalıklar	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_001379081.2(FREM1).80G>C	FREM1	VCV003096772	Kalıtsal genetik hastalıklar	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_014057.5(OGN).79T>A	OGN	VCV003061065	Belirtilmemiş	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_000218.3(KCNQ1).387-6394G>C	KCNQ1	VCV002500049	Atrial fibrilasyonu, familial, 3	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_016156.6(MTMR2).80G>C	MTMR2	VCV000245770	Kalıtsal genetik hastalıklar	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_001405963.1(OR4Q3).79T>A	OR4Q3	VCV002562111	Belirtilmemiş	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_021214.2(ABHD17C).80G>C	ABHD17C	VCV002554788	Belirtilmemiş	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_004608.4(TBX6).80G>C	TBX6	VCV001049788	Belirtilmemiş	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı

Çizelge 2. *MTNR1A* geninde tespit edilen tüm p.S27T varyasyonları (devamı)

NM_018975.4(TERF2IP).80G>C	TERF2IP	VCV001761999	Belirtilmemiş	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_018042.5(SLFN12).80G>C	SLFN12	VCV002405440	Belirtilmemiş	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_004364.5(CEBPA).80G>C	CEBPA	VCV001422145	Akut myeloid lösemi	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı
NM_006767.4(LZTR1).80G>C	LZTR1	VCV001488297	Schwannomatozis 2	Anlamsız varyant	Belirsiz değer	Tek nükleotid varyantı

Çizelge 3. NCBI veritabanındaki *MTNR1A* geninde tespit edilen tüm varyasyonlar

Varyasyon	Patojenlik Durumu
NC_000004.12:g.186533547T>C	İyi huylu
NM_005958.4:c.1033G>A (p.Val345Ile)	Muhtemelen iyi huylu
NM_005958.4:c.976G>A (p.Asp326Asn)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.945A>G (p.Thr315=)	İyi huylu
NM_005958.4:c.930A>G (p.Ile310Met)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.924A>G (p.Arg308=)	İyi huylu
NM_005958.4:c.839G>C (p.Ser280Thr)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.698A>T (p.Asp233Val)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.635T>C (p.Ile212Thr)	İyi huylu
NM_005958.4:c.602T>A (p.Ile201Asn)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.588C>T (p.Phe196=)	Muhtemelen iyi huylu
NM_005958.4:c.506A>T (p.Gln169Leu)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.474C>T (p.Alala158=)	Muhtemelen iyi huylu
NM_005958.4:c.470C>T (p.Alala157Val)	İyi huylu
NM_005958.4:c.442G>A (p.Val148Met)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.337G>A (p.Gly113Ser)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.274G>A (p.Gly92Arg)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.271A>T (p.Asn91Tyr)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.185-154del	İyi huylu
NM_005958.4:c.155T>C (p.Val52Ala)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.13G>C (p.Gly5Arg)	Belirsiz değer
NM_005958.4:c.6G>C (p.Gln2His)	Belirsiz değer
RCh37/hg19 4q35.2(chr4:187299348-187530184)	Belirsiz değer
GRCh37/hg19 4q35.2(chr4:187161749-187522422)	Belirsiz değer
GRCh37/hg19 4q35.2(chr4:187179134-187866865)	Belirsiz değer
GRCh37/hg19 4q35.1-35.2(chr4:186496069-189142432)	Belirsiz değer
GRCh37/hg19 4q35.1-35.2(chr4:185017749-190957473)	Patojenik
GRCh37/hg19 4q35.2(chr4:187333416-187518766)	Belirsiz değer

Körfareler üzerinde yakın zamanda tamamlanan bir çalışmamızda, Türkiye'de yaşayan *Nannospalax* türlerinde melatonin biyosentezinde görev alan Clock genleri üzerindeki varyasyonlar incelenmiştir. Araştırmada toplam 29 varyasyon tespit edilmiştir; bunlardan *PER1* geninde 11, *PER2* geninde 7, *CRY1* geninde 2 ve *CRY2* geninde 9 varyasyon bulunmuştur. *BMAL1* geninde ise herhangi bir varyasyon tespit edilmemiştir (Civelek ve ark., 2024). Bu çalışmamızda ise bu canlıdaki *MTNR1A* geni üzerindeki olası varyasyonlar ilk kez incelenmiştir. Ancak, Clock genlerinde henüz tespit edilen bu varyasyonların körfarelerdeki biyolojik etkilerini daha iyi anlamak için ileriye dönük genetik ve moleküler araştırmalar gereklidir. Bu çalışmalar, genellikle bu tür varyasyonların sirkadiyen ritim düzenlemesi, uyku döngüsü ve metabolik süreçler gibi çeşitli fizyolojik işlevler üzerindeki potansiyel etkilerini daha ayrıntılı bir şekilde inceleyebilir. Ayrıca körfarelerde tespit edilen varyasyonların melatonin reseptör genlerinin transkripsiyonunda nasıl bir etki yarattığı henüz bilinmemektedir. Bu bağlamda, körfarelerde bilinen yüksek kanser direnci göz önüne alındığında, melatonin genlerinin mutasyon analizi, ilgi çekici bir araştırma alanı olarak öne çıkmaktadır. Ancak *MTNR1A* geninin

sirkadiyen ritimde görev alan diğer genlerle karmaşık bir etkileşim içinde olabileceği unutulmamalıdır. Bu nedenle, yalnızca bu genin değil, aynı zamanda ilgili yolaklarda görevli diğer tüm genlerin mutasyon varlığının detaylı bir şekilde incelenmesi gerekebilir.

TEŞEKKÜR

Bu çalışma, Niğde Ömer Halisdemir Üniversitesi FMT 2023/14-HIDEP numaralı proje tarafından desteklenmiştir.

Çıkar Çatışması

Bu çalışmanın yazarları, çıkar çatışması olmadığını beyan eder.

Yazar Katkısı

Yazarlar eşit katkıda bulunduğunu beyan eder.

KAYNAKLAR

- Adzhubei, I., Jordan, D.M., & Sunyaev, S.R. (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current Protocols in Human Genetics*, 76(1), 7–20. doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76
- Avivi, A., Albrecht, U., Oster, H., Joel, A., Beiles, A., & Nevo, E. (2001). Biological clock in total darkness: the Clock/MOP3 circadian system of the blind subterranean mole rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(24), 13751-13756. doi.org/10.1073/pnas.181484498
- Civelek, İ., Kankılıç, T., Akın, D. F. (2024). An Investigation of Clock Gene Variations in Turkish *Nannospalax* Species. *Russian Journal of Genetics*, 60(5), 626-639. doi.org/10.1134/S1022795424040057
- David-Gray, Z.K., Cooper, H.M., Janssen, J.W.H., Nevo, E., & Foster, R.G. (1999). Spectral tuning of a circadian photopigment in a subterranean ‘blind’ mammal (*Spalax ehrenbergi*). *FEBS Letters*, 461(3), 343–347. doi.org/10.1016/S0014-5793(99)01455-6
- Dehdari Ebrahimi, N., Sadeghi, A., Shojaei-Zarghani, S., Shahlaee, M. A., Taherifard, E., Rahimian, Z., ... & Safarpour, A. R. (2023). Protective effects of exogenous melatonin therapy against oxidative stress to male reproductive tissue caused by anti-cancer chemical and radiation therapy: a systematic review and meta-analysis of animal studies. *Frontiers in endocrinology*, 14, 1184745. doi.org/10.3389/fendo.2023.1184745
- Doyle, J. (1991). DNA protocols for plants. In *Molecular techniques in taxonomy*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 283-293.
- Dubocovich, M. L. (2007). Melatonin receptors: role on sleep and circadian rhythm regulation. *Sleep medicine*, 8, 34-42. doi.org/10.1016/j.sleep.2007.10.007
- European Bioinformatics Institute (EMBL-EBI). (n.d.). Ensembl Genome Browser [Veritabanı]. https://www.ensembl.org (Erişim: Haziran, 2024).
- Flesher, J.W., Horn, J., & Lehner, A.F. (1998). Carcinogenicity of 1-hydroxy-3-methylcholanthrene and its electrophilic sulfate ester 1-sulfooxy-3-methylcholanthrene in Sprague-Dawley rats. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 243(1), 30–35. doi.org/10.1006/bbrc.1997.8048
- Foulkes, N.S., Borjigin, J., & Snyder, S.H. (1997). Rhythmic transcription: the molecular basis of circadian melatonin synthesis. *Trends in neurosciences*, 20(10), 487-492. doi.org/10.1016/S0166-2236(97)01109-0

- Gao, Y., Wu, X., Zhao, S., Zhang, Y., Ma, H., Yang, Z., ... & Zhang, Q. (2019). Melatonin receptor depletion suppressed hCG-induced testosterone expression in mouse Leydig cells. *Cellular & molecular biology letters*, 24(1), 1-14.
- Gorbunova, V., Hine, C., Tian, X., Ablava, J., Gudkov, A.V, Nevo, E., & Seluanov, A. (2012). Cancer resistance in the blind mole rat is mediated by concerted necrotic cell death mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(47), 19392–19396. doi.org/10.1073/pnas.1217211109
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/N. in *Nucleic Acids Symposium Series*, Oxford, 95-98.
- Hannibal, J., Hindersson, P., Nevo, E., & Fahrenkrug, J. (2002). The circadian photopigment melanopsin is expressed in the blind subterranean mole rat, Spalax. *Neuroreport*, 13(11), 1411-1414.
- Higgins, E. M., Bos, J. M., Mason-Suares, H., Tester, D. J., Ackerman, J. P., MacRae, C. A., ... & Ackerman, M. J. (2017). Elucidation of MRAS-mediated Noonan syndrome with cardiac hypertrophy. *JCI insight*, 2(5).
- Human Genome Mutation Database. (n.d.). PolyPhen-2: Prediction of functional effects of human nsSNPs. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/> (Erişim adresi: Haziran, 2024)
- Jimenez-Jorge, S., Guerrero, J. M., Jimenez-Caliani, A. J., Naranjo, M. C., Lardone, P. J., Carrillo-Vico, A., ... & Molinero, P. (2007). Evidence for melatonin synthesis in the rat brain during development. *Journal of pineal research*, 42(3), 240-246. doi.org/10.1111/j.1600-079X.2006.00411.x
- Jung-Hynes, B., Reiter, R. J., & Ahmad, N. (2010). Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *Journal of pineal research*, 48(1), 9-19. doi.org/10.1111/j.1600-079X.2009.00729.x
- Liu, J., Clough, S. J., Hutchinson, A. J., Adamah-Biassi, E. B., Popovska-Gorevski, M., & Dubocovich, M. L. (2016). MT1 and MT2 melatonin receptors: a therapeutic perspective. *Annual review of pharmacology and toxicology*, 56(1), 361-383. doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-010814-124742
- Ma, Z., Xu, L., Liu, D., Zhang, X., Di, S., Li, W., ... & Yan, X. (2020). Utilizing melatonin to alleviate side effects of chemotherapy: a potentially good partner for treating cancer with ageing. *Oxidative medicine and cellular longevity*, 2020(1), 6841581. doi.org/10.1155/2020/6841581
- Manov, I., Hirsh, M., Iancu, T. C., Malik, A., Sotnichenko, N., Band, M., Avivi, A., & Shams, I. (2013). Pronounced cancer resistance in a subterranean rodent, the blind mole-rat, Spalax: In vivo and in vitro evidence. *BMC Biology*, 11(1), 1–18. doi.org/10.1186/1741-7007-11-91
- Najafi, M., Shirazi, A., Motevaseli, E., Geraily, G., Norouzi, F., Heidari, M., & Rezapoor, S. (2017). The melatonin immunomodulatory actions in radiotherapy. *Biophysical reviews*, 9, 139-148. doi.org/10.1007/s12551-017-0256-8
- National Center for Biotechnology Information. (n.d.). Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) [Veritabanı]. *National Institutes of Health*. <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi> (Erişim: Haziran, 2024).
- National Center for Biotechnology Information. (2024). NCBI Genome Database. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/> (Erişim: Haziran, 2024).

- Németh, A., Hegyeli, Z., Sendula, T., Horváth, M., Czabán, D., & Csorba, G. (2016). Danger underground and in the open—predation on blind mole rats (*Rodentia: Spalacinae*) revisited. *Mammal Review*, 46(3), 204-214.
- Nevo, E. (2022). Evolution of Communication Systems Underground in a Blind Mammal, *Spalax*. In: Hill, P.S.M., Mazzoni, V., Stritih-Peljhan, N., Virant-Doberlet, M., Wessel, A. (eds) Biotremology: Physiology, Ecology, and Evolution. *Animal Signals and Communication*, vol 8. Springer, Cham. doi.org/10.1007/978-3-030-97419-0_15
- Pham, T. T., Lee, E. S., Kong, S. Y., Kim, J., Kim, S. Y., Joo, J., ... & Park, B. (2019). Night-shift work, circadian and melatonin pathway related genes and their interaction on breast cancer risk: Evidence from a case-control study in Korean women. *Scientific Reports*, 9(1), 10982.
- Steele, T. A., St Louis, E. K., Videnovic, A., & Auger, R.R. (2021). Circadian rhythm sleep–wake disorders: a contemporary review of neurobiology, treatment, and dysregulation in neurodegenerative disease. *Neurotherapeutics*, 18(1), 53–74. doi.org/10.1007/s13311-021-01031-8
- Sun, H., Pan, D., Liu, D., Cheng, Y., Zhang, Y., & Wang, Z. (2022). Melatonin secretion, molecular expression and evolution of MT1/2 in two *Lasiopodomys* species. *Mammalian Biology*, 102(1), 99-107.
- The UniProt Consortium. (n.d.). UniProt Knowledgebase [Veritabanı]. European Bioinformatics Institute. <https://www.uniprot.org> (Erişim adresi: Haziran, 2024).
- Topachevskii, W. A. (1969). Fauna USSR Spalacidae. *Leningrad, USSR: Nauka (English translation: Springfield, VA, USA: US Department Of Commerce National Technical Information Service)*.
- University of Manchester. (n.d). PRINTS Database [Veritabanı]. <https://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/> (Erişim: Haziran, 2024).
- Wang, X. (2009). The antiapoptotic activity of melatonin in neurodegenerative diseases. *CNS neuroscience & therapeutics*, 15(4), 345-357. doi.org/10.1111/j.1755-5949.2009.00105.x
- Zhang, J., Jiang, H., Du, K., Xie, T., Wang, B., Chen, C., ... & Yuan, Y. (2021). Pan-Cancer analyses reveal Genomics and clinical characteristics of the Melatonergic regulators in cancer. *Journal of pineal research*, 71(3), e12758. doi.org/10.1111/jpi.12758.