

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİNEALEKTOMİ VE MELATONİN UYGULAMASININ
SIÇAN BEYİN DOKUSUNDA METALLOTİONİN, ZNT3, ZIP2
VE ÇİNKO DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Arife DENİZ

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman:

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

KONYA-2017

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**PİNEALEKTOMİ VE MELATONİN UYGULAMASININ
SIÇAN BEYİN DOKUSUNDA METALLOTİONİN, ZNT3, ZIP2
VE ÇİNKO DÜZEYLERİNE ETKİSİ**

Arife DENİZ

DOKTORA TEZİ

FİZYOLOJİ (TIP) ANABİLİM DALI

Danışman:

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

Bu araştırma Selçuk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinatörlüğü
tarafından 15202018 proje numarası ile desteklenmiştir.

KONYA-2017

ONAY SAYFASI

S.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürlüğü'ne

Arife DENİZ tarafından savunulan bu çalışma, jürimiz tarafından Fizyoloji Anabilim Dalında Doktora Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Jüri Başkanı:

Prof. Dr. Bekir ÇOKSEVİM
Erciyes Üniversitesi

İmza

Danışman:

Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye:

Prof. Dr. Ali Muhtar TİFTİK
Necmettin Erbakan Üniversitesi

İmza

Üye:

Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ
Selçuk Üniversitesi

İmza

Üye:

Doç. Dr. Esmâ MENEVŞE
Selçuk Üniversitesi

İmza

ONAY:

Bu tez, Selçuk Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim Yönetmenliği'nin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki jüri üyeleri tarafından uygun görülmüş ve Enstitü Yönetim Kurulu tarih ve sayılı kararıyla kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Ender Erdoğan
Enstitü Müdürü

ÖNSÖZ

“Pinealektomi ve Melatonin Uygulamasının Sıçan Beyin Dokusunda Metallothionein, ZnT3, ZIP2 ve Çinko Düzeylerine Etkisi” başlıklı tezimin planlanmasında, araştırılmasında ve oluşumunda ilgi ve desteğini esirgemeyen, engin bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren danışmanım sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI’ya sonsuz teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca çalışmalarım boyunca yardımlarını esirgemeyen Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Rasim MOĞULKOÇ’a, Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Mustafa Cihat AVUNDUK’a, Selçuk Üniversitesi Spor Bilimleri Fakültesi öğretim üyesi Doç. Dr. Süleyman PATLAR’a, Selçuk Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Anabilim Dalı asistanı Ömer ÜNAL’a, ve tüm eğitim hayatım boyunca maddi manevi desteklerini esirgemeyen her zaman yanımda olan sevgili aileme teşekkürü bir borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

SİMGELER ve KISALTMALAR	vi
ÖZET.....	ix
SUMMARY	xi
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Pineal Bez.....	1
1.1.1. Pineal Bezin Anatomisi	1
1.1.2. Pineal Bezin Histolojik Yapısı	2
1.2. Melatonin.....	2
1.2.1. Pineal Bez ve Melatonin.....	2
1.2.2. Pineal Bezde Melatoninin Sentezlenmesi	4
1.2.3. Melatonin Metabolizması.....	4
1.2.4. Melatonin Ritmik Salgılanması.....	5
1.2.5. Melatonin Fizyolojisi.....	6
1.2.6. Endokrin Sistemde Melatonin	8
1.2.7. Melatoninin Sistemik Etkileri.....	9
1.3. Çinko.....	12
1.3.1. Çinkonun Yapısal Özellikleri	13
1.3.2. Bir Eser Element Olarak Çinko	13
1.3.3. Biyokimyasal Yönden Çinko	14
1.3.4. Hücreler Arası İletişim ve Çinko.....	15
1.3.5. Çinko Homeostazı	16
1.3.6. Hücresel Çinko Dağılımı.....	17
1.3.7. Hücrelerdeki Çinko İçeren Veziküller/Granüller	17
1.3.8. Beyinde Çinko	18
1.3.9. Hücre Membranlarında Çinko Transportu	20

1.4.	Metallotioninler (MT).....	20
1.4.1.	Hücresel Fonksiyonlarda Metallotioninler	22
1.4.2.	Metallotioninlerin Alt Tipleri	23
1.4.3.	Metallotioninlerin Yapısal Özellikleri.....	28
1.5.	Hücre İçi Çinko Seviyelerinin Düzenlenmesinde Çinko Proteinleri....	28
1.5.1.	Hücre İçi ve Hücre Dışı Taşınmada Çinko Proteinleri (ZIP ve ZnT)	28
1.5.2.	Hücre İçine Çinko Taşınımından Sorumlu Proteinler “ZIP (SLC39A) Ailesi”.....	30
1.5.3.	Hücre Dışına Çinko Taşınımından Sorumlu Proteinler “ZnT (SLC30A) Ailesi”	32
2.	GEREÇ ve YÖNTEM	40
2.1.	Deneyisel Uygulamalar.....	40
2.1.1.	Melatonin Uygulaması	40
2.2.	Pinealektomi.....	40
2.3.	İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü.....	41
2.3.1.	Preperatların Fotoğraflanması ve İmmünoreaktivitenin Değerlendirilmesi.....	41
2.4.	Serum Çinko Analizi.....	41
2.5.	İstatistiksel Değerlendirmeler.....	42
3.	BULGULAR.....	43
3.1.	Hipotalamus ZnT3, ZIP2 ve Metallotionin Düzeyleri.....	43
3.2.	Korteks ZnT3, ZIP2 ve Metallotionin Düzeyleri.....	44
3.3.	Hipokampus ZnT3, ZIP2 ve Metallotionin Düzeyleri.....	45
3.4.	Çalışma Gruplarının Serum Çinko Düzeyleri.....	47
4.	TARTIŞMA.....	48
4.1.	Beyin Korteksi, Hipokampus ve Hipotalamustaki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması.....	48

4.2. Beyin Korteksi, Hipokampus ve Hipotalamustaki ZnT3 Düzeylerinin Tartışılması	50
4.3. Beyin Korteksi, Hipokampus ve Hipotalamustaki ZIP2 Düzeylerinin Tartışılması	52
4.4. Çalışma Gruplarının Serum Çinko Düzeylerinin Tartışılması.....	52
5. SONUÇ ve ÖNERİLER	55
6. KAYNAKLAR	56
7. EKLER	83
8. ÖZGEÇMİŞ	84



SİMGELER ve KISALTMALAR

AAD: Aromatik amino asit dekarboksilaz

AA-NAT: Arilalkilamin N-asetiltransferaz

AD: Alzheimer hastalığı

AE: Acrodermatitis enteropathica

AFMK: Anti faşist mücadele komiteleri

AMPA: α -amino-3-hidroxy-5-methylisoxazole-4-propionic acid

ALS: Amyotrofik lateral skleroz

AP-3: Adaptör protein 3

BHK: Yenidoğan hamster böbreği

cAMP: Siklik adenzin monofosfat

CDF: Katyon difüzyon fasilitatör

cGMP: Siklik guanozin monofosfat

CNS: Merkezi sinir sistemi

CSF: Beyin omurilik sıvısı

EC: Enzim komisyonu

ER: Endoplazmik retikulum

EST: Eastern standard time

ETZ: Elektron transport zinciri

FSH: Follicle stimulating hormone

GABA: γ -aminobutyric asit

GH: Growth hormon

GIF: Büyüme inhibitör faktörü

GIS: Gastrointestinal sistem

GM-CSF: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör

GnRH: Gonadotropin releasing hormon

GPCR: G protein–coupled receptor

H₂O₂: Hidrojen peroksit

HIOMT: Hidroksiindol-O-metil transferaz

HO: Hidroksil radikali

LH: Lutenizian hormon

MAPK: Mitojenle aktive olan protein kinaz

Mel: Melatonin

MPTP: Metil fenil tetrahidropüridin

MSH: Melanosit stimulating hormon

MT: Metallotionin

MTF: Metal duyarlı element bağlayan transkripsiyon faktör

NAT: N-asetiltransferaz

NF-κB: Nuclear factor kappa B

NMDA: N-metil- D-aspartat

NO: Nitrik oksit

NQO₂: Quinone Oxidoreductase

PACAP: Hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptid

PCR: Polieraz zincir reaksiyonu

PDE: Fosfodiesteraz

PI3K/Akt: PhosphaIdilinositol 3-kinaz/protein kinaz

PKC: Protein Kinaz C

PTP: Protein tirozin fosfataz

RNS: Reaktif azot türleri

ROS: Reaktif oksijen türleri

RT-PCR: Ters tarnskriptaz polimeraz zincir reaksiyonu

SCD-EDS: Spodylocheiroadysplatic Ehlers-Danlos syndrome

SKN: Suprakiazmatik nükleus

SIRT: Sirtuin

siRNA: Küçük interferans RNA

SOD: Süperoksit Dismutaz

TM: Transmembran

TNZD: Geçici yenidoğan çinko eksikliği

TPH: Triptofan hidroksilaz

UV: Ultraviyole

VIP: Vazoaktif intestinal polipeptid

ZEN: Çinko zenginle tirilmi  nöronlar

ZIP: Zrt-ve Irt- benzeri proteinler

ZnT: Çinko taşıyıcı protein

ÖZET

T.C.

SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

Pinealektomi ve Melatonin Uygulamasının Sıçan Beyin Dokusunda Metallotionin, ZnT3, ZIP2 ve Çinko Düzeylerine Etkisi

Arife DENİZ

Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalı

DOKTORA TEZİ / KONYA-2017

Pineal bezden salgılanan melatonin hormonuyla, bir eser element olan çinko arasında önemli ilişkinin varlığına dikkat çekilmektedir. Bu projenin amacı, pineal bezleri çıkarılmış (px), pinealektomi sonrası melatonin uygulanmış veya pineal bezlerine dokunulmadan melatonin uygulaması yapılmış sıçanların beyin doku bölümlerinde çinko havuzunun düzenlenmesinde temel bir mekanizma olan metallotionin, ZnT3 ve ZIP2 ile çinko düzeyleri arasındaki ilişkinin araştırılmasıdır.

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen Wistar cinsi erişkin erkek sıçanlar üzerinde aynı merkezde gerçekleştirildi. Çalışma protokolü aynı merkezin etik kurulu tarafından onaylandı. Toplam 36 adet sıçan kullanıp araştırmada gruplar şu şekilde oluşturuldu:

Grup 1, (n:6) Kontrol: Hiçbir uygulamanın yapılmadığı normal diyetle beslenen grup.

Grup 2, (n:10) Pinealektomi: Pinealektomi yapılan ve normal diyetle beslenen grup.

Grup 3, (n:10) Pinealektomili + Melatonin: Pinealektomi yapılan ve 4 hafta boyunca 5mg/kg/gün deri altı melatonin uygulanan grup.

Grup 4, (n:10) Melatonin: Dört hafta süreyle 5mg/kg/gün deri altı melatonin uygulanan grup.

Dört hafta süren çalışmaların bitiminde hayvanların tamamından dekapitasyonla gerekli analizlerde kullanılmak üzere beyin korteksi, hipokampus, hipotalamus doku örnekleri immünohistokimyasal çalışmalar için içerisinde %10'luk formol bulunan kaplara alınarak metallotionin, ZnT3 ve ZIP2 yüzdeleri immünohistokimyasal yöntemle, hayvanlardan elde edilen serum örneklerinde çinko düzeyleri atomik absorpsiyon spektrofotometresiyle tayin edildi.

Pinealektomi; beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta metallotionin, ZnT3 ve serum çinko düzeylerinde önemli azalmayla sonuçlandı. ($P<0.05$) Pinealektomize veya cerrahi işlem yapılmamış normal sıçanlara melatonin desteği ise aynı parametrelerde artışla sonuçlandı. ($P<0.05$). Yine pinealektomi kontrol grubuna oranla beyin korteksi ve hipotalamustaki ZIP2 düzeylerine bir değişikliğe yol açmazken, melatonin uygulaması ise beyin korteksi, hipotalamus ve hipokampusta ZIP2 düzeylerinde artışa yol açtı ($P<0.05$).

Bir bütün olarak çalışmamızın bulguları pineal bezin beyin dokusunda ZnT3 ve metallotioninlerin regülasyonu ile yakın ilişkili olduğunu göstermektedir. Özellikle pineal bezin beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamustaki ZnT3 regülasyonu ile ilişkili olarak elde ettiğimiz bulgunun med-line taramalara dayanarak ilk ve orijinal bulgu olduğunu söyleyebiliriz.

Anahtar Sözcükler: Pinealektomi; melatonin; çinko taşıyıcı proteinler; beyin; sıçan.



SUMMARY

REPUBLIC of TURKEY
SELÇUK UNIVERSITY
HEALTH SCIENCES INSTITUTE

The Effect of Pinealectomy and Melatonin Application on Metallothionin, ZnT3, ZIP2 and Zinc Levels in Rat Brain Tissue

Arife Deniz

Department of Physiology (Medicine)

DOCTORATE THESIS/KONYA-2017

Attraction is drawn to the significant relation between melatonin hormone and zinc which is a trace element. The aim of this project is to investigate the relation among metallothionin, ZnT3 and ZIP2 and zinc levels which is the basic mechanism in the regulation of zinc pool in the brain tissue parts of rats whose pineal glands were resected (px) and exposed to melatonin after pinealectomy or without melatonin.

This study was performed on adult male Wistar rats obtained from Selcuk University Experimental Medicine Research and Application Centre in the same centre. The study protocol was approved by the ethics committee of the same centre. A total of 36 rats were used and the groups in the study were established as follows:

Group 1, (n:9) Control: The group with no intervention and fed with normal diet.

Group 2, (n=10) Pinealecomy: The group with pinealectomy and fed with normal diet.

Group 3, (n=10) Pinealectomy + Melatonin: The group with pinealectomy and subcutaneous melatonin application with a dose of 5 mg/kg for four weeks after pinealectomy.

Group 4, (n=10) Melatonin: The group with subcutaneous melatonin application with a dose of 5 mg/kg for four weeks.

At the end of the study lasted for four weeks, brain cortex, hippocampus and hypothalamus tissue samples were obtained into sample cups including 10% formalin for immunohistochemical analysis after decapitation of all animals and it was analyzed percentage levels of metallothionin, ZnT3 and ZIP2 with immunohistochemical technique and serum zinc levels with atomic absorption spectrometry.

Pinealectomy caused significant decrease in metallothionin, ZnT3 levels in brain cortex and hippocampus and serum zinc levels ($p<0.05$). Melatonin application in pinealecomised rats or rats without any surgical operation caused significant increase on the same parameters ($p<0.05$). Although pinealectomy did not cause any significant difference in ZIP2 levels in brain cortex and hipothalamus compared with the control group; melatonin application caused significant difference in ZIP2 levels in brain cortex, hypothalamus and hippocampus ($p<0.05$).

The findings of our study indicate that pineal gland is closely related with the regulation of ZnT3 and metallothionins in brain tissue. We can conclude that our findings especially indicating the relation between pineal gland and ZnT3 regulation in brain cortex, hypothalamus and hippocampus are the first and original findings due to our medline data base searches.

Key Words: Pinealectomy; melatonin; zinc transport proteins; brain; rat.



1. GİRİŞ

1.1. Pineal Bez

Pineal bez, beyinde bulunan önemli bir nöroendokrin organdır (Bulbulla ve ark 2005). Pineal bezin varlığı eski zamanlardan beri bilinmektedir. M.Ö. 3. yüzyıl civarında Herophilus, pineal bezini bulmuştur (Erlich ve Apuzzo 1985). Pineal kelimesi Latince’de çam ağacı kozalağı anlamına gelen “pineae” kelimesinden gelmiştir. Pineal bezin diğer isimleri; epiphysis cerebri, corpus pineale, glandula pinealis’dir (Kus ve Sarsılmaz 2002).

Pineal bez anterior hipotalamusa yerleşmiş suprakiazmatik nükleus (SKN) orijinli bir nöronal multisinaptik yoldan meydana gelen, sinir sistemine bağlanan sirkadiyen sistemde merkezi bir yapıdır (Wu ve Swaab 2005). Bu yapı, SKN’de oluşan sinyalleri yansıtarak belirgin sirkadiyen tarzda melatonin üretir (Wu ve Swaab 2005).

Pineal bez iki ana hücre tipini içerir bunlar; nöroglial hücreler ve melatonin üretimi baskın olan pineositlerdir (Wu ve Swaab 2005).

İnsanlarda üçüncü ventrikülün arkasında yer alan pineal bez (epifiz bezi), böbrekten sonra vücudun en çok kan akımına sahip ikinci organıdır (Kappers 1976, Yazıcı ve Köse 2004).

1.1.1. Pineal Bezin Anatomisi

Pineal bez, posterior komissür ve dorsal habenular komissür arasında, üçüncü ventrikülün posterior duvarına yapışıktır. Boyutu ve pozisyonu türler içinde dahi farklılık gösterir. Erişkin insanlarda ortalama ağırlığı 100-180 mg olup, 5-9 mm uzunluğunda, 3-6 mm genişliğinde, 3-5 mm derinliğindedir ve pia mater ile sarılmıştır (Kus ve Sarsılmaz 2002). Arteriyel beslenme, posterior chorooidal arterler yoluyla olur. Venöz dolaşım ise internal serebral venler yoluyla sağlanır. Kapiller yapısı ayrışık endotelial yapılanma gösterir ve kan beyin bariyeri yoktur (Reiter 1993).

1.1.2. Pineal Bezin Histolojik Yapısı

Pineal bez iki tip parankimal hücre içermektedir: pinealositler ve interstisyel hücreler (gliyal hücreler). Pinealositler, pineal bezin şef hücreleridir. Bu hücreler bezin yüzeyini kaplayan pia materden bezin içine uzanan bağ dokusu yapısındaki septumlar tarafından oluşturulan lobüller içinde küme ve kordonlar halinde düzenlenmişlerdir. İnterstisyel (gliyal) hücreler bezdeki hücrelerin yaklaşık %5'ini oluşturmaktadır. Astrositlerin boyanma ve ultrastrüktürel özelliklerine yakın özelliklere sahiptirler ve pitüiter bezin posterior lobunun pitüisitlerini andırırlar (Ross ve Pawlina 2013).

1.2. Melatonin

Melatonin, pineal bez tarafından üretilen ve memelilerde sirkadiyen ritmi düzenleyen bir hormondur (Nir 2003). Cilt aydınlatma özelliği olan melatonin (N-asetil-5-metoksitriptamin) bir amfilik moleküldür ve en erken 1958 yılında dermatolog Aaron Lerner tarafından sığır pineal dokusu özütünden izole edilerek tanımlanmıştır (Lerner ve ark 1958, Reiter ve ark 2007, Zawilska ve ark 2009). Ayrıca melatonin, triptofandan köken alan bir moleküldür ve doğada hem bitkisel hem de hayvansal kaynaklarda oldukça yaygındır. Örneğin; insan sütü, muz, pancar, salatalık ve domateste bulunur. İnsanlarda melatonin başlıca pineal bezden sentezlenir ama aynı zamanda retina ve gastrointestinal sistem (GIS) gibi diğer organ ve sistemlerde de üretilir (Hirsch-Rodriguez ve ark 2007, Kleszczynski ve Fischer 2012, Acu'na- Castroviejo ve ark 2014).

1.2.1. Pineal Bez ve Melatonin

Melatonin, bitki ve hayvan alemlerinde yaygın ve yüksek oranda bulunan ve neredeyse her canlı organizmada bulunan bir moleküldür (Dubbels ve ark 1995, Manchester ve ark 1995, Tan ve ark 2007, Byeon ve ark 2013, Park ve ark 2013, Reiter ve ark 2013). Bu indolamin esansiyel bir amino asit olan L-triptofandan dört enzimin etkisi ile sentezlenir. Bu enzimler şunlardır; Triptofan hidroksilaz, L-aromatik amino asit dekarboksilaz, N-asetil transferaz ve hidroksi indol-O-metil transferaz (Stehle ve ark 2011, García ve ark 2014).

Melatonin sentezi, 6-tetrahidropterin (6-BH₄)'ü temel olarak kullanan triptofan hidroksilazla (TPH, EC 1.14.16.4) katalize edilen aromatik amino asit L-triptofandan 5-hidroksitriptofona hidroksillenme ile başlayan çok aşamalı bir süreçtir. 5-Hidroksitriptofan daha sonra aromatik amino asit dekarboksilaz (AAD, EC 4.1.1.28) (Lovenberg ve ark 1962) tarafından serotonine (5-hidroksitriptamin) dönüştürülür. Serotonin daha sonra arilalkilamin N-asetiltransferaz enzimi (AANAT, EC 2.3.1.87) tarafından N-asetilserotonine dönüştürülür (Lovenberg ve ark 1967). Melatonin sentezinin son basamağı, N-asetilserotoninin hidroksiindol-O-metil transferaz (HIOMT, EC 2.1.1.4) ile melatonine dönüştürülmesidir (Wessbach 1960).

Sentez, hipotalamusta bulunan SKN tarafından kontrol edilir ve gamma aminobutirik asit (GABA) bu hücrelerde temel nörotransmitterdir. Retinanın sinir fibrilleri, çevrenin parlaklığını saptar ve bilgiyi merkezi sinir sistemine iletir. Ek olarak SKN, supraventriküler bölge üzerinden hipotalamusun dorsomedial çekirdeği ile bağlantı kurar ki bu, uyku ve uyanıklık sirkadiyen ritminin, lokomotif aktivitenin, beslenmenin ve kortikosteroid üretiminin sağlanması için kritik öneme sahiptir.

Gün içerisinde melatonin sentezi sempatik aktivite akışı gibi sınırlıdır. Karanlıkta norepinefrinin serbest bırakılması pinealositlerdeki (rod dışı ve kon dışı fotoreseptörelere köken alan hücre tipidir) beta adrenerjik reseptörler üzerinden gerçekleşir. Pineal beta adrenerjik reseptörlerin aktivasyonu (cAMP) ve pineal AA-NAT sentez ve aktivitesinde artışa neden olur. Alfa-1 adrenerjik reseptörler de pineal bezde bulunur ve beta reseptör aktivitesini kalsiyum aktivitesindeki artma ve protein kinaz üzerinden artırır. Beta adrenerjik blokerlerin insanlarda melatoninin nokturnal sentez ve salınımını melatonin üretiminin pineal bezdeki regülasyonuna benzer bir şekilde baskıladıkları gösterilmiştir (Amado ve Mazzacoratti 2004).

Periferik organlarda melatonin içeriği yaşla birlikte azalır, pineal melatonin üretimi de benzer şekilde azalmaktadır (Reiter ve ark 1980, Zhou ve ark 2003, Sanchez-Hidalgo ve ark 2009). Bunun nedeni olarak yaşın nörodejeneratif hastalıklarla ilgisi olması öne sürülmüştür, özellikle Alzheimer hastalığı (AD) nedensel olarak melatonin eksikliği ile ilişkili olabilir (Zhou ve ark 2003). Pinealositlerde beta adrenerjik reseptör sayısında azalma, melanosit sentezinde anahtar enzim olan AA-NAT aktivitesinde azalma, melatoninin artmış plazma klirensi, hepsi yaşlanma ile birlikte görülür (Zhou ve ark 2003).

1.2.2. Pineal Bezde Melatonin Sentezlenmesi

Pinealositlerdeki melatonin biyosentez mekanizması Axelrod tarafından belirlenmiştir (Erren ve Reiter 2010). Melatonin sentezi pinealositler tarafından triptofanın dolaşım sisteminden alınması ile başlar. Triptofan daha sonra 5-hidroksitriptofan vasıtasıyla serotonine dönüştürülür, serotonin, N-asetil transferaz (NAT) enzimleri ve HIOMT ile katalize edilen iki aşamalı bir işlemle melatonine dönüştürülür (NAT tarafından katalize edilen adım hız sınırlayıcı basamaktır) (Hickman ve ark 1999). Bu enzimleri kodlayan genler, gün boyunca zayıf bir şekilde ve gece boyunca şiddetli etki gösterir, bu nedenle pineal melatonin salgısı sirkadiyen bir ritim gösterir (Amaral ve ark 2014). Melatonin ayrıca epitel hücrelerinde, kemik iliği hücrelerinde ve lenfositlerde sentezlenebilir ve lokal sentetik boyutta melatonin muhtemelen çeşitli fizyolojik süreçlerde önemlidir (Kvetnoy 2002).

1.2.3. Melatonin Metabolizması

İlk olarak pineal bezden izole edilen melatoninin (Lerner ve ark 1958), şimdi diğer çeşitli organlarda da üretildiği bilinmektedir (Venegas ve ark 2012). Son zamanlarda polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) kullanılarak HIOMT mRNA ekspresyonu ve NAT'ın analizleri ile timus, dalak, kalp, kas, karaciğer, mide, barsak, plasenta, testis, serebral korteks, retina, harder bezi, kemik iliği, trombositler, astrositler, glia hücreleri, lenfositler, pankreas, böbrekler ve deri de dahil olmak üzere çeşitli dokularda melatonin sentezinin varlığını ortaya koymuştur (Tan ve ark 2010, Carrillo-Vico ve ark 2013). Bunun yanında memelilerde sirküle edilen melatoninin çoğu pineal bezden kaynaklanır (Chunjin ve Zhou 2015).

Amfilik doğası sayesinde melatonin tüm fizyolojik bariyerleri geçebilme ve tüm hücre içi kompartmanlara girebilme yeteneğine sahiptir (Menendez-Pelaez ve Reiter 1993, Costa ve ark 1995, Reiter 2000, Reiter ve ark 2013). Bu yüzden pek çok fizyolojik olayı farklı mekanizmalar üzerinden gerçekleştirebilir (León ve ark 2005). Melatonin membran reseptörlerine, muhtemelen de nükleer bağlanma bölgelerine bağlanarak (Acuña-Castroviejo et al 1994, Witt-Enderby ve ark 2003, Dubocovich ve Markowska 2005), aynı zamanda kalmodulin gibi sitozolik proteinlerle de etkileşerek etki gösterir (Benítez-King 2006).

Melaton lipit ve suda yüksek çözünürlüğünden dolayı hücre içi reseptörleri ile hücre membranlarından geçer ve hızla tüm vücut dokularına ulaşır (Jan ve ark 2011). Dolaşıma salındıktan sonra çeşitli akışkanlara (tükürük, idrar, beyin omurilik sıvısı, semen, amniyon sıvısı ve süt), dokulara ve hücrel kompartmanlara erişim kazanır (Claustrat ve Lestonb 2015).

1.2.4. Melatonin Ritmik Salgılanması

Melatoninin omurgalı pineal bezinde sirkadiyen sentezinin başlıca düzenleyicisi karanlık/aydınlık döngüsüdür. Karanlıkta suprakıyazmatik nükleus multisinaptik sempatik bir yol üzerinden melatonin üretimini uyarır (Stehle ve ark 2011). Bu indolaminin, organizmanın aktiviteleri üzerindeki kronobiyotik etkileri onun pineal bezden sirkadiyen üretim ve salınımının bir sonucudur ve endokrin ve non-endokrin ritimleri içerir (Hardeland ve ark 2012, Acuña-Castroviejo ve ark 2014).

Melatonin üretim ve salgısı karanlık ile başlar ve ışıkla sona erer (Reiter 1981). Bu düzenleme SKN'ye uzanan retinohipotalamik alanı oluşturan retinanın gangliyon hücrelerinin aksonları ile başlar ve multisinaptik bir yol boyunca devam eder (Venegas ve ark 2012). Bilgi periferik postgangliyonik sempatik lifleri aracılığıyla pineale ulaşır (Perreau-Lenz ve ark 2003). Karanlık boyunca pineosit membranında hem alfa ve beta adrenerjik reseptörleri bağlayan hem de onları aktive eden postgangliyonik sempatik liflerden nöropinefrin salgılanır ve hücre içi cAMP artarak NAT mRNA'nın transkripsiyonunu indükler (Karolczak ve ark 2005, Klein 2007). Gün boyunca ışık NAT ve melatonin üretimini inhibe ederek pineositlerden nöropinefrin salınımını köreltir (Venegas ve ark 2012). Kanda melatonin seviyesi karanlıkta yükselir, vücut hücreleri ve organları gece döngüsünde olduğunu anlar (Slominski ve ark 2012).

Melatonin salgılanması gece oluşur, maksimum plazma seviyeleri 03.00-04.00 a.m civarında kronotropi ile değişirken, gündüz melatonin seviyesi dinlenen kişilerde ya saptanamaz ya da çok düşük saptanır (Claustrat ve Lestonb 2015). Ayrıca ritmik melatonin üretimi 3-6 yaşlarında en üst düzeydedir (Claustrat ve Lestonb 2015).

Melatonin üretiminin 24 saatlik ritmi insanlar ve genç hayvanlarda canlıyken; siklus yaşlanma ile bozulur ki bu da melatonindeki kayıp ile yaşlanmanın işaretleri arasında potansiyel bir ilişkiyi düşündürür (Reiter ve ark 1980, Reiter ve ark 1981, Pang ve ark 1984, Nair ve ark 1986, Reiter 1992, Poeggeler ve ark 1993, Pierpaoli ve Regelson 1994). Melatonin ritmi deney hayvanlarının gıda alımı sınırlandırılarak yaşlanma sırasında da korunabilir ki gıda kısıtlaması melatoninin bazı yararlı etkilerine ileri yaşta pineal bezin aktivitesini koruyarak aracılık eder (Reiter 1992).

Gece ve gündüz nispi süreci mevsimlere göre değiştiği için, melatoninin salınması da mevsimlerin seyrine göre değişir. Bazı hayvanlarda üreme kapasitesi mevsime göre değişir ve bu varyasyonun melatonin salınımındaki mevsimsel değişimlerle bağlantılı olduğu tespit edilmiştir (Garcia-Salcedo ve ark 2003).

Hayvanlarda vazoaaktif intestinal polipeptid (VIP), hipofiz adenilat siklaz aktive edici peptid (PACAP) ve opioidler reseptörler yoluyla melatonin salgısını stimüle ederlerken; GABA, nöropeptid Y, dopamin ve glutamat melatonin üretimini inhibe eder (Claustrat ve Lestonb 2015).

1.2.5. Melatonin Fizyolojisi

Melatonin, bitkiler, tek hücreli organizmalar, yosunlar, bakteri, omurgasız hayvanlar ve omurgalılarda yaygın olarak bulunur (Hardeland ve Poeggeler 2003, Iriti ve ark 2010, Stehle ve ark 2011). Onun yaygın geniş dağılımı, pleiotropik işlevlerini yerine getirmesine olanak tanır (Reiter 1991, Tan ve ark 2007, Slominski ve ark 2008, Gomez-Moreno ve ark 2010, Jung-Hynes ve ark 2010, Paradies ve ark 2010, Reiter ve ark 2010, Celinski ve ark 2011). Omurgalılarda, melatoninin rolü çoktur ve şunları içerir; beyin, bağışıklık sistemi, gastrointestinal ve kardiyovasküler sistemler, böbrek ve kemik dokuların ve endokrin organ ve dokuların fonksiyonlarını etkiler ve bir onkostatik ve anti-aging molekül olarak davranır (Yu ve ark 1993, Pandi-Perumal ve ark 2008, Slominski ve ark 2008, Leja-Szpak ve ark 2010, Celinski ve ark 2011).

Melatonin eylemlerinin birçoğuna, spesifik zara bağlı reseptörlerle etkileşim yoluyla aracılık eder. Örneğin, melatonin 1 (Mel-1) reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla antikonvülsan ve vazokonstriktör aktiviteyi ve Mel-2 reseptörlerinin aktivasyonu yoluyla vazodilatasyonunu içerir (Masana ve ark 2002).

Melatonin reseptörleri, nöronal dokularda, GIS'ta, immun hücrelerin çoğunda ve daha az ölçüde de sinir doku dışındaki dokularda bulunur (Bulbulla ve ark 2005, Hardeland ve ark 2011). Memeli dokularında Western blotting ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ve insitu hibridizasyon çalışmaları ile beyin ve periferik organlarda sentezlenen G protein bağlı reseptör üst familyasından iki yüksek afiniteli melatonin reseptörleri belirlenmiştir (Mel-1 ve Mel-2) (Dubocovich ve Markowska 2005). Üçüncü bilinen melatonin reseptörü mel-3 olarak adlandırılır ve hamster beyin örneklerinden izole edilmiştir; bu bir G protein bağlı reseptör değildir ve diğerlerine nispeten düşük bir melatonin afinitesine sahiptir (Boutin 2007). Vücut boyunca melatoninin lokal üretimi ve reseptörlerinin yaygın dağılımı farklı fizyolojik süreçlerin düzenlenmesine katkı sağladığını düşündürmektedir (Chunjin ve Zhou 2015). İnsanlarda ve hayvanlarda bulunan G protein bağlı reseptörler (GPCR)'ler mel-1 reseptörüdür (eskiden Mel-1a) ki onlar MTNR1A geni tarafından kodlanır, Mel-2 reseptörü ise (eskiden Mel-1b) MTNR1B geni tarafından kodlanır (Brydon ve ark 1999, Dubocovich ve ark 2010).

Mel-1, Mel-1a olarak ve Mel-2, Mel-1b olarak da bilinir (Dubocovich ve ark 1998, Dubocovich ve ark 2010). Her ikisi de G proteine bağlı, serpen transmembran reseptör ailesine aittir (Dubocovich ve ark 2003, Witt-Enderby ve ark 2003). Reseptör türüne bağlı olarak, Gi veya Gq'nın aktivasyonu, adenilat siklaz, fosfolipaz C ve A2, potasyum ve kalsiyum kanalları ve guanil siklaz aktivitelerini modifiye ederek hücre içi sinyalleşmeye aracılık eder (Pandi-Perumal ve ark 2008).

Mel-1 reseptörü (Mel-1c) yaklaşık 20 yıl önce kurbağalarda klonlanmıştır (Ebisawa ve ark 1994). Mel-1 reseptörü uzunluğu 350 amino asittir ve Gi'ye, özellikle Gia2, Gia3 ve Gq/11'e bağlanmıştır. Mel-1 reseptörleri beyinde, kardiyovasküler sistem (periferik kan damarları, aorta ve kalp dahil), bağışıklık sistemi, testisler, overler, deri, karaciğer, böbrek, adrenal korteks, plasenta, meme, retina, pankreas ve dalakta eksprese edilir (Dubocovich ve Markowska 2005, Slominski ve ark 2005, Fischer ve ark 2008, Pandi- Perumal ve ark 2008, Slominski ve ark 2008). Beyindeki reseptör ağırlıklı olarak, hipotalamusta, serebellumda, hipokampusta, substantia nigra ve ventral tegmental alanda bulunur (Pandi-Perumal ve ark 2008).

Mel-2, bağışıklık sisteminde, beyinde (hipotalamus, SKN, hipofiz), retina, kan damarları, testisler, böbrek, GIS, meme bezleri, yağ dokusu ve ciltte bulunur (Roca ve ark 1996, Dubocovich ve Markowska 2005, Slominski ve ark 2005). Gen iki ekzon ve bir intron içerir ve son translate protein ürünü 363 amino asitten oluşur ve Mel-1 reseptörüne %60 homoloji gösterir (Reppert ve ark 1996). Mel-2 reseptörü ayrıca bir G proteini ile ilgili ve Gi'nin aktivasyonuna çiftler.

Melatonin reseptörü (MRR) veya GPR50 olarak adlandırılan bir reseptör, melatonin reseptörleri için %45 amino asit homolojisi vardır (Dufourny ve ark 2008). Bu homolojiye rağmen, melatonin GPR50'ye bağlanmaz ve gerçek ligandının kimliği belirsizdir (Reppert ve ark 1996).

Mel-3 reseptörü henüz insanlarda bulunmamasına rağmen, hamsterda eksprese edilmiştir (Nosjean ve ark 2001). En yüksek düzeyde kalpte, yağ dokusunda ve beyinde; orta miktarda karaciğer ve böbreklerde bulunmuştur (Nosjean ve ark 2001). Tavşanın retinasında da eksprese edilir (Pintor ve ark 2001). Mel-3 reseptörünün özellikleri arasında şunlar bulunmaktadır: Mel-1 ve Mel-2'den farklı olarak, afinitesi düşük veya 2- [125I] iyodomelatonin vardır (Reppert ve ark 1996), G proteinlerine bağlanmaz melatonin için nanomoleküler bir özellik taşır ve Na⁺, Mg²⁺, Ca²⁺'ye duyarlı değildir (Dubocovich 1995). Nosjean ve ark (2000), Mel-3'ün quanin oksidoredüktaz (NQO2)'ye eş değer olduğunu bildirmişlerdir (Nosjean ve ark 2000). Mel-3 reseptörünün modülatörleri, en düşükten en yükseğe sıralanarak melatonin, resveratrol ve bileşik S29434'tür (Ferry ve ark 2010).

1.2.6. Endokrin Sistemde Melatonin

Melatonin retina ve barsakta otokrin veya parakrin özellikler sergilese de ana fizyolojik fonksiyonları hormonal özellikleri ile ilişkilidir (Claustrat ve Lestonb 2015).

Melatonin, endokrin sistemin düzenlenmesinde anahtar roller oynamaktadır. Bu roller, gonadotropin salınım hormonu (GnRH) salınımının düzenlenmesi, oksitosin sekresyonunun uyarılması, progesteron sentezinin serbest bırakılmasının teşvik edilmesi, kortizol üretiminin düzenlenmesi ve androjen üretiminin teşvik edilmesini içermektedir (Schaeffer ve Sirotkin 1995, Balik ve ark 2004, Tamura ve ark 2008, Tamura ve ark 2009).

Melatoninin GnRH, LH ve FSH düzeylerini düşürdüğü bulunmuştur (Lang ve ark 1983). Vanecek ve Vollrath melatoninin cAMP ve cGMP üretiminin inhibisyonunun GnRH salınımının inhibisyonuna neden olduğunu bulmuşlardır (Vanecek ve Vollrath 1990). Ayrıca, melatoninin inhibe edici etkisinin 14 günlük yaştan küçük sıçanlarda daha belirgin olduğunu keşfetmişlerdir (Vanecek ve Vollrath 1990).

Melatoninin progesteron salınımını teşvik ettiği keşfi 25 yıl önce Webley ve Luck tarafından yapılmıştır (Webley and Luck 1986).

Mel-1 reseptörlerinin, capuchin maymunun adrenal bezlerinde kortizol üretimini doğrudan inhibe ettiği bulunmuştur (Torres-Farfan ve ark 2003).

Balık ve meslektaşları, melatoninin salınımının kalsiyum salınımını önleyerek GnRH salınımını engellediğini bildirmişlerdir (Balık ve ark 2004). Bununla birlikte, bu araştırmacılar, melatoninin kendiliğinden kalsiyum salınımını engellemediğini, bunun yerine bu eylem için melatonin reseptörüne bağlı olduğunu belirtmektedir (Balık ve ark 2004).

Sıçan Leydig hücrelerinin melatonine maruz kaldıklarında testosteron salınımı ve cAMP üretiminin doza bağımlı bir şekilde inhibe edildiği görülmüştür (Stojilkovic ve ark 1989).

1.2.7.Melatoninin Sistemik Etkileri

Melatonin, demir, lipopolisakkaritler ve nitrik oksitle (NO) uyarılan lipid peroksidasyonunda baskılanma ile DNA, lipidler ve proteinler üzerinde koruyucu etki gösterir (Naidu ve ark 2003). Dahası melatoninin, metil fenil tetrahidropüridin (MPTP) adı verilen ve Parkinson hastalığının semptomlarının kalıcı halde görülmesine yol açan bir nörotoksine ve beta amiloid peptidlerine bağlı hücre ölümünü engellediği gösterilmiştir (Naidu ve ark 2003).

Malhotra ve ark (2004), 2-20 mg/gün olarak değişen melatonin dozlarında uyku kalitesinde iyileşme, uykuya dalmada hızlanma, uykunun devamının sağlanmasında iyileşme rapor etmişler, ancak benzodiazepinlerin tersine hafızada anlamlı bir değişiklik oluşmadığını da belirtmişlerdir (Malhotra ve ark 2004). Buna

ilave olarak, melatoninin kulak çınlamasını rahatlatarak gene uyku kalitesini artırdığı bildirilmiştir (Pirodda ve ark 2010, Hurtuk ve ark 2011).

Melatonin, osteoblastik farklılaşmayı ve kemik güçlenmesini artırdığı için kemiklerde terapötik etkinliğe sahiptir (Roth ve ark 1999). Cardinali ve ark (2003), melatoninin yalnızca osteoblastik aktiviteyi artırmakla kalmayıp osteoklastları inhibe ettiğini ve hatta osteoblastik protein osteoproteini teşvik ettiğini bildirmiştir (Koyama ve ark 2002, Cardinali ve ark 2003).

Quiroz ve ark (2008), melatoninin böbrekleri böbrek hasarına neden olabilen böbrek hücrelerinden koruyabileceğini belirtmiştir (Quiroz ve ark 2008). Melatonin, böbrekleri oksidatif hasar verici civa klorürden korur ve glomerüler filtrasyonu düzenleyebilir (Drew ve ark 1998, Nava ve ark 2000).

Pineal hormon olan melatonin kas tonusunu azaltabilir ve tensor timpani kas spazmını hafifletebilir böylece semptomları iyileştirebilir (Miroddi ve ark 2015). Melatonin avantajlı vasküler değişiklikler uygular, hipoksiden iç kulağı koruyarak labirent perfüzyonu geliştirir (Miroddi ve ark 2015).

Melatonin ayrıca reseptör aracılı mekanizmalar yoluyla, örneğin reaktif oksijen türleri (ROS) ve reaktif azot türleri (RNS) için bir temizleyici olarak görev yapmaktadır (Gomez-Moreno ve ark 2010). Melatoninin temizleyici etki gösterdiği reaktif türler arasında hidroksil radikali (HO⁻), hidrojen peroksit (H₂O₂), nitrik oksit (NO) ve diğerleri bulunur (Tan ve ark 1993, Tan ve ark 2001, Galano ve ark 2011).

Ayrıca son çalışmalar, melatoninin analjezik (Caumo 2007, Borazan ve ark 2010), anksiyolitik (Caumo ve ark 2007), antiinflamatuvar (Gitto ve ark 2004, Sener ve ark 2005, Yavuz ve ark 2007, Wu ve ark 2008, Lowes ve ark 2011, Agil ve ark 2013, Mauriz ve ark 2013) ve antioksidatif etkileri olduğunu göstermiştir (Harpsqe ve ark 2015). Melatonin, geniş spektrumlu bir antioksidan olmanın yanı sıra sitoprotektif enzimleri de aktifleştirebilir (Rodriguez ve ark 2014). Hem fizyolojik hem de farmakolojik konsantrasyonlarda melatonin oksidatif stresi hafifletir veya bunlara karşı koyar ve hücrel metabolizmayı düzenler (Slominski ve ark 2005, Tan ve ark 2007, Slominski ve ark 2008, Korkmaz ve ark 2009). Melatoninin bu koruyucu etkilerinden bazıları, metabolitleri anti faşist mücadele komiteleri (AFMK) tarafından paylaşılır (Tan ve ark 2007). Yetişkin insanlarda melatoninin analjezik

olarak kronik ağrılı hastalıkların tedavisinde kullanılmıştır (Mozaffari ve ark 2010). Melatoninin antiinflamatuvar etkisi onun doku hasarını hafifletme yeteneğine bağlıdır ve nörodejeneratif hastalıklar dahil inflamatuvar cevapların önemli bileşenler olduğu durumlarda geçerlidir. Bazı antiinflamatuvar özellikler sirtuin 1 (SIRT1) aktivasyonu ile ilişkilidir. Örneğin; bir tavşan osteoartrit modelinde H₂O₂ ile uyarılmış insan kondrositleri üzerinde gerçekleştirilen bir çalışmada melatoninin hücre koruyucu ve antiinflamatuvar etkileri görülmüştür. Yazarlar ayrıca SIRT1 ekspresyonunun SIRT1 küçük interferans RNA (siRNA) ile transfeksiyonu üzerinden baskılanmasının ve sirtinolle SIRT1 aktivasyonunun bloke edilmesinin melatoninin proinflamatuvar sitokinler üzerindeki hidrojen peroksit aracılı uyarısını ve inflamasyon mediatör ekspresyonu üzerindeki etkilerini tersine çevirdiğini belirtmişlerdir. Melatonin ayrıca hidrojen peroksit ile uyarılmış fosfatidilinozitol 3-kinaz/protein kinaz 38 (PI3K/Aktp38) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) fosforilasyonu ile ve nükleer faktör kappa B (NF-kB) aktivasyonuna da aracılık eder, bu etkilerini sirtinol ve SIRT1 siRNA ile tersine çevirir. Bu bulgular melatoninin hücre koruyucu ve antiinflamatuvar özelliklerinin SIRT1 yolağının dinamik etkilerini kapsadığını düşündürmektedir (Lim ve ark 2012).

Yapılan çalışmalar melatoninin hücre içi ROS oluşturabileceğini göstermektedir (Alberti ve ark 2006). Melatonin ayrıca çeşitli antioksidan enzimleri (süperoksit dismutaz (SOD) dahil) aktive eder, çeşitli koruyucu enzimler için aracılık eder (Reiter ve ark 2000).

Melatoninin hücre içi kompartmanlardaki konsantrasyonları değişiklik göstermekle birlikte en yüksek düzeyleri membranlar ve mitokondride bulunur ki buralarda lipidlerle etkileşir, tüm hücrel membranları stabilize eder (Martín ve ark 2000, Paradies ve ark 2010) ve lipid peroksidasyonunu azaltır (García ve ark 2014). Bu etkiler melatoninin iç mitokondri zarında elektron transport zincirleri (ETZ) aktivitesini geliştirme ve ATP üretimini artırma yeteneğini yansıtır (Acuña Castroviejo ve ark 2001). Antioksidan ve serbest radikal yakalayıcı kapasitesi üzerinden melatonin ETZ'deki proteinleri ve DNA'yı oksidatif stresten korur (Karbownik ve ark 2000).

Ek olarak, melatonin güçlü bir serbest radikal yakalayıcıdır (Tan ve ark 1993) ve ortaya çıkan metabolitlerin de ROS ve RNS yakalayabilme yetenekleri vardır

(Allegra ve ark 2003, Galano ve ark 2013, Tan ve ark 2014). Onun serbest radikal yakalayıcı yeteneği, melatonin ve metabolitlerinin toksik serbest radikal ve reaktif oksijen metabolitleri ve reaksiyonları ile açıklanabilir (Rodriguez ve ark 2004, Fischer ve ark 2013, García ve ark 2014). Örneğin; bu güçlü antioksidan kapasite ile ilişkili olarak melatonin, ciltte yaşlanmaya yol açan başlıca çevresel stres etkeni olan solar UV radyasyona karşı etki gösterebilir veya bu etkileri değiştirebilir. Bu yüzden endojen cilt içi melatonin ile topikal olarak uygulanan melatonin veya metabolitlerinin UV ile uyarılan cilt yaşlanması ve fotokarsinogeneze karşı bu antioksidan savunma sistemlerinden birini göstereceği beklenebilir (Fischer ve ark 2008, Kleszczynski ve Fischer 2012, Fischer ve ark 2013, Janjetovic ve ark 2014).

Sonuç olarak melatonin, sirkadiyen ve endokrin düzenlemeler de dahil olmak üzere, yaşlanma, immun fonksiyonların uyarılması, antibiyotiklerin yan etkilerinden korunma ve böbrek yetersizliği gibi çeşitli fizyolojik süreçlerde önemli bir rol oynar (Parlakpınar ve ark 2002).

Ayrıca melatonin sindirim sisteminde çinkonun emilimini artırır (Baltacı ve ark 2004). Pinealektomize ratlarda plazma çinko seviyelerinde azalma veya melatonin uygulandığında artma (Bediz ve ark 2003), çinko ve melatonin arasında ilişkinin kanıtı olarak gösterilebilir (Baltacı ve ark 2004). Barsakta melatoninin spesifik bağlanma yerlerinin varlığı, çinkonun emilimini artıran bu hormon tarafından esas mekanizma olarak kabul edilmiştir (Fabris ve ark 1997, Mocchegiani ve ark 1996).

1.3. Çinko

Çinko demirden sonra bütün canlı organizmalar için hayati önem taşıyan ikinci en sık rastlanan eser elementtir. Çinko +2 değerli bir katyondur ve fizyolojik koşullarda bir aktif-indirgenen değildir. Bu durum çinkonun birtakım biyolojik süreçlerde muhtelif fizyolojik roller oynamasını açıklar (Qiao ve ark 2006, Fahrni 2007, Vinkenborg ve ark 2009, Tomat ve Lippard 2010, Qin ve ark 2011, Huang ve ark 2012).

Çinkonun çeşitli biyoaktif rollerini yerine getirebilmesi için, çinkoyu biyolojik zarlardan taşıyacak birtakım özel sistemler gereklidir. Bu sebeple çinko taşıyıcı proteinler çinko fizyolojisi için vazgeçilmezdir. Özellikle çinko taşıyıcı

protein (ZnT) ve Zrt-ve Irt- benzeri proteinler (ZIP), çinko homeostazını sıkıca kontrol ederek bağışıklık, endokrin, üreme, iskelet ve sinir sistemine dair çok geniş bir hücrel ve fizyolojik fonksiyon aralığına katkıda bulunurlar. İnsanlardaki bu homeostazın fizyolojik önemi, kalıtsal hastalıkların yıkıcı sonuçları ile karşımıza çıkar (Fukada ve Kambe 2011, Fukada ve ark 2011, Kambe 2013, Kambe ve ark 2014).

1.3.1. Çinkonun Yapısal Özellikleri

İlk kez Raulin tarafından önemli bir eser element olarak biyolojik aktivitesi açıklanan, atom ağırlığı 65.4, atom numarası 30, yoğunluğu 17, erime noktası 420°C, kaynama noktası 907°C, olan çinko, mavimsi beyaz renkte bir element olup dünya üzerinde bol miktarda bulunmaktadır (Chandra 1983). Çinko, gelişme, büyüme, DNA sentezi, bağışıklık sistemi ve diğer önemli hücrel süreçler için gerekli bir elementtir (Vallee ve Auld 1993, Wood 2000, Oh ve Chung 2012).

Çinko hücre bölünmesi ve farklılaşmasını güçlü bir şekilde etkileyen önemli bir besindir (Coleman 1992). Çinko potansiyel olarak hücrel sinyal tanıma, ikinci haberci metabolizması ve protein kinaz ve protein fosfatazin fonksiyonunu modüle edebilir (Beyersmann ve Haase 2001). Aynı zamanda bu element yaklaşık 300 enzim için gereklidir (Tapiero ve Tew 2003).

1.3.2. Bir Eser Element Olarak Çinko

Çinko hayat için vazgeçilmez bir eser besin kaynağıdır. Çinkonun canlı organizmalar için önemi ilk kez 1869'da *Aspergillus niger*'de tespit edilmiştir (Raulin 1869). Sonrasında çinkonun, bitkilerin (Maze 1914), sıçanların (Todd ve ark 1934) ve kuşların normal gelişimleri (O'Dell ve ark 1958) için gerekli olduğu bulundu. Fakat beslenme kaynaklı çinko eksikliğine bağlı ağır anemi, büyüme geriliği, hipogonadizm, cilt anormallikleri ve zeka geriliği semptomları gösteren insanlar için çinkonun temel bir mikro besin kaynağı olduğu 1961'e kadar bilinmiyordu (Prasad ve ark 1961).

Bu ufuk açıcı bulgudan sonra, akrodermatitis enteropatika (AE), kellik, tat duyu bozuklukları, bağışıklık yetersizliği, beyin disfonksiyonları, yara iyileşmesinde gecikme, iştah kaybı, kronik inflamasyon, karaciğer hastalığı, duygusal dengesizlik,

irritabilite ve depresyon gibi nörofizyolojik değişiklikler içeren çinko eksikliğine bağlı birçok semptom tanımlanmıştır (Prasad 1985, Vallee ve Falchuk 1993, Hambidge 2000, Maret ve Sandstead 2006, Devirgiliis ve ark 2007, Takeda ve Tamano 2009, Sandstead 2013).

Çinko eksikliği halen azımsanmayacak düzeyde bir küresel halk sağlığı problemi olmayı sürdürmektedir (Sandstead 1991, Hambidge 2000, Prasad 2003). Çinko eksikliğinin, gelişmekte olan ülkelerdeki küçük çocukların küresel bazda morbidite ve mortalitesinin %4'ünden sorumlu olduğu tahmin edilmektedir (Penny 2013). Bunun tersine endüstrileşmiş ülkelerde çinko eksikliği yaşlı popülasyonda bir artış göstermektedir. İnsanlarda çinko takviyesi çocuklarda ishal kaynaklı ölümleri ve enfeksiyon görülme sıklığını azaltma ve bağışıklık sistemini geliştirme potansiyeline sahiptir (Haase ve ark 2006, Prasad ve ark 2007, Tuerk ve Fazel 2009, Penny 2013). Buna ek olarak çinko takviyesinin pozitif etkileri, çocuklarda kilo artışı ve gelişme konulu çalışmalar (Brown ve ark 2002) ve yaşlılarda ise maküler dejenerasyonu önleyerek körlük sıklığını azaltma konulu çalışmalarla gösterilmiştir. Çinko düşük toksisiteye sahiptir ve genel olarak güvenli kabul edilmektedir ancak çinkonun aşırı miktarları bakır emiliminin azalmasına yol açması sebebiyle toksik olabilir (Broun ve ark 1990).

1.3.3. Biyokimyasal Yönden Çinko

Çinko biyokimyasal olarak yapısal, katalitik ve haberleşme sağlayıcı bir bileşen olarak anahtar roller oynar. Proteinlerin yapısal bir bileşeni olarak çinkonun protein/peptitlerle olan ilişkisi ilk olarak insülinin çinko ile kristalleştirilmesi yoluyla doğrulandı (Scott ve Fisher 1938). "Çinko parmak" motifi ilk kez Xenopus'un transkripsiyon faktörü TFIIIA'sında bulundu (Miller ve ark 1985). Çinko parmaklar günümüzde 20'den fazla yapısal farklılık gösteren modül sınıfı şeklinde gruplara ayrılmıştır ve çeşitli proteinler, lipidler ve nükleik asitlerle etkileşen fonksiyonel bir motif olarak bilinmektedirler (Berg ve Shi 1996, Laity ve ark 2001, Krishna ve ark 2003, Gamsjaergeve ark 2007, Andreini ve ark 2011). Bu durum çinkonun hücresel biyokimya için önemine işaret eder. Kuvvetli bir Lewis asiti olması sebebiyle çinko, katalitik fonksiyonlarda, negatif yükleri stabilize ederek enzimlerdeki substratları aktive edebilir (Keilin ve Mann 1939, Maret 2004).

Çinko bağımlı bir enzim olarak eritrosit karbonik anhidrazda çinkonun ilk kez belirlenmesini takiben, enzim komisyon (EC) sisteminde 6 sınıfta sınıflandırılan enzimin pek çoğunda çinkonun aktivatör özelliği tanımlanmıştır (Vallee ve Auld 1990, Vallee ve Falchuk 1993, Andreini ve Bertini 2012).

1.3.4. Hücreler Arası İletişim ve Çinko

Yukarıda tanımlanan rollere ek olarak çinko bir sinyalleşme sağlayıcı olarak da işlev görür ki bu da çinkonun “21. yüzyılın kalsiyumu” olduğu düşüncesine temel oluşturur (Frederickson ve ark 2005). Çinkonun sinyalleşme ile ilgili fonksiyonları uyarılarla tetiklenen çinko (Zn^{+2}) konsantrasyonu artışı ile meydana gelir. Çinko ile aktive edilen sinyalleşme patofizyolojik fonksiyonlarla ilişkilidir (Hirano ve ark 2008, Fukada ve ark 2011) ve bu sebeple terapötik potansiyele sahiptir. Endokrin, parakrin ve otokrin sistemlerde çinkonun hücre dışına salınması bir sinyalleşme sağlayıcı olarak rol oynar. Merkezi sinir sisteminde, sinaptik boşlukların uyarılması üzerine presinaptik nöronlardan salınan çinko, çeşitli taşıyıcılara ve postsinaptik nöronlardaki reseptör kanallarına bağlanarak sinaptik iletimi yürütür (Frederickson ve ark 2005, Sensi ve ark 2009, Takeda ve ark 2013). Glukoz uyarısı ile insülinle beraber pankreatik beta hücrelerinden eş zamanlı salınan çinko, hepatik insülin klirensini baskılayabilir (Tamaki ve ark 2013) ve beta hücrelerinden insülin salınımını azaltabilir (Ghafghazi ve ark 1981, Tamaki ve ark 2013). Çinko hücre dışına salındığında çeşitli hücre yüzeyi proteinlerine bağlanır ve en ilgi çekici olan protein çinko reseptörü- protein eşlenmiş reseptör 39 (GPR39)’dur (Besser ve ark 2009, Sharir ve ark 2010).

Çinko sitozolde sekonder ulak olarak hayati bir sinyalleşme rolüne sahiptir (Hirano ve ark 2008, Fukada ve ark 2011). Çinko sinyalleşmesi hücre dışı bölgeler ve hücre içi organellerden başlayan hücre içine çinko akımı ile meydana gelir. Endoplazmik retikulumu (ER) da içeren çekirdek etrafı alandan salınan çinko “çinko dalgası” olarak adlandırılır ve hücre sinyalleşme fonksiyonları için önemli olduğu gösterilmiştir (Yamasaki ve ark 2007, Taylor ve ark 2012). Ek olarak, oksidatif uyarılar aracılığıyla metallotionin (MT) gibi oksidasyon duyarlı çinko bağlayıcı bölgeler içeren sitozolik proteinlerden serbest bırakılan çinko da hücre içi çinko sinyalleşmesinde yer alır (Haase ve Maret 2005, Aras ve Aizenman 2011). Hücre içi çinko sinyalleşmesi, rol oynadığı zaman skalasına göre çeşitli sınıflara ayrılır (Hirano

ve ark 2008, Haase ve Rink 2009, Fukada ve ark 2011, Haase ve Rink 2014). “Hızlı” ya da “erken” çinko sinyalleşmesi uyarıdan saniyelerle dakikalar sonrasında meydana gelir ve protein yazılımını gerektirmez (Yamasaki ve ark 2007, Haase ve ark 2008). Bunun tersine “geç” çinko sinyalleşmesi, sitozolik çinko konsantrasyonlarını kontrol etmek için protein biyosentezini gerektirir ve uyarıdan saatler sonrası bir süreçte meydana gelir (Kitamura ve ark 2006). “Geç” çinko sinyalleşmesi ifadesi genellikle “hızlı” ya da “erken” çinko sinyalleşmesi ifadesine zıt olarak kullanılır. Bu terim, sinyalleşme olaylarını değil, gen ekspresyonundaki değişiklikler sonrası meydana gelen buna bağlı etkileri tanımlamaktadır. Önemli olarak, hücre içi çinko sinyalleşmesi, hücre içi sinyalleşmeye dahil olan protein tirozin fosfatazlar (PTPs) (Brautigan ve ark 1981, Wilson ve ark 2012), fosfodiesterazlar (PDEs) (Von Bulow ve ark 2005, Hojyo ve ark 2011), kalsinörin (Aydemir ve ark 2009), kaspazlar (Velazquez-Delgado ve Hardy 2012, Miyai ve ark 2014) ve mitojenle aktive olan protein kinaz (MAPK) ve protein kinaz C (PKC)’yi içeren çeşitli kinazlar gibi birtakım enzimleri hedef alır (Csermely ve ark 1988, Hansson 1996). Hücre içi serbest Zn^{+2} konsantrasyonlarının fizyolojik düzeyleri bu enzimleri regüle eder (Maret ve ark 1999, Haase ve Maret 2003). PTP’lerin aktivitesinin çinko tarafından inhibisyonu genellikle hücre içi çinko sinyalleşmesinde çalışır. Kaspaz-9’un enzimatik aktivitesi, çinkonun, aktif bölgelerdeki sistein ve histidin artıklarına bağlanması ile geri dönüşümlü şekilde inhibe olur (Huber ve Hardy 2012) ve PTP’ler gibi diğer enzimlerde de benzer geri dönüşümlü mekanizmalar çalışır (Haase ve Maret 2005). Özel olarak PTP-1B aktivitesinin çinko ile inhibisyonu muhtemelen bir sistein fosfat aracı yoluyla olur (Bellomo ve ark 2014).

1.3.5. Çinko Homeostazi

Erişkin insan vücudu yaklaşık 2-3 gram çinko içerir. Çinkonun yaklaşık %60’ı iskelet kasında, yaklaşık %30’u kemikte, %5’i karaciğer ve ciltte, kalan %2-3’ü de diğer dokularda depolanır (Jakubowski ve Kornfeld 1999). Serumdaki çinko vücuttaki çinkonun yalnızca yaklaşık %0,1’ini içerir; bunun %80’i gevşek şekilde albumine, %20’si sıkı şekilde alfa2 makroglobuline bağlıdır (Reyes 1996, Barnett ve ark 2013). Vücuttaki çinkonun yaklaşık %0,1’i günlük olarak diyetle yenilenir. Çinkonun duodenum ve jejunumdaki emilimi sıkı şekilde düzenlenmektedir ve

diyetteki çinko azaldığı zaman (Taylor ve ark 1991) %90'a kadar artabilmektedir. Bununla birlikte fazlalığı durumlarında çinko atılımı, gastrointestinal salgı, mukozal hücre ve kabukların dökülmesi ve renal boşaltım ile sağlanır (Hambidge ve Krebs 2001, Krebs 2013). İnsanlar tüm vücut çinko düzeyini alımın 10 katına kadar düzeylerde düzenleyebilme yeteneğine sahiptir (King ve ark 2000).

1.3.6. Hücresel Çinko Dağılımı

Hücrelerde çinkonun %50'si sitoplazmaya, %30-40'ı çekirdeğe, %10'u zara dağılmıştır (Thiers ve Vallee 1957, Haase ve Rink 2014). Toplam hücresel çinko konsantrasyonunun 10 ile 100 mikromolar aralığında değiştiği düşünülmektedir (Palmiter ve Findley 1995, Krezel ve Maret 2006, Colvin ve ark 2008). Çinko birçok proteine bağlıdır ve organeller ve veziküllerde depolanır. Bu sebeple sitozolik labil “serbest” çinko iyon konsantrasyonu çok düşüktür ve pikomolar ve düşük nanomolar aralıkta olduğu düşünülmektedir (Sensi ve ark 1997, Outten ve O'Halloran 2001, Vinkenborg ve ark 2009, Qin ve ark 2011).

Hücre içi organellerdeki serbest çinko konsantrasyonu mitokondride 0,14 pM, (Park ve ark 2012), mitokondri matriksinde 0,2 pM, (McCranor ve ark 2012), ER'de 0,9 pM, Golgi'de yaklaşık 0,2 pM'dir (Qin ve ark 2011). Bununla birlikte mitokondride yaklaşık 300 pM ve ER'de 5nM şeklinde daha yüksek konsantrasyonlar da tanımlanmıştır (Chabosseau ve ark 2014).

Hücresel ve hücre altı çinko metabolizması, ZnT ve ZIP taşıyıcılarının temel rol oynadığı, alım, dağılım, depolama ve atılımın sofistike bir şekilde düzenlenmesi aracılığı ile yürütülmektedir. Bu taşıyıcılar tarafından hücre içi veziküller ve organeller arasında gerçekleştirilen çinko mobilizasyonu aynı zamanda sitozolik çinko homeostazındaki düzensizlikleri gidermede etkindir. Bu düzenlemeler “tamponlama” ve “söndürme” terimleri ile adlandırılır (Colvin ve ark 2010, Maret 2011). Tamponlama ve söndürme çinko miktarının fazla olduğu durumlarda ve çinko iyonu dalgalanmalarında rol oynar (Maret 2013).

1.3.7. Hücrelerdeki Çinko İçeren Veziküller/Granüller

Çinkonun kendine has bir özelliği çok miktarda şelasyon edilebilen ve serbest çinkonun pek çok hücrede ve dokuda birikmesidir. Bunlardan en sık bilineni

telensefalik nöronlardır (Haug 1967, Perez-Clausell ve Danscher 1985). Çinkonun yaklaşık %20'si hipokampus ve serebral kortekste birtakım glutamaterjik nöronların sinaptik vezikülleri içinde bulunur (Cole ve ark 1999). Sinaptik veziküllerden salınan çinkonun yaklaşık 100 mikrometre (Vogt ve ark 2000) hatta bazen 300 mikrometreye (Assaf ve Chung 1984) kadar ulaştığı hesaplanmaktadır. Prostat, çinko (Mawson ve Fischer 1951, Gyorkey ve ark 1967) birikiminin diğer yumuşak dokulara kıyasla yaklaşık 3-15 kat daha fazla bulunduğu bir diğer dokudur (ortalama 200 nmol çinko/gram ıslak ağırlık) (Franz ve ark 2013). Bununla beraber yüksek çinko düzeyleri prostat kanserinde ve karsinomlarında (Ghosh ve ark 2010) belirgin şekilde düşüş gösterir. Bu da çinkonun düzgün prostat metabolizması için önemine işaret eder (Costello ve Franklin 2011). Çinko yüksek düzeylerde pankreas beta hücrelerinde birikir (Zalewski ve ark 1994). Bu durum insülin kristalizasyonu için gereklidir. Benzer şekilde, yüksek çinko konsantrasyonu, ön pitüiter hücrelerin büyüme hormonu içeren yoğun özlü salgı granüllerinde de belirlenmiştir (Thorlacius-Ussing 1987, Petkovic ve ark 2013). Aynı şekilde submandibüler tükürük bezi epitelyum ve miyoepitel hücrelerinde (Frederickson ve ark 1987), sperm hücrelerinde (Danscher ve Zimmer 1978), pankreatik egzokrin hücrelerinde (Kristiansen ve ark 2001), retinadaki pigment epitel hücrelerinde (Akagi ve ark 2001), ince barsaktaki paneth hücrelerinde (Muller ve Geyer 1969), ve mast hücrelerinde (Gustafson 1967) de yüksek çinko konsantrasyonu mevcuttur.

1.3.8. Beyinde Çinko

Çinko beyin olgunlaşması ve fonksiyonları için gereklidir (Pullen ve ark 1991, Takeda ve ark 1994) ve total çinkonun yaklaşık %10-15'i beyindedir (Frederickson ve Danscher 1990). Total beyin çinkosunun yaklaşık %90'ı çinko proteinlerine bağlıdır (Frederickson 1989) geri kalanı %10'u glutamat içeren sinaptik veziküllerin lümenine yerleşmiştir (Palmiter ve ark 1996). Veziküler çinko muhtemelen iyonik çinkodur, memeli beyinde sinaptik sinir iletiminde rol oynayabilir ve alfa -amino-3-hidroksi-5 metil-4 isoxazoleprepiyoniz asit (AMPA) a/A kainat reseptörü, N-metil- D-aspartat (NMDA), GABA reseptörleri de dahil olmak üzere çeşitli önemli reseptörlerin endojen nöromodülatörü olarak hizmet edebilir (Harrison ve Gibbons 1994, Smart ve ark 1994, Huang 1997). Beyin çinko konsantrasyonu çocukluk

döneminde serebellumda daha yüksek iken yetişkin dönemde hipokampusta daha yüksektir (Takede 2000).

Merkezi sinir sisteminde (CNS)'de, çinkonun çoğu makromoleküllere sıkıca bağlıdır ya da konakçı proteinlerin 3D görünümünün bir stabilizatör belirleyicisi olarak ya da çok miktarda enzimlerin kofaktörü olarak hizmet verir (Christianson 1991, Coleman 1992). Nöronlar tarafından alınan çinko aksonal transport sistem aracılığıyla anterograd ve retrograd taşınır (Takeda ve ark 1997, Takeda ve ark 1998). Nöronlar veziküllerdeki serbest ya da gevşek bağlı çinkoyu ayırırlar, onların presinaptik düğümleri, çinko zenginleştirilmiş nöronlar (ZEN) veya çinko içeren nöronlar (Frederickson 1989, Frederickson ve Danscher 1990) ya da çinko-erjik nöronlar olarak tanımlanır (Wang ve Dahlsröm 2008). ZEN nöronlarında veziküler çinko, çeşitli histokimyasal yöntemlerle görülebilir. Şimdiye kadar çalışmalar tüm merkezi sinir sistemi içinde ZEN terminallerinde önemli miktarda çinko iyonlarının varlığını göstermiştir, fakat bu çinko havuzunun fonksiyonu hakkında bilinenler çok azdır (Wang ve Dahlsröm 2008). Genel olarak CNS'de ZEN nöronlarının en azından beş özelliği özetlenebilir: 1) (ön beyin) glutamaterjik nöronlarının bir alt kümesidir 2) sinaptik veziküllerde serbest ya da gevşek bağlı çinko iyonlarını içerir 3) veziküler membranlarda ZnT3 proteinine sahiptirler 4) histokimyasal olarak saptanabilir ve 5) çeşitli sinaptik aktivitelere sahip olabilirler (Wang ve Dahlsröm 2008). Genel görüşün aksine ZEN nöronlar periferel sinir sisteminde de mevcuttur (Wang ve Dahlsröm 2008).

Hipokampal ve amigdalalar yüksek yoğunlukta çinko içeren nöron terminallerine sahiptir (Christiansen ve Frederickson 1998, Frederickson ve ark 2000). Şimdiye kadar tüm çinko içeren nöronların glutamaterjik olduğunun kabul edildiği bildirilmiştir (Crawford ve Connor 1973). Ancak glutamaterjik nöronların hepsi çinko içermez (Frederickson ve Moncrieff 1994). Çinko içeren glutamaterjik nöronların nöronal devrelerinin epizodik bellek fonksiyonları ile ilişkili olduğu düşünülmüştür ve bu, davranış, duygusal ifade ve bilişsel anımsatıcı işlemler için önemlidir (Frederickson ve Danscher 1990, Takeda ve ark 1995). Böylece çinko sadece intranöronal ve intragial fonksiyonlara değil aynı zamanda sinaptik sinir iletimine de hizmet eder. Beyindeki çinko konsantrasyonu büyüme ile artar (Sawashita ve ark 1997) ve yetişkin beyinde sabit kalır (Markesbery ve ark 1984).

Beyinde çinkonun hareketi karaciğer gibi periferel dokulardan daha yavaştır (Kasarskis 1984, Takeda ve ark 1995). Diğer bir deyişle beyin omurilik sıvısı (CSF) ve kan beyin bariyer sisteminin varlığından dolayı çinkonun dolaşımı yavaştır. Çinko kan beyin bariyerine ilave olarak kan CSF bariyeri boyunca beyin içine taşınır (Pullen ve ark 1991, Franklin ve ark 1992). Beyindeki ekstraselüler sıvıdaki çinko konsantrasyonunun neredeyse CSF ile aynı olduğu tahmin edilmektedir (Hershey ve ark 1983, Palm ve ark 1986). Plazmada, ligandlar için çinko bağlayıcı afinite, beyin bariyer sistemi boyunca çinko taşınımı mekanizmasını anlamak için önemlidir. Beyin bariyer sistemi beyinde çinko homeostazisi için önemlidir ve değiştirilmesi nörolojik hastalıklar ve beyin bozuklukları ile ilişkili olabilir (Takeda 2000). Diyet çinko yoksunluğu da mental hastalıklar (Dreosti 1983, Golub ve ark 1995) gibi beyin bozukluklarına ve beyinde çinko homeostazisinin değişimine (Takeda ve ark 2000, Takeda ve ark 2001) yol açar.

1.3.9. Hücre Membranlarında Çinko Transportu

Çinko iyonları pasif difüzyonla hücre membranlarını geçemediğinden hem çinkonun alımında hem de salınımında özel mekanizmalar gereklidir (McMahon ve Cousins 1998). Çinkonun fonksiyonlarını devam ettirebilmek için çeşitli çinko spesifik taşıyıcı proteinler tarafından hücresel çinko seviyeleri sıkıca düzenlenir (Noh ve ark 2014).

Membran boyunca çinko taşınımına iki çinko taşıyıcısının ZIP (SLC39) ve ZnT (SLC30)'nin aracılık ettiği bilinmektedir (Kambe ve ark 2014). ZIP ailesi ekstraselüler alandan ve intraselüler organellerin lümeninden sitozol içine çinko akışında rol oynarken (Colvin ve ark 2003, Kambe ve ark 2014), ZnT ailesi hücresel çinko homeostazisinde karşıt rollere sahiptir.

1.4. Metallothioneinler (MT)

Metallothioneinler, beyinde majör endojen çinko ve bakır bağlayıcı proteinlerdir (Chung ve ark 2010). Metallothioneinler ilk kez 1957 yılında, Margoshes ve Vallee tarafından kadmiyum için yüksek bir afinite gösteren at böbreğinden izole edilmiştir. Bu protein daha sonra yüksek metal ve sistein kalıntıları içerdiğinden dolayı metallothionein olarak adlandırılmış olup (Sutherland ve Stillman 2011), biyokimyasal olarak Kagi ve Valee tarafından karakterize edilmiştir (Manso ve ark 2011). MT'ler

düşük moleküler ağırlıklı, aromatik olmayan amino asitler ve yüksek metal ve sistein içerikli olan ve Zn, Cd, Cu ve Hg de dahil olmak üzere, geçiş metali katyonları ile ilişkili bir proteinler ailesidir (Hamer 1986, Kim ve ark 2003, Tapiero ve Tew 2003, Zatta ve ark 2006). Metallothionein (MT), çok özel bir proteindir: tüm ökaryotlarda ve bazı prokaryotlarda mevcuttur ve etkili bir geçiş metal şelatörüdür (Coyle ve ark 2002, Kang 2006, Krezel ve Maret 2007).

Metallothioneinler in vivo olarak 11 ve 12 metal bağlayabilen, yüksek sistein içeriğine sahip (%30'a kadar), düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir (6000-7000 Da) (Shaw ve ark 1992). İn vivo olarak başlıca bağladığı metaller Zn (II), Cu (II), Cd (II) ve Hg (II) iken, in vitro olarak Ag (I), Au (I), Bi (III), Co (II), Fe (II), Pb (II), Pt (II) ve Tc (IV) bağlayabilir (Stillman 1995).

Sitozolik çinko havuzunun bir bölümü (%5-15 kadar) MT'lere bağlıdır. İnsanlarda yaklaşık 12, farelerde 4 tane metallothionein mevcuttur (Coyle ve ark 2002). MT'ler 20-21 sistein içerir, 61-68 amino asitten oluşur ve farklı afinitelerde 7'ye kadar çinko ve diğer bazı çift değerlikli metal atomlarını birleştirebilir. Çinko bağlayıcı kısım iki bölgeye ayrılır: daha kararlı alfa bölümü ve daha reaktif beta bölümü. İn vivo şartlarda MT'ye bağlanan çinko atomu sayısı heterojendir, örneğin MT'nin yaklaşık %10'u karaciğerde apo-protein olarak mevcuttur (Krezel ve Maret 2007).

Memeli metallothioneinleri küçük proteinlerdir (6-7 kDa), genellikle 61-62 amino asit içerirler (Chiaverini ve De Ley M 2010). Metallothioneinlerde sadece birkaç tane hidrofobik amino asit ve karakteristik olarak aromatik olmayan amino asitler vardır (Kagi 1991). Memeli metallothioneinleri çoğu organlarda temel iz elementlerin homeostazisinde (Zn^{2+} ve Cu) ve ağır metal detoksifikasyonunda (örneğin Cd²⁺ ve Hg²⁺) önemli bir rol oynar (Sabolic ve ark 2010).

Hücre içinde MT'ler stoplazma, mitokondri, çekirdek ve lizozomda tespit edilmiştir (Zalewska ve ark 2014). Hücre dışı metallothioneinlerin süt, amniotik sıvı, pankreatik sıvı, idrar veya plazma gibi çeşitli vücut sıvılarında tespit edilebilir olduğu bilinmektedir (Milnerowicz ve ark 2009, Milnerowicz ve Bizon 2010).

Metallothioneinler, alfa ve beta olmak üzere iki domainden oluşur ve bunların her birinin metal bağlama yetenekleri birbirinden farklıdır (Zlewska 2014). Beta

alanı 9 sistein kalıntısı tarafından 3 kadmiyum veya çinko iyonlarını veya 6 bakır iyonlarını bağlar (Zalewska ve ark 2014). Alfa alanı 11 sistein kalıntısı tarafından 4 çinko veya kadmiyum veya 6 bakır iyonlarını bağlar (Sutherland ve Stillman 2011). Bu fizyolojik durumda metallotioninler daha çok çinko iyonları ile ilişkili gibi görünüyorsa da bu durum metallotioninler için yüksek afiniteli kadmiyum, civa ve bakır gibi diğer metaller tarafından değiştirilebilir (Sabolic ve ark 2010).

Metallotioninlerin en göze çarpan özelliği, hormonlar, sitokinler, büyüme faktörleri, oksidanlar, glukokortikoidler, stress gibi çeşitli uyaranlarla in vitro ve in vivo olarak indüklenebilirliğidir (Kagi ve Kojima 1987, Sato ve Kondoh 2002). Ayrıca metallotioninler Cd, Hg ve Co gibi toksik metal iyonları veya Zn ve Cu gibi temel eser elementler, sitotoksik ve iltihabik etkenler tarafından da indüklenir (Tapiero ve Tew 2003).

İnsan metallotioninleri kromozom 16 üzerinde bulunan multigen ailesi tarafından kodlanmıştır (West ve ark 1990). İnsan metallotionin proteinleri en az 17 yakın ilişkili 7 çinko atomu bağlayan ve 60-80 amino asit içeren, 20 yüksek sistein muhafaza eden gen ürünlerinin bir ailesidir (Tapiero ve Tew 2003). Metallotionin sentezi başlıca emilim ve atılımın yapıldığı organlarda meydana gelir (Bremmer 1991). İnsanda metallotionin fetal nükleerde mevcutken yetişkin karaciğerinde yoktur. Parsiyel hepatektomi sonrası karaciğer yenilenmesinde, metallotioninler stoplazmadan çekirdeğe transloke edilir (Tsujikawa ve ark 1991).

MT'ler genel olarak üç temel süreçte modülatör olarak görevlidir. Bunlar: 1) hidroksil radikalleri veya NO gibi gazlı araçların salıverilmesinde 2) apoptozda 3) çinko, kadmiyum veya bakır gibi değişik metallerin bağlanmasında görevlidir (Zalewska ve ark 2014).

1.4.1. Hücresel Fonksiyonlarda Metallotioninler

Metallotioninlerin çinko ve bakırın hücresel metabolizmasının düzenlenmesinde, kadmiyum, bakır ve civa gibi toksik metallerin detoksifikasyonunda ve nitrik oksit ve serbest hidroksil radikallerinin yol açtığı oksidatif strese hücreleri korumada görev aldığı rapor edilmiştir (Nordberg 1998, Thirumorthy ve ark 2011). MT'ler aynı zamanda çinkoyu korur ve böylece sitozolik çinko iyon konsantrasyonunu düzenlerler (Thirumorthy ve ark 2011).

Metallotioninler yalnızca kadmiyumun (Cd) öldürücülüğüne karşı değil aynı zamanda Zn, Cu, Fe, Pb, Hg ve As gibi diğer metallere karşı da koruyucudur. Hücre içine metal alımının azaltılması da dahil, hücreden metal iyonlarının ayrımı ve hücrenin dışına metal iyonlarının transportunun artırılması gibi olası mekanizmalarla MT'ler metal toksisitesine karşı koruyabilir (Park ve ark 2001).

MT'ler mitokondriyal membranın geçirgenliğinin düzenlenmesinde rol oynarlar (Simpkins ve ark 1998). Çekirdeklerin içinde yer almış MT oksitlenir ve sitoplazmada taşınır ve bu sistem dengededir (Takahashi ve ark 2005).

1.4.2. Metallotioninlerin Alt Tipleri

Metallotioninlerin memelilerde (MT-1, MT-2, MT-3, MT-4) şeklinde dört ana izoformları tespit edilmiştir (Miles ve ark 2000, Simpkins 2000, Zatta ve ark 2006, Vasak ve Meloni 2011). MT-3'ün başlıca beyinde sınırlı olduğu ifade edilir iken, MT-4 yassı epitel hücrelerinde ve MT-1 ve MT-2 aslında tüm memeli hücrelerinde mevcuttur (Kagi ve Kojima 1987, Quaife ve ark 1994, Vasak 2005).

İnsanda MT genleri 16. kromozomun uzun kolunun 13. şeriti üzerine yerleşmiştir ve sıkıca bağımlı genlerin çoklu gen kümeleri tarafından kodlanmıştır (Vasak ve Meloni 2011). Fare genomunda dört MT geni varken insanda önemli bir genetik polimorfizm bulunmaktadır (Vasak ve Meloni 2011). İnsan genomunda birkaç MT veya MT benzeri genler ve pseudogenler ile önemli homolojiye sahip fonksiyonel MT genleri vardır fakat onların fonksiyonları bilinmemektedir (Vasak ve Meloni 2011).

MT-2, MT-3 ve MT-4 tek bir gen tarafından kodlanır fakat MT-1'in çok alt tipi mevcuttur (Takahashi 2012, Raudenska ve ark 2014). MT-1 ve MT-2 benzerdir; MT-3 C-terminal bölgesinde hekzapeptid asidik ve N-terminal bölgesinde ilave bir treonin elemanı içerir. Buna ek olarak, MT-3 diğer MT'lerde mevcut olmayan Cys (6)- Pro-Cys- Pro (9) motifi içerir. İzofomlar arasındaki bu farklılıklar çoğunlukla amino asit sekansındaki değişikliklerden ortaya çıkar (Ruttkay-Nedecky ve ark 2013). Metallotioninlerin yapısı, polipeptid zincirleri ve metal iyonları arasındaki etkileşim tarafından belirlenir, amino asit dizilerindeki farklılıklar onların biyoaktivitesi için sorumlu olmalıdır (Vasak ve Meloni 2011).

MT-1 ve MT-2 en yaygın dağılan MT izoformlarıdır (Krizkova ve ark 2012). Fonksiyonel olarak MT-1 ve MT-2'nin nöronal hasara karşı hızlıca hücrel savunma proteinlerini koruyarak hareket ettiği kabul edilir (Kim ve ark 2003). MT-3'ün fizyolojik fonksiyonu ve düzeni MT-1 ve MT-2'den farklıdır (Zheng ve ark 1995). Örneğin MT-3 başlıca beyinde sınırlı iken MT-1 ve MT-2 her yerde bulunabilir ve ağır metaller veya nöronal hareket MT-3'ü artırmada başarısızdır (Palmiter ve ark 1992). MT-1 ve MT-2'nin biyosentezlerini glukokortikoidler, sitokinler, reaktif oksijen türleri ve metal iyonları dahil çeşitli stres koşulları ve bileşenleri indükler (Miles ve ark 2000). Bunun aksine, MT-3 ve MT-4 nispeten bu indükleyicilere tepkisizdir ve onların varlığı başlıca sırasıyla merkezi sinir sistemi (Masters ve ark 1994) ve epitelyum tabakalarla (Quaife ve ark 1994) sınırlıdır.

Metallotionin -1

MT-1 proteinleri tüm memelilerde ve bazı omurgasızlarda (ıstakoz, istiridye ve midye) bulunur (Tapiero ve Tew 2003). Memelilerde MT-1 tüm organlarda bulunur (Cai ve ark 2005). Bu izoform, stress koşulları ve metal iyonlar da dahil, reaktif oksijen türleri, sitokinler, glukokortikoidler ve çeşitli bileşikler tarafından indüklenebilir (Cai ve ark 2005). MT-1'in serbest radikal taramasında, ağır metal toksitesinden korunmada, çinko homeostazisinde in vivo olarak çok amaçlı rolleri olduğu kabul edilir (Coyle ve ark 2002).

Metallotionin -2

Oldukça homojen olan MT-2 proteinleri, bazı omurgasızlar (Droosophylla ve deniz kestanesi), siyanobakteri, mayalar ve bazı bitkilerde bulunur (Tapiero ve Tew 2003). Beyin parankimasındaki MT-1 ve MT-2'nin varlığı fare ve insanda dahil birçok türde çalışılmıştır (Manso ve ark 2011).

MT-1 ve MT-2'nin sentezi, oksidatif stres, sitokinler, glukokortikoidler, metal iyonları gibi pek çok faktör tarafından indüklendiğinden dolayı, bu iki izoform genellikle MT 1/2 olarak birlikte tarif edilir (Asmussen ve ark 2009, Sutherland ve Stillman 2011, Takahashi 2012).

MT 1/2'nin sentezi en erken 1975 yılında beyinde geleneksel kromatografik işlemler kullanılarak geçici olarak tanımlanmıştır (Chen ve Ganther 1975) ve birkaç

yıl sonra MT-1 geninin transkripsiyonuna bakılarak bu doğrulanmıştır (Durnam ve Palmiter 1987). MT-1 ve MT-2 farklı doku ve organlarda, birçok hücre tipinde ifade edilir (Krizkova ve ark 2012). Özellikle beyin ve spinal kord boyunca mevcuttur ve her iki izoformun ana hücre tipi astrositlerde bulunur (Vasak 2005, Vasak ve Meloni 2011). Bununla birlikte MT 1/2'nin varlığı ependimal hücreler, koroid pleksus epitelyal hücreleri, pia mater meningeal hücreleri ve kan damarları endotel hücrelerinde de görülmüştür (Hidalgo ve ark 2001, Manso ve ark 2011). Onlar, merkezi sinir sistemi hasarına yanıt olarak artar ve ayrıca AD gibi nörodejeneratif hastalıklarda da artış gösterirler (Bossers ve ark 2010, Tan ve ark 2010). ROS ve oksidatif strese MT-1 ve MT-2 artar. Buna ek olarak MT-1 ve MT-2 kortikosteron gibi glukokortikoid hormonları tarafından da artırılır (Kelly ve ark 1997, Andrews 2000, Haq ve ark 2003).

MT 1/2 izoformları beyin tamiri için gerekli olan yüksek nöroprotektif proteinler olarak tanımlanmaktadır (Penkowa ve ark 1999, Chung ve ark 2003, Chung ve ark 2008). Özellikle MT-1 ve MT-2 oksidatif hasardan nöroglial hücreleri koruyabilir (Penkowa ve ark 2002). Bazı çalışmalarda görülen ortak bir özellik MT-1 ve MT-2'nin gecikmiş serebral hasarı ve hücre ölümünü azaltmanın yanı sıra beyin tamirini, anjiyogenez ve fonksiyonel iyileşmeyi desteklemeleridir (Stankovic ve ark 2007).

MT-1 ve MT-2'nin böbrekte alımında ilk olarak reseptör megalinin bağlanması tanımlanmıştır (Klassen ve ark 2004). Aynı reseptör beyin hasarının ardından nöronların içine MT-1 ve MT-2'nin geçişine aracılık eder (Chung ve ark 2008). Halen megalin reseptörünün MT-3'ün taşınmasında aracılık edip etmediği hakkında geçerli bir bilgi yoktur (Vasak ve Meloni 2011).

Memeli MT-1 ve MT-2 izoformları ağır metal toksitesi ve oksidatif strese karşı korunmada ve çinko homeostazisinde yer almaktadır (Carpene ve ark 2007).

Metallotionin -3

Metallotionin-3, CNS'ye özgü metallotionin süper ailesinin bir üyesidir (Gayle ve ark 1999). MT-3, insan (Palmiter ve ark 1992) ve diğer memelilerin beyinde bulunur (Pountney ve ark 1994). MT-3 başlıca hipokampus, amigdala ve

kortekste ifade edilir (Masters ve ark 1994). MT-3 bitkilerde ya da bazı mantarlarda bulunmaz (Kagi 1991).

İnsanda MT-3 kodlama geni (farede 8. kromozom üzerinde iken), 16. kromozom üzerinde kümelenmiştir (Palmiter ve ark 1996). MT-3'ün keşfine yol açan en belirgin biyolojik özelliği, nöronal primer kültürlerde hücre dışı büyüme önleyici aktivitesidir (Huang 2010) ve bu nedenle büyüme inhibitör faktörü (GIF) olarak adlandırılmıştır (Kobayashi ve ark 1994). MT-3'ün büyüme engelleyici aktivitesi onun spesifik hidroksil radikal salıverme özellikleri ile ilişkilidir (Uchida 2010).

Bu izoform baskın olarak CNS'de ifade edilir (Masters ve ark 1994) hem nöronlarda hem de astrositlerde yerleşiktir (Hozumi ve ark 2008, West ve ark 2008), orada bakır ve çinko homeostazisinde önemli bir rol oynadığı görülmektedir (Hidalgo ve ark 2001). MT-3 çeşitli beyin bölgelerinden başka özellikle serebral korteks ve hipokampusun çinko bakımından zenginleştirilmiş nöronlarının presinaptik terminallerinde de yoğun olarak bulunur (Vasak ve Meloni 2011).

MT-3 geleneksel MT izoformlarına olağanüstü bir homoloji sergiler (insan MT-2 ile %70 özdeşlik gösterir) fakat diğer bu izoformlar MT-3 GIF'a benzemez (Uchida ve ark 1991). MT-1 ve MT-2 ile karşılaştırıldığında, MT-3 farklı kimyasal, yapısal ve biyolojik özellikler gösterir (Ba ve ark 2009, Bofill ve ark 2009, Brewer 2009, Ding ve ark 2010, Faller 2010). MT-3 geni MT-1 ve MT-2 geninden daha farklı düzenlenir ve transkripsiyonu metal kaynaklı değildir (Palmiter ve ark 1992). MT-3 ve diğer MT arasındaki işlevsel farklılıklar belirli yapısal özelliklere dayanmaktadır (Palumaa ve ark 2004). MT-3'ün birincil yapısı MT-1 ve MT-2 ile yaklaşık %70 benzerlik gösterir fakat N terminal bölgede bir tek kalıntı (Thr) ile iki parça ve C terminal segmentte bir hekzapeptid parça (GEAAEA) vardır (Uchida ve ark 1991). MT-3'ün metal bağlama afinitesi (Hasler ve ark 2000) daha düşüktür ve daha yüksek stokiometrilik metalleri bağlar (Palumaa ve ark 2002). Bununla birlikte, in vivo MT-3'ün çinko için MT-1 ve MT-2'den daha iyi yarıştığı söylenebilir (Palmiter ve Findley 1995).

MT-3 geni olmayan farelerin hipokampusu düşük çinko konsantrasyonuna sahiptir (Erickson ve ark 1997). MT-3 eksikliği olan fareler kainik asit kaynaklı nöbetlere ve postsinaptik nöron hasarına oldukça duyarlıdır. Dışarıdan ilave MT-3

geni verilen farelerin nöbetlere ve postsinaptik nöron hasarına dirençli olduğu görülmüştür. Bu bulgular sinaptik yarık içine veziküler çinkonun salıverilmesinde MT-3'ün etkili olacağını düşündürmektedir. CNS'de MT-3'ün hücresel lokalizasyonu hala tartışmalıdır ve bazı çalışmalar bunun nöronal bir protein olduğunu ileri sürmüştür ve diğerleri ana kaynak olarak astrositlerin olduğunu bildirmişlerdir, bu tutarsızlıklar cazip olabilir çünkü bazı nöronlar MT-3 sentezleyerek ana hücre olabilir ve sonrada astrositlere taşınabilir (West ve ark 2008, Howels ve ark 2010).

Metallotionin -4

MT-4 hem fare hem insan genomunda MT-3 geninin yaklaşık 5 ile 20 kb yukarısında bulunan memeli MT gen ailesinin son üyesidir (Quaife ve ark 1994). MT-4 yassı epitel (ağız, üst mide, barsak kanalı, deri) hücrelerinde bulunur (Sutherland ve Stillman 2011, Ruttkay-Nedecky ve ark 2013).

Moleküler hücre biyolojisi çalışmaları, yassı epitel farklılaşması sırasında çinko metabolizmasının düzenlenmesinde MT-4'ün ilgisi olduğunu ileri sürmüştür (Quaife ve ark 1984). Memeli anne decidua (Liang ve ark 2016) da epitel gelişimi ve fizyolojisi sırasında moleküler biyoloji çalışmaları MT-4 geninin mutlak gelişimsel düzenlemeye tabi olduğunu ortaya koymuştur (Vasak ve Meloni 2011).

Çinko-Duyarlı Transkripsiyon Faktör MTF-1

Omurgalılardaki tek çinko duyarlı transkripsiyon faktörü olan MTF-1 (Westin ve Schaffner 1988), çinko duyarlılığına ve metal bağımlı transkripsiyon aktivasyon fonksiyonlarına katkıda bulunan ve DNA bağlayıcı bölgeler olarak fonksiyon gören 6 C2H2 çinko-parmak alanına sahiptir (Laity ve Andrews 2007). Hücresel çinko düzeyleri yükseldiğinde, MTF-1, çinko homeostazında, yüksek çinko konsantrasyonlarının toksitesini azaltmaya yarayan birtakım konakçı genlerin (MT'ler, ZnT-1, ZnT-2 gibi) transkripsiyonunu artırarak temel bir rol oynar (Stuart ve ark 1985, Langmade ve ark 2000, Guo ve ark 2010). Ek olarak, çinko alımında görevli ZIP10 gibi birtakım genlerin ekspresyonunu baskılar (Wimmer ve ark 2005, Lichten ve ark 2011).

1.4.3. Metallotioninlerin Yapısal Özellikleri

Çinko Homeostazisinde Metallotioninler

Serbest çinko, çinko ihtiva eden metallotioninlerin büyük miktarda birikmesini indüklemektedir. Çinko tarafından indüklenen metallotioninin, adriamisin kaynaklı miyokard hasarın (Wang ve ark 2001), ve antrasiklin, doksorobisin (Shuai ve ark 2007) kaynaklı kalp toksisitesinin (Kang 2007) kardiyak apoptozu üzerine koruyucu etki sergilediği bildirilmiştir (Robson ve ark 1994). Çinko ile metallotioninin gen ekspresyonunun düzenlenmesi kanıtlanmıştır (Kaina ve ark 1990). Çalışmaların çoğu çinko durumunun gelişen ve yetişkin fare ve ratların çeşitli dokularında mRNA sentezi ve metallotionin konsantrasyonunu etkilediğini düşündürmektedir (Satoh ve ark 1993). Metallotioninler diğer çinko proteinlerinden daha sıkı çinko bağlar ve çinko konsantrasyonu diğer çinko proteinleri ile karşılaştırıldığında nispeten yüksek olduğundan çinko için bir havuz oluşturur (Chiaverini ve De Ley M 2010). Sonuç olarak, çinko metallotionine sıkıca bağlı olduğundan serbestçe hareket edemez, çinkonun salıverilme ve aktarılmasını artırmak efektörlerin yardımı olmadan düşüktür (Chiaverini ve De Ley M 2010). Metallotioninlerin nükleer yerleşimi çinko gereksinimi ile ilgilidir ve hücre döngüsü sırasında nükleer bileşenlerle ilişkilidir (Cherian ve ark 1993). Steroid olmayan antiinflamatuvar ilaçlar karaciğerde çinko doku dağılımını değiştirerek metallotionin seviyesini artırır (Summer ve ark 1989). Metallotionin/tionin (T) sistemi kolayca mevcut çinkonun konsantrasyonunu kontrol eder ve çinkoyu korur (Tapiero ve Tew 2003). Metallotioninden çinkonun taşınması, hücresel farklılaşması veya proliferasyonu, apoptoz ve gen ekspresyonunun düzenlenmesinde çinko bağlayıcı proteinler katkı sağlayabilir (Babula ve ark 2012).

1.5. Hücre İçi Çinko Seviyelerinin Düzenlenmesinde Çinko Proteinleri

1.5.1. Hücre İçi ve Hücre Dışı Taşınmada Çinko Proteinleri (ZIP ve ZnT)

ZIP ve ZnT Çinko Proteinlerinin Tarihçesi

İlk çinko taşıyıcı protein, Zrc 1, *Saccharomyces cerevisiae*'de belirlenmişti (Kamizono ve ark 1989) ve çinkoyu da içeren katyonların yüksek konsantrasyonlarına karşı direnç sağlamaktaydı. Bunu takiben *S. cerevisiae*'nin COT1 ve *Cupriavidus* (önceden *Ralstonia*) *metallidurans* CH34'ün CzcD'si

belirlendi (Conklin ve ark 1992, Nies 1992) ve çinkoyla beraber kobalt, manganez ve kadmiyum gibi diğer metallere karşı direnç sağlamaktaydı. Bu 3 protein transmembran (TM) bölgelerde [katyon hücre dışı akış alanı (pfam 01545)] yüksek sıralama benzerliği gösterir (Bateman ve ark 2000). Böylece bu proteinlerin tüm filogenetik düzeylerde (Gaither ve Eide 2001, Kambe ve ark 2006, Montanini ve ark 2007) bulunan homolog proteinleri “katyon difüzyon fasilitatör”(CDF) proteinleri olarak adlandırılır (Paulsen ve Saier 1997).

İlk taşıyıcı ZnT1, çinko duyarlı mutant yenidoğan hamster böbreği (BHK) hücrelerine çinko direnci kazandıran seçkin bir yöntemle belirlendi (Palmiter ve Findley 1995). Bu keşif sonrasında mutant BHK hücreleri, maya ve EST ve genom veritabanları kullanılarak diğer ZnT taşıyıcıları tespit edildi (Liuzzi ve Cousins 2004, Kambe ve ark 2006, Lichten ve Cousins 2009, Kambe 2012). ZnT taşıyıcıları “katı taşıyıcı” ailesi 30A (SLC30A)’ya dahil edildi (Palmiter ve Huang 2004) ve ZnT1-ZnT10 olarak adlandırıldılar.

ZnT taşıyıcılarına kıyasla ZIP taşıyıcılarının keşfi daha karmaşıktır. Önceleri LIV-1 olarak adlandırılan ZIP6, insan meme kanseri hücrelerinin östrojenle düzenlenen büyümesi ile alakalı bir östrojenle uyarılan gen olarak belirlenmişti (Manning ve ark 1988). Bununla beraber çinko homeostazına katkısı sonradan kanıtlanmıştır (Taylor 2000, Taylor ve Nicholson 2003).

ZIP taşıyıcılarından ilk tanımlanan, *Arabidopsis thaliana*’nın demir bağımlı taşıyıcı 1 (Irt1) proteindir (Eide ve ark 1996). Sonrasında çinko bağımlı taşıyıcı 1 (Zrt1) ve Zrt2, *S. cerevisiae*’de, Irt1 sıralaması kullanılarak tespit edilmiştir (Zhao ve Eide 1996a, 1996b). ZIP orijinal üyeler Irt ve Zrt sonrası adlandırılmıştır (Eng ve ark 1998, Gueriot 2000). ZIP taşıyıcılar tüm yaşam alemlerinde bulunurlar (Gaither ve Eide 2001, Kambe ve ark 2006, Schmitt-Ulms ve ark 2009). Bunu takiben kısa süre sonra, memeli ZIP üyeleri, ZIP2 ve ZIP1, çinkonun hücre içine alımını sağlayan çinko taşıyıcıları olarak karakterize edildiler (Gaither ve Eide 2000, Gaither ve Eide 2001). İnsan genomu sıralamasının tamamlanması memelilerdeki tüm ZIP üyelerinin belirlenmesini sağladı (Kambe ve ark 2006, Lichten ve Cousins 2009). ZIP taşıyıcıları ZIP1-ZIP14 arası adlandırılan 14 üyeden oluşur ve SLC39A ailesine dahildirler (Eide 2004, Jeong ve Eide 2013). ZIP üyeleri esas olarak çinko taşımaktadır ancak demir (Liuzzi ve ark 2006, Gao ve ark 2008), manganez ve

kadmiyum da taşıyabilirler (Girijashanker ve ark 2008, Fujishiro ve ark 2012, Jenkitkasemwong ve ark 2012).

Son 20 yıl süresince 10 ZnT ve 14 ZIP taşıyıcı belirlenmiş ve karakterize edilmiştir (Kambe ve ark 2008, Lichten ve Cousins 2009, Fukada ve Kambe 2011). Bunların biyolojik zarlardan çinkoyu mobilize etmesi için ATP hidrolizi gerekmez ve böylelikle bu proteinler SLC ailesine üye olarak dahil edilirler. Normal olarak işlev gördükleri hücresel alanlarda “aktif” çinko taşıyıcılarının ekspresyon düzeyleri, net çinko transportunun tanımlanması için kritik önem taşır (Kambe 2013), çünkü çinko (Zn^{+2}), demir ve bakırdan farklı olarak, hücre zarını geçerken indirgenme reaksiyonuna ihtiyaç duymaz. Böylece hem ZnT hem de ZIP taşıyıcıları çinkonun alımı, atılımı, birikmesi ve biyolojik zarlardan salınımını sıkıca düzenleyen süreçler için ve çinkonun geniş çaplı çeşitli fonksiyonları için vazgeçilmezdir.

1.5.2. Hücre İçine Çinko Taşınımından Sorumlu Proteinler “ZIP (SLC39A) Ailesi”

ZIP taşıyıcılar sitozolik çinkoyu hücre dışı boşluktan ve hücre içi bölmelerin lümenlerinden takviye ederek işlev görürler (Lichten ve Cousins 2009, Kambe 2012, Jeong ve Eide 2013). Çoğu ZIP taşıyıcı plazma zarında yer alır ve ZIP5 istisna olmak üzere, hücre yüzeyinde yer alırları, çinko eksikliği durumlarında artar (Gaither ve Eide 2000, Dufner-Beattie ve ark 2003, Kelleher ve Lonnerdal 2003, Liuzzi ve ark 2004, Wang ve ark 2004, Taylor ve ark 2005, Liu ve ark 2008, Hojyo ve ark 2011, Lichten ve ark 2011, Chowanadisai ve ark 2013). Çinko fazlalığına yanıt olarak bu taşıyıcılara hızlı içeri alım ve yıkım meydana gelir (Huang ve Kirschke 2007, Mao ve ark 2007, Weaver ve ark 2007). ZIP taşıyıcılarının ve onların homologlarının üç boyutlu bir yapıları yoktur. Hidrofobisite örgüleri (plots), bu taşıyıcıların hücre dışı/lüminal NH₂ ve COOH terminalleri olan sekiz transmembran (TM) sarmalına sahip olduğunu göstermektedir (Lichten ve Cousins 2009, Kambe 2012, Jeong ve Eide 2013). ZIP taşıyıcıları ve onların homologları çinko taşıma aktivitesi için homodimerler oluştururlar (Lin ve ark 2010, Bin ve ark 2011) ve aşık Km değerleri -ZIP12 çok daha düşük bir Km değeri ile bir istisna olmakla birlikte (Chowanadisai ve ark 2013) - yüzlerce nanomolardan, hücredeki fazla “ekspresyon” edilme durumlarında yaklaşık 20 mikromolara kadar bir aralıkta değişebilir (Gaither ve Eide 2000, Gaither ve Eide 2001, Dufner-Beattie ve ark 2003, Wang ve ark 2004, Liu ve

ark 2008, Pinilla-Tenas ve ark 2011, Antala ve Dempski 2012, Dempski 2012). Günümüzde çinko taşıyıcılarının çinko taşıma mekanizması net bir şekilde açıklanabilmiş değildir. Çeşitli ZIP taşıyıcılarında bir bikarbonat/çinko eş zamanlı taşıma mekanizması öne sürülmektedir. Bununla beraber bir saflaştırılmış bakteriyel ZIP homologunda, proteolipozomlara yeniden dönüştürüldüğünde, doygunluğa ulaştırılamayan ve elektrojenik bir çinko taşınma yöntemi modeli gösterilmiştir (Lin ve ark 2010). Kanal benzeri çinko taşınma yöntemi modeli, bir ZIP taşıyıcıyla çinko taşınmasının fosforilasyonla tetiklenebileceğinin kanıtıyla da desteklenmektedir (Taylor ve ark 2012).

ZIP taşıyıcılar için çinko substrat özgülüğü zorunlu değildir ve demir, manganez, bakır ve kadmiyum taşınmasında da rol alırlar. ZIP taşıyıcılarının metal özgülüğünün belirleyicileri tam olarak tanımlanmamıştır ancak taşıyıcı olarak iş gördüğünde bir intramembranöz çinko bağlanma alanına dahil olma yoluyla, TM V sarmalındaki bir korunmuş histidin kalıntısı hayati bir önem taşıyabilir. ZIP8 ve ZIP14'te histidin glutamik asitle yer değiştirmiştir ki her ikisi de geniş metal özgülüğüne sahip olmakla bilinir (Girijashanker ve ark 2008, Fujishiro ve ark 2012, Jenkitkasemwong ve ark 2012). ZIP taşıyıcılarının çinko ya da diğer metallere karşı seçiciliklerini nasıl belirledikleri hala net bilinmemektedir.

ZIP taşıyıcılar sıralanma benzerliklerine göre I, II, LIV-I ve guf-A olarak alt ailelere sınıflandırılırlar (Taylor 2000, Gaither ve Eide 2001, Taylor ve Nicholson 2003). ZIP I ve guf-A sırasıyla birer üye içerirler. ZIP II 3 ZIP taşıyıcıdan oluşur ve LIV-I en kalabalık alt ailedir (Taylor ve Nicholson 2003). LIV-I alt ailesindeki taşıyıcıların sıralanma farklılıkları geniş biyolojik fonksiyon aralıklarının bir aynasıdır. TM V sarmalındaki potansiyel bir metalloproteaz benzeri motif (CHEXPHEXGD) ve ilk TM sarmalından önce yerleşmiş hücre dışı CPALLY motifi özelde olmak üzere bazı özellikler benzerdir. CHEXPHEXGD motifinin fonksiyonel özelliği tam olarak açığa kavuşturulmamıştır ancak, bu motif, plazma zarına yerleşik LIV-I üyelerinden olup yüksek bir şekilde korunmuş olan ilk sisteini ile CPALLY motifi ile arasında bir disülfid bağı oluşumu aracılığıyla çinko taşınmasının düzenlenmesinde rol oynuyor olabilir (Taylor ve ark 2007). Bazı LIV-I alt ailesi taşıyıcılarında (ZIP4, ZIP6 ve ZIP10) CPALLY motifi içeren NH₂- terminal kısmı yarılr (ki bu durum işlenme olarak adlandırılır) (Kambe ve Andrews 2009, Ehsani ve

ark 2012, Hogstrand ve ark 2013), ve bu “işlenme” çinkonun hücrelerin içine alımını sağlamak için gözeneğin açılması içinde çalışıyor olabilir. Dahası, işlenme, çinkonun hücresel trafiğini ayarlamakta önemli olabilir (Kambe ve Andrews 2009). İlgi çekici şekilde, hücre dışı bölgede bazı LIV-I alt ailesi taşıyıcılar (ZIP5, ZIP6 ve ZIP10) ve PrP-benzeri amino asit sıralanması içeren prion proteinler arasında evrimsel bir bağ öne sürülmektedir (Schmitt-Ulms ve ark 2009, Ehsani ve ark 2011, Ehsani ve ark 2012, Pocanschi ve ark 2013).

ZIP2 (ZIP II alt ailesi)

ZIP2 çinkoyu hücre dışı boşluktan hücre içine alır (Gaither ve Eide 2000). ZIP2 tarafından çinkonun alımı keratinositlerin farklılaşması ve epidermis döngüsü için gereklidir (Inoue ve ark 2014). ZIP2 mRNA ekspresyonu sınırlı dokularda kısmen düşüktür (Gaither ve Eide 2000, Dufner-Beattie ve ark 2003), ama monositlerde (Cousins ve ark 2003) çinko tükenmesi ile ve makrofajlarda GM-CSF ile (Subramanian ve ark 2013), ve de keratinosit farklılaşması sırasında (Inoue ve ark 2014) anlamlı şekilde uyarılır. Prostatta, karsinomlarda ZIP2 ekspresyonu azalır (Desouki ve ark 2007). Zip1-KO farelerine benzer şekilde Zip2-KO fareleri gebelik sırasında diyetteki çinko eksikliğine duyarlıdırlar (Peters ve ark 2007).

1.5.3. Hücre Dışına Çinko Taşınımından Sorumlu Proteinler “ZnT (SLC30A) Ailesi”

ZnT taşıyıcılar çinkoyu sitozolden hücre dışı boşluğa ve hücre içi bölmelerin lümenlerine mobilize eder ve ZnT taşıyıcılarının çoğu çinkoyu luminal kenarlara taşıyarak fonksiyon görürler (Palmiter ve Huang 2004, Lichten ve Cousins 2009, Kambe 2012, Huang ve Tepasamondech 2013). ZnT taşıyıcılarının yapılarıyla ilgili bilgi bulunmamakla beraber bakteriyel bir homolog olan YiiP’in yapısıyla ilgili bir kısım bilgi mevcuttur ki (Lu ve Fu 2007, Lu ve ark 2009, Coudray ve ark 2013, Gupta ve ark 2014) bu bilgi ZnT taşıyıcıları anlamamıza büyük katkıda bulunmaktadır. YiiP’nin sitozolik NH₂ ve COOH terminali olan 6 TM sarmalı mevcuttur ve bir homodimer olarak işlev görür. TM I, II, IV ve V sarmalları kompakt dört-sarmallı demet yapısını oluşturur ve TM II ve V sarmallarının korunmuş dört hidrofilik kalıntısı (üç aspartik asit ve bir histidin, DD-HD) intramembranöz bir çinko bağlanma alanı oluştururlar. Çinkonun DD-HD ile tetrahedral koordinasyonu

gereklidir, çünkü DD-HD motifindeki aspartik asit kalıntılarının bağlanma yapmayan alanine mutasyonu çinko taşıma aktivitesini ortadan kaldırır (Wei ve Fu 2006). Çinko taşıma sürecinde monomerlerin TM sarmalları birbirlerine daha yakına gelir ve dört sarmallı demetin sitoplazmik kısmı TM III-VI sarmal çiftinden uzaklaşır (Lu ve Fu 2007, Lu ve ark 2009, Coudray ve ark 2013, Gupta ve ark 2014).

Çinko, protona karşılık 1:1 çinko değişim stokiyometrisi yöntemiyle protonun hücre içine akışına karşılık olarak YiiP tarafından hücre dışına atılır (Chao ve Fu 2004). Çinko/proton (Zn^{+2}/H^{+}) değişim mekanizması ZnT taşıyıcılarında korunmuştur (Ohana ve ark 2009, Shusterman ve ark 2014) ve alternatif bir erişim mekanizması içerir (Coudray ve ark 2013, Gupta ve ark 2014). Bu mekanizmada YiiP hem iç kısmı hem dış kısmı gören yapılar oluşturur, her iki yapı da Zn^{+2} ya da H^{+} 'yı bağlayabilir ve hücre dışı proton çinkoyu (Zn^{+2}) sitozolden dışarı çıkartmak için itici bir güç oluşturur (Coudray ve ark 2013). TM V sarmalında, intramembranöz çinko bağlanma alanını oluşturan korunmuş histidinin (H) yanında olan ve TM III-VI sarmal çifti ile dört-sarmal demeti arasındaki ara yüzde yer alan bir lōsin kalıntısının, boşluklar arası su giriş kapısının açılışını kontrol eden bir temel hidrofobik bariyer olarak önem taşıdığı düşünülmektedir (Gupta ve ark 2014). YiiP'nin sitozolik COOH- terminal kısmı, muhtemelen YiiP homodimerlerini kararlı hale getirmeye yarayan çift-çekirdekli bir çinko bağlanma alanı oluşturur. Alternatif olarak, bu bölge çinko iyon konsantrasyonlarını hissedip YiiP'in çinko taşıma aktivitesini makas benzeri bir yapısal değişikliği tetiklemek yoluyla ve dört-sarmal demetteki intramembranöz çinko bağlanma alanındaki çinko (Zn^{+2}) koordinasyonunu kontrol ederek düzenliyor olabilir (Lu ve Fu 2007, Lu ve ark 2009). Bu oto-düzenleme mekanizmasında YiiP allosterik şekilde çinko ile ayarlanan bir biçimde işlev görür. TM sarmallar alanına kıyasla çift çekirdekli çinko bağlanma alanını oluşturan sitozolik COOH- terminal kısmı yüksek derecede bir sıralanma değişkenliğine sahiptir ancak bakteriyel ZnT homologlarında bu kısmın bir $\alpha\beta\alpha$ kıvrımı içeren yüksek şekilde korunmuş metalloşaperon benzeri bir yapı olduğu gösterilmiştir (Lu ve Fu 2007, Cherezov ve ark 2008, Higuchi ve ark 2009). Dolayısıyla çinko taşınmasının işleyiş mekanizması ZnT taşıyıcılarını da içererek CDF üyeleri arasında korunmalıdır.

YiiP'nin yapısal özelliklerine dayanarak ZnT taşıyıcıları biyokimyasal olarak karakterize edilmiştir. ZnT taşıyıcılarının, ZnT5'in 9 varsayılan TM sarmalı olan uzun bir NH₂ uç kısmına sahip olması istisnası dışında 6 TM sarmalına sahip oldukları tahmin edilmektedir. ZnT taşıyıcıları yine ZnT5'in ZnT6 ile heterodimerler oluşturması istisnası dışında homodimerler oluştururlar (Kambe ve ark 2002, Fukunaka ve ark 2009, Lasry ve ark 2014). ZnT taşıyıcılarının dimerleşmesi için önemli olan sitozolik COOH- terminal kısmı (Fukunaka ve ark 2009, Salazar ve ark 2009), diğer protein-protein etkileşmelerine de katkıda bulunur ve ZnT taşıyıcılarının karşılık gelen proteinleri kontrol etmesini ve ZnT taşıyıcıların karşılık gelen proteinlerce kontrol edilmesini sağlar (Jirakulaporn ve Muslin 2004, Salazar ve ark 2004, Fukunaka ve ark 2009, Kambe 2012).

ZnT taşıyıcıları, dört-sarmal demetinde TM II ve V sarmallarının iki aspartik asit ve iki histidininin (HD-HD) intramembranöz bir çinko bağlanma alanı oluşturduğu bir Zn⁺²/H⁺ değişimi yöntemiyle (Ohana ve ark 2009, Shusterman ve ark 2014) işlevseldir. HD-HD motifinde mutasyonların oluşması çinko taşınma aktivitesini durdurur (Ohana ve ark 2009, Fukunaka ve ark 2011, Fujimoto ve ark 2013, Shusterman ve ark 2014). TM II sarmalındaki histidinin pozisyonu muhtemelen metal substrat özgüllüğünü belirlemede önemli rol oynar, çünkü HD-HD'nin DD-HD ile yer değiştirmesi ZnT taşıyıcılarında çinko özgü taşımayı çinko ve kadmiyum taşımaya dönüştürür (Fukada ve Kambe 2011). ZnT10'da (ND-HD) bir manganez taşıyıcı olarak işlev görebilen bir asparajin mevcuttur (Quadri ve ark 2012, Tuschl ve ark 2012). YiiP'de hem çinko hem kadmiyumu taşıyan ancak manganezi taşımayan (Hoch ve ark 2012) DD-HD motifi mevcuttur, bununla birlikte manganez taşıyan bitki ZnT homologlarında DD-DD motifi bulunur (Montanini ve ark 2007, Gustin ve ark 2011). Maya ve bitki ZnT homologlarında HD-HD'den farklı pek çok diğer amino asitin metal özgüllüğünü etkilediği gösterilmiştir (Lin ve ark 2009, Kawachi ve ark 2012), ve bunlardan bazıları ZnT taşıyıcılarında korunmuştur. Bu sebeple motif ile metal özgüllüğü arasındaki ilişkiyi açıklayacak daha net bilgilere ihtiyaç vardır.

TM IV ve V sarmalları arasındaki sitozolik histidinden zengin ilmek, ZnT taşıyıcılarının bir diğer karakteristiğidir. Delesyon ve mutasyonel analizler, histidinden zengin ilmeğin, sitozolik çinko düzeylerinin bir sensörü olarak işlev

gördüğünü (Kawachi ve ark 2012, Podar ve ark 2012) ve dört-sarmal demette çinkonun HD-HD'ye giriş izninin kontrolüne dahil olduğunu düşündürmektedir (Suzuki ve ark 2005, Kawachi ve ark 2008, Kawachi ve ark 2012). Çeşitli ZnT taşıyıcılarında sitozolik NH₂- terminal kısımda bulunan diğer bir korunmuş kısa histidinden zengin sıralanma, çinkonun hissedilmesi ve HD-HD kısmına doğru yer değiştirmesine katkıda bulunuyor olabilir (Arus ve ark 2013).

Genel olarak CDF taşıyıcılar 3 ana grup (13 kümeyle beraber) yani Zn-CDF, Zn/Fe-CDF ve Mn-CDF olarak sınıflandırılırlar (Montanini ve ark 2007).

ZnT3

ZnT3, hipokampus ve neokortekste bir grup glutamaterjik nöronların sinaptik veziküllerine çinkonun önemli bir taşıyıcısıdır (Cole ve ark 1999). Presinaptik veziküllerden sinaptik olarak salınan çinko, nöronal iletim ve plastisiteyi sağlamakta merkezi roller oynar. Bu, çinkonun, çoklu nöronal bağlayıcı ve voltaj-kapılı iyon kanallarına, taşıyıcılara, postsinaptik nöronlardaki nörotransmitter reseptörlerine bağlanması yoluyla gerçekleştirilir (Frederickson ve ark 2005, Hirzel ve ark 2006, Sensi ve ark 2009, Nozaki ve ark 2011, Sensi ve ark 2011, Takeda ve ark 2013, Vergnano ve ark 2014). ZnT3 muhtemelen yaşlanma-bağılantılı bilişsel kayıptan korunmayı sağlamaya katkıda bulunmaktadır çünkü ZnT3 ekspresyon düzeyleri yaşla birlikte (Adlard ve ark 2010) ve Alzheimer hastalığında (Adlard ve ark 2010, Bjorklund ve ark 2012), Parkinson hastalığında, bunamada düşer (Whitfield ve ark 2014). Bu sonuçlarla uyumlu olarak, yaşlı ZnT3-KO fareler öğrenme ve hafızada güçlük sergilerler (Adlard ve ark 2010, Martel ve ark 2010, Sindreu ve ark 2011). Bununla birlikte, genç ZnT3-KO farelerin, ilk önce, sinaptik çinkonun temelde yokluğu gözlemine rağmen, vahşi tip farelerden nöbet eşiği hafifçe daha yüksek olmayarak, hemen hemen hiç aşıkarak gözlenmeyen fenotipler gösterdiği bildirilmiştir. Günümüzde, ZnT3-KO farelerin hipoglisemi ile indüklenen progenitör hücre çoğalmasında ve nöroblast üretiminde azalma gösterdiği bildirilmiştir (Suh ve ark 2009). ZnT3-KO farelerde, aynı zamanda, nöro iletimde önemli protein ve genlerin ekspresyonunda temel değişiklikler olduğu bildirilmiştir (Adlard ve ark 2010, Nakashima ve ark 2011). ZnT3 tarafından sinaptik veziküllerde biriktirilen çinkonun, hipokampus bağımlı öğrenme sırasındaki presinaptik Erk 1/2 sinyalleşmesi için temel bir rol oynadığı gösterilmiştir (Sindreu ve ark 2011). Ek

olarak, nörotransmitterlerin reseptörlerinin çinko bağlayıcı alanları mutasyona uğratılmış farelerle yapılan çalışmalarda, ZnT3 tarafından harekete geçirilen sinaptik çinkonun önem taşıdığı gösterilmiştir (Hirzel ve ark 2006, Nozaki ve ark 2011). Sinaptik çinko, yaş bağımlı bir biçimde, amiloid birikimine katkıda bulunuyor olabilir (Lee ve ark 2002). Bu yüzden, ZnT3 tarafından sinaptik veziküllere çinkonun uygun aktarımı, Alzheimer hastalığının başlangıcının önlenmesinde kritik rol oynuyor olabilir.

Beyne özgü bir adaptör protein (AP-3), ZnT3'ün COOH terminal kısmıyla etkileşerek ZnT3'ün sinaptik veziküllerin trafiğini yönetmesini kontrol eder (Salazar ve ark 2004). Bu yüzden, AP-3'ün bir mutant şeklini taşıyan mocha farelerinde yerleşimi bozulmuş ya da tamamen kayıp ZnT3 ve sinaptik çinko izlenir (Kantheti ve ark 1998). Nöronal hücrelerde ZnT3 tarafından yapılan çinko taşınması aktivitesi, bir klor kanalı (Salazar ve ark 2004) ve bir veziküler glutamat taşıyıcısı ile güçlendirilir (Salazar ve ark 2005).

Beyne ek olarak, ZnT3 ekspresyonu, insülin üretiminin düzenlenmesinde etkili olduğu pankreatik beta hücrelerinde izlenir (Smidt ve ark 2009). ZnT3 mRNA testiste de sıkça eksprese edilir, bununla beraber ZnT3 proteini eksprese edilmez (Palmiter ve ark 1996).

Fizyopatolojik Olaylarda ZnT ve ZIP Taşıyıcıları

Hem ZnT hem de ZIP taşıyıcılar, çinko sinyalleşmesini kontrol ederek bağışıklık hücre fonksiyonlarında birtakım merkezi roller oynarlar ve böylece taşıyıcıların hem disfonksiyonu hem de ekspresyonlarının disregülasyonu bağışıklık fonksiyonlarında anormallik ile sonuçlanır (Hirano ve ark 2008, Murakami ve Hirano 2008, Haase ve Rink 2009, Haase ve Rink 2014). Ek olarak, yakın zamanda literatürde, ZnT ve ZIP taşıyıcılarının, çinkonun bağışıklıkla ilgili yeni keşfedilen fonksiyonları, “beslenmeye dair bağışıklık” la ilişkili olduğu (Stafford ve ark 2013, Subramanian Vignesh ve ark 2013) (demir benzeri diğer nutrisyonel metallerin taşıyıcıları ile ilişkili durumdaki gibi) gösterilmiştir (Schaible ve Kaufmann 2004). Burada, mikrobiyal patojen alansal izolasyon yoluyla mikrobelerin mahrum kalmaktadır (Hood ve Skaar 2012). Çinko zehirlenmesinin, fagosite edilmiş mikroorganizmaların büyümesini inhibe ederek (Wagner ve ark 2005, Botella ve ark

2012), bağışıklık sisteminin diğer bir işleminde işlev gördüğü öne sürülmektedir. Burada ZnT ve ZIP taşıyıcıların, bakır taşıyıcılarında gözlendiği gibi, rol alıyor olabileceği düşünülmektedir (White ve ark 2009). Konak ve patojen ara yüzünde çinkonun işlevi karmaşıktır (Marvin ve ark 2012) ve gelecekte daha çok üzerinde durulması gereken ayrı bir başlığı oluşturmaktadır (Haase ve Rink 2014).

Beyin çinko homeostazında kronik bozulmaların, Alzheimer hastalığı, Parkinson hastalığı ve amiotrofik lateral skleroz (ALS) gibi nörodejeneratif hastalıkların gelişimiyle yakından ilişkili olduğu öne sürülmektedir (Cuajungco ve Lees 1997, Frederickson ve ark 2005, Szewczyk 2013). Hastaların beyin omurilik sıvısı ya da beyindeki çinko düzeyleri (ya da diğer divalen katyonlar) belirgin şekilde değişmiştir (Cuajungco ve Lees 1997, Religa ve ark 2006, Hozumi ve ark 2011, Szewczyk 2013). Serbest çinko (Zn^{2+}), yüksek bir konsantrasyonda, nöronların potansiyel bir katilidir (Koh ve ark 1996, Weiss ve ark 2000). Bunun tersine, çinko eksikliğinin, bir ALS-bağılantılı patojenik mutant biçim olan SOD1 proteinini indüklediği gösterilmiştir (Homma ve ark 2013). Bir kısım ZnT ve ZIP taşıyıcılar, nörodejeneratif hastalığı olan hastaların beyinde hem mRNA hem de protein düzeylerinde değişmiş ekspresyonlar sergilerler (Smith ve ark 2006, Beyer ve ark 2009, Adlard ve ark 2010, Beyer ve ark 2012, Szewczyk 2013, Kaneko ve ark 2015). Bu yüzden, bu hastalıklarda, ekspresyonlarının değişikliğinin nasıl etkili olduğu geniş bir şekilde araştırılmalıdır.

Meme ve prostat kanserlerinde kanser patogenezi riski, anormal çinko metabolizması ile ilişkilidir (Cui ve ark 2007, Costello ve Franklin 2011). ZnT ve ZIP taşıyıcılarının değişmiş ya da ektopik ekspresyonunun çoğu karsinom ve kanserde kanser ilerlemesi ve invazif ve metastatik fenotiplerle ilişkili olduğu düşünülmektedir ve böylece, her iki taşıyıcı, kanser tedavisinde yeni hedefler olma yönüyle kayda değer bir ilgi görmüşlerdir.

Genetik Hastalıklar ve Tedavi Yaklaşımlarında Çinko Taşıyıcıları

ZIP4/SLC39A4 gen mutasyonları, egzamatöz dermatit, alopesi ve ishal (Moynahan ve Letter 1974) ile karakterize akrodermatitis enteropatika (AE)'ye (Andrews 2008, Schmitt ve ark 2009), tahminen yaklaşık 1/500000 sıklıkta yol açar (Maverakis ve ark 2007). AE hastalarındaki ağır dermatitin altında yatan moleküler

temel yakın zamanda gösterilmiştir (Kawamura ve ark 2012). Bu çalışmada, Langerhans hücrelerinin kaybindan kaynaklanan irritan kontakt dermatitin, ATP aracılı inflamatuvar sinyallerde bozulmaya yol açtığı gösterilmiştir (Kawamura ve ark 2012). AE hastalarında çinkodan yoksun fenotipler, günlük oral çinko desteği (1-3 mg/kg/gün) ile düzeltilebilmektedir (Schmitt ve ark 2009). ZIP4, ince barsak lümeninden çinko alımı için vazgeçilmez tek çinko taşıyıcıdır, ancak homozigot haritalama ile ZIP4/SLC39A4 geninin kromozomal bölgesiyle ilişkili olmayan bazı AE mutasyonları mevcuttur (Wang ve ark 2002, Schmitt ve ark 2009). Böylece sindirim sisteminde, ikinci bir çinko alım yolu olarak başka bir ZIP taşıyıcı işlev görüyor olabilir.

Geçici yenidoğan çinko eksikliği (TNZD), anne sütündeki düşük çinko düzeyleri nedeniyle oluşur. AE'ye benzer şekilde, semptomlar, yalnızca, anne sütüyle beslenme sırasında gelişir ve anne sütü kesildikten sonra yeniden görülmezler (bu yüzden geçici olarak nitelendirilmişlerdir). TNZD, (ZnT2/SLC30A2 gen mutasyonları nedeniyle sütünde düşük miktarda çinko salgılayan) anneye değil ama bebeğe çinko takviyesi ile hafifletilebilir (Chowanadisai ve ark 2006, LasryI ve ark 2012, Itsumura ve ark 2013, Miletta ve ark 2013). Çünkü anne sütündeki özellikle kolostrumdaki çinko düzeyleri oldukça yüksektir (Casey ve ark 1985, Lonnerdal 2007), laktasyon sırasında anne sütüne büyük miktarlarda çinko salgılanması için (1-3 mg çinko/gün), ZnT2 fonksiyonu gereklidir (Kelleher ve ark 2011).

SCD-EDS, ZIP13/SLC39A13 geninin homozigot fonksiyon kaybı mutasyonlarıyla ilişkili gösterilmektedir (Fukada ve ark 2008, Giunta ve ark 2008). Hasta, doğum sonrası büyüme geriliğini, iskelet ve bağ doku anormalliklerini, hiperelastik ve kolayca moraran cildi içeren bir grup semptomlar gösterir, ancak bu çinko eksikliği bağlantılı semptomlar, yukarıda tanımlanan iki kalıtsal hastalıktakinden farklı olarak, çinko takviyesi ile hafiflemezler. SCD-EDS'ye neden olan ZIP13 mutantlarının hızlandırılmış yıkımı hastalık patogenezi ile ilişkilidir ve bu yüzden ZIP13 protein ekspresyonunun, yıkımının önlenmesi ile kurtarılması, SCD-EDS'nin semptomlarının potansiyel iyileştirilmesinde rol oynayabilir (Bin ve ark 2014).

ZIP5/SLC39A5'in “nonsense” ve “missense” mutasyonlarının, otozomal dominant ya da haployetersiz bir biçimde, sendromik olmayan yüksek dereceli miyopi ile ilişkili olduğu (Guo ve ark 2014) yakın zamanda gösterilmiştir.

ZnT10/SLC30A10 geninin homozigot fonksiyon kaybı mutasyonları, metal şelasyon tedavisi ile düzeltilen Parkinsonizm ve hipermanganezemili distoniye yol açmaktadır (Quadri ve ark 2012, Tuschl ve ark 2012).



2. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezinden temin edilen Wistar cinsi erişkin erkek sıçanlar üzerinde aynı merkezde gerçekleştirildi. Çalışma protokolü Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları 41475755-2015/47 nolu Etik Kurulu tarafından onaylandı. Toplam 36 adet sıçan kullanıp araştırmada gruplar şu şekilde oluşturuldu:

Grup 1, (n:6) Kontrol Grubu: Hiçbir uygulamanın yapılmadığı normal diyetle beslenen gruptur.

Grup 2, (n:10) Pinealektomi Grubu: Pinealektomi yapılan ve normal diyetle beslenen gruptur.

Grup 3, (n:10) Pinealektomili Melatonin Uygulanan Grup: Pinealektomi yapılan ve 4 hafta boyunca 5mg/kg/gün deri altı melatonin uygulanan gruptur.

Grup 4, (n:10). Melatonin Uygulanan Grup: Dört hafta süreyle 5mg/kg/gün deri altı melatonin uygulanan gruptur.

2.1. Deneysel Uygulamalar

2.1.1. Melatonin Uygulaması

Ticari olarak temin edilmiş melatoninin (Sigma M-5250) 40 mg'ı 3 ml saf etanolde çözüldükten sonra bu süspansiyon karanlıkta ve ağzı kapalı olarak kullanma zamanına kadar buzlukta bekletilmiştir. Stok solusyondan 0.1 ml alınarak üzerine 0.9 ml NaCl konularak (5 mg/kg/gün) sabah saat 10.00'da sıçanlara deri altı olarak enjekte edilmiştir. Melatonin uygulaması 4 hafta süreyle her gün aynı saatlerde gerçekleştirilmiştir.

2.2. Pinealektomi

Pinealektomi 60 mg/kg dozunda ketamine hydrochloride (Ketalar, Parke-Davis) ve 5 mg/kg dozunda xylazine (Rompun, Bayer) bileşimi ile genel anestezi altında Kuszack ve Rodin'in (1997) belirlediği metoda uygun bir şekilde yapıldı.

2.3. İmmünohistokimyasal Boyama Prosedürü

İmmünohistokimyasal boyama prosedürleri Necmettin Erbakan Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda gerçekleştirilmiştir. Sıçanlardan alınan beyine (hipokampus, hipotalamus ve kortekse) ait örnekler cerrahi işlem yapıldıktan sonra %10'luk tamponlu formaldehit içerisine tesbit amacı ile konulmuştur. %10'luk formaldehit içerisine tesbit edilen dokulardan uygun örnekler alınarak ototeknikon (Leica ASP300 S- Tissue Processing) takibine alınıp parafin içine gömülerek mikrotom (Leica RM 2025 microtome) yardımıyla 5 µm'lik kesitler lam üzerine yerleştirilmiştir. ZnT-3 (Santa Cruz Biotechnology, ZnT-3 Antibody (G-14): sc-27508), ZIP-2 (Novus Biologicals, ZIP2 Antibody: NBP1-86830), metallothionein (metallothionein Antibody (UC1MT): NBP1-97493) primer antikoları ve DAB Detection Kit (Ref 760-500 LOT CD1520 ROCH 05269806001) otomatize slayt işleme sistemi (VENTANA BenchMark XT Automated Slide Processing System) ile boyanan lamalar 2 tür alkol serisi ve ksilen'den geçirilip, balzam sürülerek üzeri lamel ile kapatılmıştır.

2.3.1. Preperatların Fotoğraflanması ve İmmünoreaktivitenin Değerlendirilmesi

Boyalı preparatlar Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu ile incelenmiştir. Her preparatta aynı alanlar seçilerek mikroskoba bağlı Nikon Coolpix 5000 fotoğraf makinesi ile fotoğraflanmıştır. Aynı zamanda Nikon mikrometre preparatı (MBM11100 Satage Micrometer Type A) da kalibrasyon için fotoğraflanmıştır. Tüm fotoğraflar bilgisayar ortamına aktararak, Clemex Vision Lite 3.5 görüntü analizi programı ile incelenmiştir. İlk olarak Nikon micrometer microscope slide (Stage Micrometer Type A, MBM11100) ile uzunluk kalibrasyonu yapılarak, aynı büyütmede 4061812,5 µm²'lik alanlar seçilip bu alanlarda ZnT-3, ZIP2, metallothionein ile pozitif boyanan hücreler seçilerek adı geçen görüntü analizi programı ile otomatik olarak saydırılmıştır.

2.4. Serum Çinko Analizi

Deney hayvanlarından elde edilen serum örnekleri, %1'lik Triton X-100 (Sigma Chemical Co: T-9284) çözeltisi ile 1/50 oranında dilüe edilmek suretiyle Selçuk Üniversitesi Ziraat Fakültesi Toprak bölümünde bulunan "inductively coupled plasma emission spectrophotometry (ICP-AES; Varian Australia Pty LTD,

Australia) atomik emisyon cihazında gerçekleřtirilmiř ve sonuçlar mg/l olarak verilmiřtir.

2.5. İstatistiksel Değerlendirmeler

Bulguların istatistiksel değerlendirilmesi SPSS 22.0 bilgisayar paket programı ile yapılarak, bütün parametrelerin aritmetik ortalamaları ve standart hataları hesaplandı. Verilerin homojenliğinin belirlenmesi amacıyla “Shapiro-Wilk” testi yapıldı ve verilerin normal dağılım göstermediği belirlendi. Gruplar arası farklılıkların tespitinde Kruskal-Wallis H testi, farklılığın hangi gruptan kaynaklandığının belirlenmesi için ise Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ düzeyindeki farklılıklar anlamlı olarak kabul edildi.

3. BULGULAR

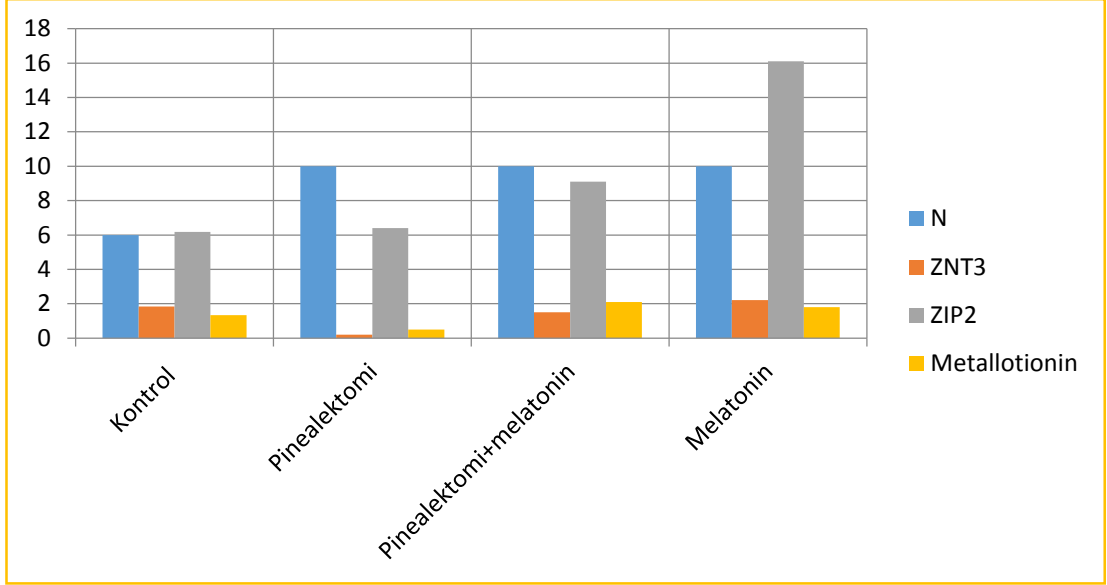
3.1. Hipotalamus ZnT3, ZIP2 ve Metallotionin Düzeyleri

Hipotalamus ZnT3, ZIP2 ve metallotionin düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında; hipotalamus ZnT3 düzeylerinin pinealektomili grupta diğer gruplardan anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0.05$); diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). Melatonin verilen grubun ZIP2 düzeylerinin diğer grupların hepsinden anlamlı olarak yüksek olduğu ($p<0.05$), diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p>0.05$). Pinealektomi + melatonin grubunun (grup 3) metallotionin düzeyleri kontrol grubundan (grup 1) anlamlı olarak yüksek bulundu ($p<0.05$), ancak sadece melatonin verilen gruba (grup 4) aralarında ise anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$) (Çizelge 3. 1, Şekil 3. 1).

Çizelge 3. 1. Çalışmaya Katılan Grupların Hipotalamus, ZnT3, ZIP2 ve Metallotionin Düzeylerinin Karşılaştırılması (4061812,5 μm^2 /hücre)

Gruplar	N	ZnT3	ZIP2	Metallotionin
Kontrol	6	1,83 $\pm$ 0,30 ^a	6,17 $\pm$ 0,47 ^b	1,33 $\pm$ 0,21 ^b
Pinealektomi	10	0,20 $\pm$ 0,13 ^b	6,40 $\pm$ 0,34 ^b	0,50 $\pm$ 0,22 ^c
Pinealektomi+melatonin	10	1,50 $\pm$ 0,34 ^a	9,10 $\pm$ 0,56 ^b	2,10 $\pm$ 0,27 ^a
Melatonin	10	2,20 $\pm$ 0,20 ^a	16,10 $\pm$ 1,77 ^a	1,80 $\pm$ 0,20 ^a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 3. 1. Çalışmaya Katılan Grupların Hipotalamus, ZnT3, ZIP2 ve Metallothionein Düzeylerinin Karşılaştırılması (4061812,5µm²/hücre).

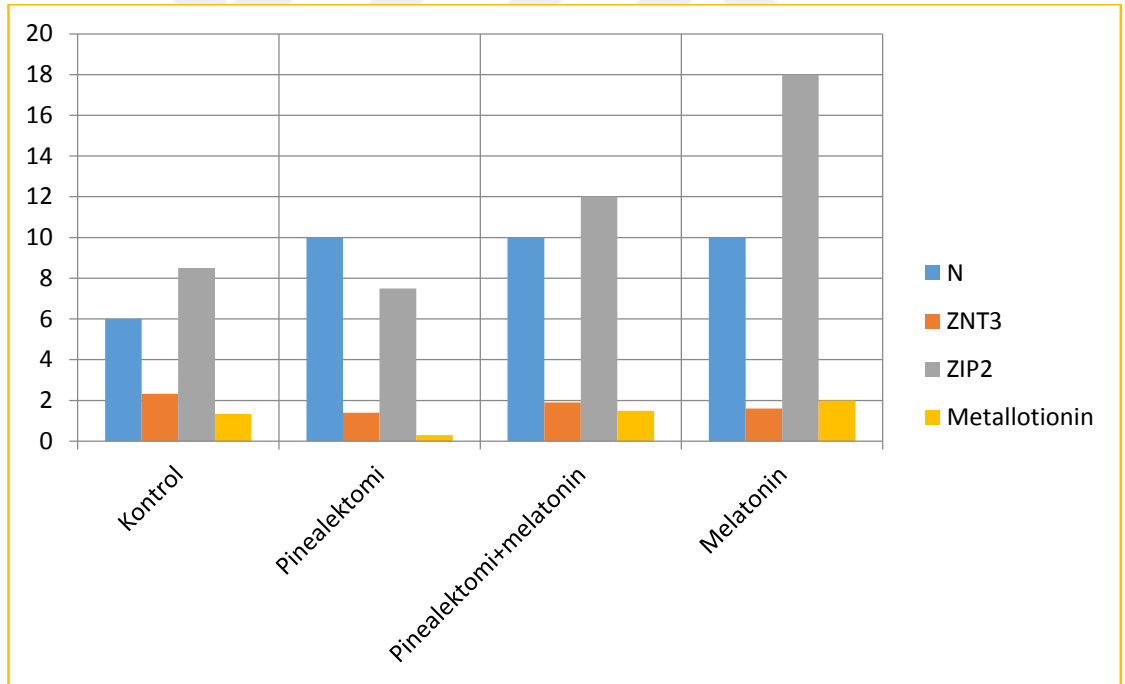
3.2. Korteks ZnT3, ZIP2 ve Metallothionein Düzeyleri

Korteks ZnT3, ZIP2 ve metallothionein düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında; kontrol grubunun (grup 1) korteks ZnT3 düzeylerinin pinealektomi (grup 2) ve melatonin (grup 4) gruplarından anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$), pinealektomi + melatonin grubu (grup 3) ile arasında anlamlı bir fark olmadığı bulundu ($p>0.05$). Grup 1 ve 2'nin ZIP2 düzeyleri, grup 3 ve 4'ün ZIP2 düzeylerinden anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$). Ancak grup 1 ve 2'nin kendi aralarında ZIP2 düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$). En düşük metallothionein düzeyleri pinealektomili grupta izlenirken ($p<0.05$); melatonin verilen grup 4'ün metallothionein düzeyleri grup 1 ve 2'den anlamlı olarak yüksekti ($p<0.05$). Ancak grup 3 ve 4 arasında ise metallothionein düzeyleri açısından anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Çizelge 3. 2, Şekil 3, 2).

Çizelge 3. 2. Çalışmaya Katılan Grupların Korteks dokusundaki, ZnT3, ZIP2 ve Metallothionein Düzeylerinin Karşılaştırılması (4061812,5µm²/hücre).

Gruplar	N	ZnT3	ZIP2	Metallothionein
Kontrol	6	2,33±0,21 ^a	8,50±0,22 ^c	1,33±0,21 ^b
Pinealektomi	10	1,40±0,22 ^b	7,50±0,50 ^c	0,30±0,15 ^c
Pinealektomi+melatonin	10	1,90±0,18 ^{ab}	12,00±0,59 ^b	1,50±0,16 ^{ab}
Melatonin	10	1,60±0,16 ^b	18,00±0,59 ^a	2,00±0,25 ^a

a,b,c: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir (p<0,05).



Şekil 3. 2. Çalışmaya Katılan Grupların Korteks dokusundaki, ZnT3, ZIP2 ve Metallothionein Düzeylerinin Karşılaştırılması (4061812,5µm²/hücre).

3.3. Hipokampus ZnT3, ZIP2 ve Metallothionein Düzeyleri

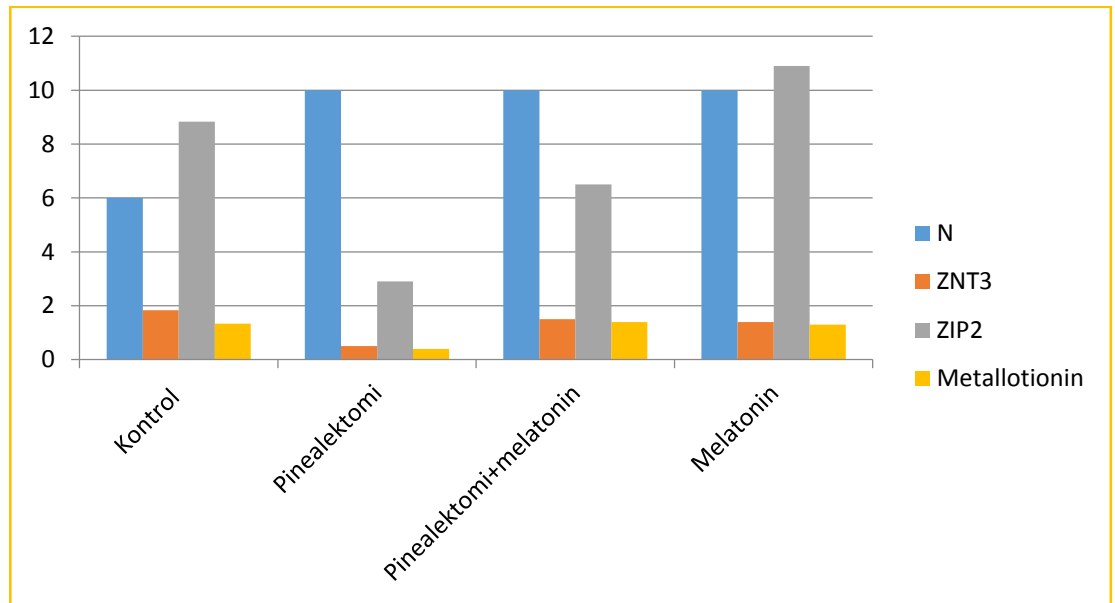
Hipokampus ZnT3, ZIP2 ve metallothionein düzeyleri açısından gruplar karşılaştırıldığında; en düşük ZnT3 düzeyleri pinealektomili grupta (grup 2)

izlenirken, diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark bulunamadı ($p>0.05$). ZIP2 düzeylerinin ise pinealektomili grupta (grup 2) en düşük olduğu, grup 2 < grup 3 < grup 1 < grup 4 şeklinde artış gösterdiği en yüksek düzeyin de grup 4'te olduğu görüldü. Metallothionein düzeylerinin ise pinealektomili grupta (grup 2) diğer gruplardan anlamlı olarak düşük olduğu ($p<0.05$); diğer gruplar arasında ise anlamlı bir fark olmadığı görüldü ($p>0.05$) (Çizelge 3. 3, Şekil 3, 3).

Çizelge 3. 3. Çalışmaya Katılan Grupların Hipokampus dokusundaki, ZnT3, ZIP2 ve Metallothionein Düzeylerinin Karşılaştırılması (4061812,5 μm^2 /hücre).

Gruplar	N	ZnT3	ZIP2	Metallothionein
Kontrol	6	1,83 $\pm$ 0,16 ^a	8,83 $\pm$ 0,37 ^b	1,33 $\pm$ 0,21 ^a
Pinealektomi	10	0,50 $\pm$ 0,16 ^b	2,90 $\pm$ 0,34 ^d	0,40 $\pm$ 0,16 ^b
Pinealektomi+melatonin	10	1,50 $\pm$ 0,16 ^a	6,50 $\pm$ 0,16 ^c	1,40 $\pm$ 0,16 ^a
Melatonin	10	1,40 $\pm$ 0,16 ^a	10,90 $\pm$ 0,37 ^a	1,30 $\pm$ 0,15 ^a

a,b,c,d: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($p<0,05$).



Şekil 3. 3. Çalışmaya Katılan Grupların Hipokampus dokusundaki, ZnT3, ZIP2 ve Metallothionein Düzeylerinin Karşılaştırılması (4061812,5 μm^2 /hücre).

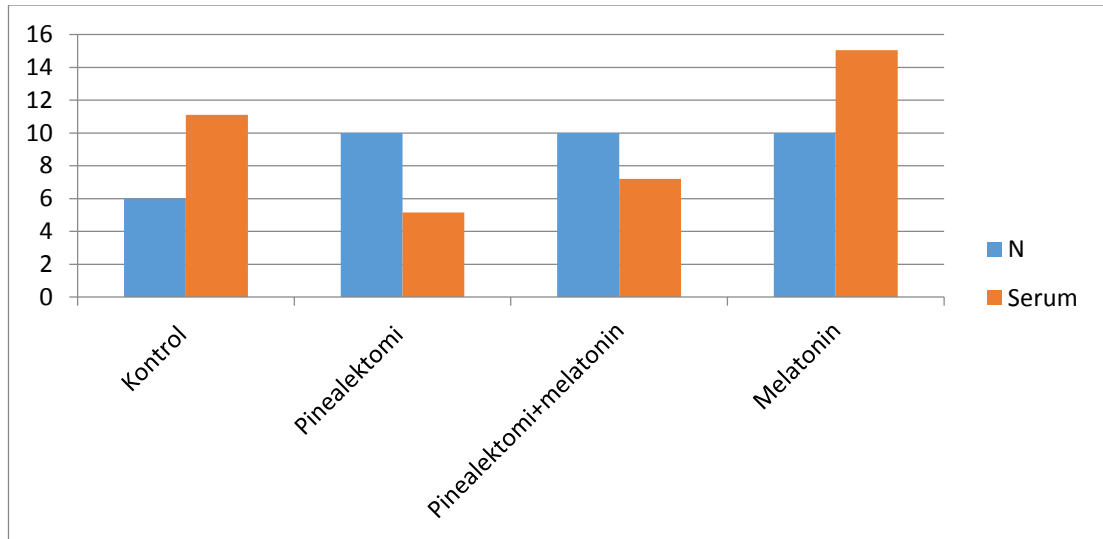
3.4. Çalışma Gruplarının Serum Çinko Düzeyleri

Çalışmamızda en düşük serum çinko seviyeleri pinealektomi uygulanan grup 2’de elde edildi ($p<0.01$). Pinealektomi + melatonin uygulanan grubun (grup 3) serum çinko düzeyleri Pinealektomi grubundan (grup 2) daha yüksekti ($p<0.01$). Çalışmamızda en yüksek serum çinko seviyeleri melatonin uygulanan grupta (grup 4) elde edildi ($p<0.01$) (Çizelge 3. 4, Şekil 3, 4).

Çizelge 3. 4. Çalışmaya Katılan Grupların Serum Çinko Düzeylerinin Karşılaştırılması (mg/l).

Gruplar	N	Serum Çinko
Kontrol	6	11,11±3,87 ^b
Pinealektomi	10	5,15±1,22 ^d
Pinealektomi+melatonin	10	7,20±1,15 ^c
Melatonin	10	15,04±3,01 ^a

a,b,c,d: Aynı sütunda farklı harf taşıyan gruplar arası ortalamalar arasındaki farklılık önemlidir ($p<0,01$).



Şekil 3. 4. Çalışmaya Katılan Grupların Serum Çinko Düzeylerinin Karşılaştırılması (mg/l).

4. TARTIŞMA

4.1. Beyin Korteksi, Hipokampus ve Hipotalamustaki Metallotionin Düzeylerinin Tartışılması

Metal bağlayıcı protein olarak tanımlanan metallotioninler (MT) metal toksisitesine karşı korunmada önemli rol oynayan düşük molekül ağırlıklı proteinlerdir (Fujie ve ark 2016, Kimura ve Kambe 2016). Metallotioninler dokuların çinko düzeyleri ve doku çinko dağılımının düzenlenmesinde önemli bir rol oynar (Kimura ve Kambe 2016, Liang ve ark 2016). Çinko fizyolojik koşullar altında metallotioninin güçlü bir uyarıcısıdır (Islam ve Loots du 2007, Kimura ve Kambe 2016). Çinko takviyesinde MT ekspresyonunun arttığı; eksikliğinde ise azaldığı gösterilmiştir (Kimura ve Kambe 2016).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada pinealektomi; beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta metallotionin düzeylerinde önemli azalmayla sonuçlandı. Pinealektomize veya cerrahi işlem yapılmamış normal sıçanlara melatonin desteği ise aynı parametrelerde artışla sonuçlandı.

Metallotioninler özellikle de metallotionin (MT) ailesinin üyesi olan metallotionin -3 (MT-3), esas olarak merkezi sinir sisteminde (CNS) eksprese edilir. MT-3 benzersiz bir nöronal büyüme önleme aktivitesine sahiptir (Vašák ve Meloni 2017). Alzheimer hastalığı dahil bir dizi metal bağlantılı nörodejeneratif bozukluktan etkilenen hastaların beyinde MT-3 belirgin bir şekilde azalmaktadır (Vašák ve Meloni 2017). Yaşlanma, nörodejeneratif bozukluklar için büyük bir risk faktörü olup kognitif bozukluklara duyarlılığın artmasıyla birlikte hastalıklara yapısal, kimyasal, fonksiyonel, nöropsikolojik ve genetik değişiklikler eşlik eder (Mocchegiani ve ark 2010). Normal beyinde çinko, bakır ve demir gibi önemli metal iyonların yüksek konsantrasyonu bulunur. Bu metaller beynin fizyolojik fonksiyonları için gerekli olduğundan, bu elementlerin regülasyonu da sıkı bir şekilde düzenlenir (Gaggelli ve ark 2006, Mocchegiani ve ark 2010). Ni ve ark (2015) tarafından epileptik sıçanlar üzerinde gerçekleştirilen çalışmada melatonin tedavisinin hipokampusta metallotionin düzeylerine artışa yol açtığı rapor edilmiştir. Melatonin desteğinin metallotionin düzeylerinde artışa yol açtığı şeklindeki benzer bir bulgu da deney hayvanlarının ön hipofizinde Alzheimer hastalığı ve melatonin ilişkisinin araştırıldığı bir çalışmada Roy ve ark (2015) tarafından rapor edilmiştir.

Kurşun toksisitesine maruz bırakılmış sıçanların dokularında melatonin desteğiyle elde edilen artmış metallotionin sentezinin kan, beyin ve kemik dokudaki kurşun düzeylerinin azaltılmasında önemli olduğu bildirilmiştir (Hernández-Plata ve ark 2015). Melatonin desteğinin alüminyum toksisitesinde de metallotionin sentezini artırarak böbrek dokusunda koruyucu etkiye yol açtığı gösterilmiştir (Karabulut-Bulan ve ark 2015). Metallotioninler çok etkili serbest radikal temizleyicileridirler (Fujie ve ark 2016). Yaşlanma, diğer özelliklerin yanı sıra beyindeki artmış bir metal iyon konsantrasyonu ile karakterize edilir bu da serbest radikal üretiminde büyük bir artışa neden olabilir (Zatta ve ark 2006). Pineal bez ve metallotionin ilişkisi yaşlılıkta görülen doku hasarının önlenmesini konu alan çalışmalarda bu yönüyle önemlidir. Sonuçta; melatonin ile metallotionin ilişkisinin araştırıldığı çalışmalar çoğunlukla, epilepsi ve Alzheimer hastalığı gibi sinir sistemindeki fonksiyon bozukluklarının tedavisinde yaşlanma veya metal toksisitesine karşı doku hasarının önlenmesi gibi olaylarda metallotioninlerin koruyucu rolüne odaklanmış görünmektedir. Hangi şekilde olursa olsun şurası açıktır ki melatonin ile metal bağlayıcı bir protein olan metallotioninler arasında önemli bir ilişki vardır.

Çalışmamızla bire-bir paralellik göstermese de melatonin desteğinin özellikle hipokampus-hipofiz gibi beyin dokusunda metallotionin düzeylerinde artışa yol açtığını bildiren raporlar vardır (Ni ve ark 2015, Roy ve ark 2015). Gerçekleştirdiğimiz çalışmada pinealektomize ve/veya normal sıçanlara melatonin desteğiyle beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta artmış metallotionin düzeyleri elde ettik. Çalışmamızın melatonin desteğiyle ilgili kısmı yukarıdaki araştırmacıların bulgularıyla uyumludur. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada pinealektomize sıçanlarda elde ettiğimiz beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamustaki azalmış metallotionin seviyelerini bire-bir karşılaştırabileceğimiz bir çalışmaya med-line taramalarda rastlayamadık. Ancak pineal bezle metallotioninler arasındaki kuvvetli pozitif ilişki düşünüldüğünde (Ni ve ark 2015, Roy ve ark 2015), pineal bezin ve dolayısıyla melatonin hormonunun yokluğunun da metallotionin sentezi üzerinde bir etkiye sahip olması beklenir.

Çalışmamızda elde ettiğimiz pinealektomize sıçanlarda; beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta azalan, pinealektomize veya cerrahi işlem yapılmamış normal sıçanlara melatonin desteğiyle beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta

artan metallothioneinin düzeylerinin med-line taramalardan yola çıkarak bu konudaki ilk ve orijinal bir bulgu olduğu söylenebilir.

4.2. Beyin Korteksi, Hipokampus ve Hipotalamustaki ZnT3 Düzeylerinin Tartışılması

Çinko, insan vücudunda en çok bulunan ikinci metaldir ve yaşam için vazgeçilmezdir. Kan ve dokularda fazla biriktiği zaman toksik etki gösterebilen, eksikliğinde ise çoklu fonksiyon bozukluklarına yol açan çinkonun konsantrasyonları da sıkı bir şekilde düzenlenmektedir (King ve ark 2000). Çinko taşınması için 24 tane spesifik çinko proteini tespit edilmiştir. Bu proteinler iki ana grupta fonksiyon görür. ZnT proteinleri sitosolik çinko konsantrasyonunu azaltırken, tam tersi ZIP proteinleri arttırıcı yönde etki gösterir (Klug 2010). İnsan beyni önemli oranda çinko içerir ve bunun yalnızca %5-15’lik oranı glutamaterjik nöronların sinaptik veziküllerinde yoğunlaşmıştır (Marger ve ark 2014). Bu veziküller içinde bir çinko taşıyıcı protein olan ZnT3 tarafından toplanan çinko, aktif nörotransmisyon sırasında nanomolardan mikromolara kadar olan konsantrasyonlarda dinlenmekte olan sinaptik yarık içine salınır (Marger ve ark 2014). Düşük konsantrasyonda çinko, çok sayıda voltaj veya ligand kapılı iyon kanalının aktivitesini modüle eder; bu da bu iki değerlikli katyonun, epilepsi, şizofreni ve Alzheimer hastalığı da dahil olmak üzere merkezi sinir sistemi bozukluklarının patofizyolojisinin analizinde dikkate alınması gerektiğini gösterir (Marger ve ark 2014).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada pinealektomi beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta ZnT3 düzeylerini önemli şekilde azaltırken, melatonin uygulaması hipotalamus ve hipokampustaki ZnT3 düzeylerine artışla sonuçlandı. Beyin korteksindeki ZnT3 düzeyleri melatonin uygulamasıyla değişmedi.

Çinko nörobiyolojisi alanında ortaya çıkan en ilginç fikirlerden bir tanesi çinkonun aslında bir nörotransmitter gibi hareket edebilmesidir. Böyle bir yetenek çinkonun presinaptik terminallerde konsantre olmasını ve daha sonra sinaptik yarık içine sıkı bir düzenleme ile serbest bırakılmasını gerektirir (McAllister ve Dyck 2017). Bu düşüncenin doğruluğunun moleküler kanıtı 1990’lı yılların sonunda çinko taşıyıcı protein 3 (ZnT3)’ün bulunması ile gösterilmiştir (Cole ve ark 1999). Presinaptik veziküller içine çinko yüklemekten sorumlu olan ve dolayısıyla glutamaterjik sinapsda çinkonun mevcudiyetini kontrol eden, buna paralel olarak

öğrenme ve hafızada önemli rol oynayan ZnT3'ün yaşla birlikte ve Alzheimer hastalığında azaldığı gösterilmiştir (Adlard ve ark 2015). Psikolojik strese maruz bırakılmış sıçanların hipokampusunda ZnT3 mRNA ekspresyonunda önemli azalmalar tespit edilmiştir (Dou ve ark 2014). Sindreu ve ark (2011), ZnT3'ten yoksun farelerde ZnT3'ün presinaptik mitojen aktive edici protein kinaz (MAPK) sinyallemesini modüle eden çinko homeostazı için önem taşıdığı ve hipokamusa bağlı bellek için gerekli olduğu sonucuna varmışlardır. Yine benzer şekilde ZnT3'ten yoksun farelerde bilişsel fonksiyonlarda gerileme olduğu Takeda (2014) tarafından da bildirilmiştir. Sonuç olarak, sadece hipokampus değil genel anlamda normal beyindeki serbest çinkonun fizyolojik aktivitesi büyük ölçüde ZnT3 ile belirlenen sinaptik vezikül çinko havuzuna bağlıdır (Lee ve ark 2011).

Pinealektominin beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta ZnT3 düzeylerini önemli şekilde azalttığı, melatonin uygulamasının ise hipotalamus ve hipokampustaki ZnT3 düzeylerinde artışa yol açtığı şeklindeki bulgularımızı bire-bir karşılaştırabileceğimiz bir çalışmaya rastlayamadık. Ancak nörodejeneratif bir hastalık olan Alzheimer hastalarının beyinlerinde melatonin seviyelerinin azaldığı, özellikle Alzheimer hastalarında gözlenen anksiyete ve depresyon davranışlarının tedavisinde melatoninin potansiyel bir tedavi aracı olabileceği düşünülmektedir (Nie ve ark 2017). Parkinson hastalığı oluşturulmuş hayvan modellerinde eksojen melatonin tedavisinin nöroprotektif etkiye yol açmasının yanı sıra, uyku ve anksiyete bozuklukları ile depresyon ve bellek bozukluklarının düzeltilmesinde de yararlı olabileceği rapor edilmiştir (Mack ve ark 2016). Yine melatonin sentezinin azaldığı yaşlı fare modellerinde gerçekleştirilen çalışmalar, eksojen melatonin tedavisinin mitokondriyal fonksiyon üzerinde koruyucu etkiye yol açtığını göstermektedir (Guo ve ark 2017). Yukarıda sonuçları sunulan raporların iki çarpıcı ortak özelliğinden birincisi; pineal bez beyin fonksiyonlarının düzenlenmesinde önemlidir, bu fonksiyonların düzenlenmesinde metallotioninler ve melatonin ilişkisi gösterilmiştir (Ni ve ark 2015, Roy ve ark 2015). İkincisi; sadece hipokampus değil genel anlamda normal beyindeki serbest çinkonun fizyolojik aktivitesinin büyük ölçüde ZnT3 ile sağlandığı (Lee ve ark 2011), buna paralel olarak öğrenme ve hafızada önemli rol oynayan ZnT3'ün yaşla, Parkinson ve Alzheimer gibi hastalıklarda kritik bir rol oynayabileceği anlaşılmıştır (Adlard ve ark 2015).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta elde ettiğimiz pinealektomide azalan, melatonin uygulamasıyla artan ZnT3 düzeyleri bu yönüyle oldukça önemli ve orijinal bir bulgu olarak takdim edilebilir.

4.3. Beyin Korteksi, Hipokampus ve Hipotalamustaki ZIP2 Düzeylerinin Tartışılması

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada pinealektomi kontrol grubuna oranla beyin korteksi ve hipotalamustaki ZIP2 düzeylerinde bir değişikliğe yol açmazken, hipokampustaki ZIP2 düzeylerinde baskılanmayla sonuçlandı. Melatonin uygulaması ise beyin korteksi, hipotalamus ve hipokampusta ZIP2 düzeylerinde artışa yol açtı.

ZIP2 proteinler çinkoyu hücre dışı boşluktan hücre içine alır (Gaither ve Eide 2000). ZIP2 tarafından çinkonun hücre içine alımı keratinositlerin farklılaşması ve epidermis döngüsü için gereklidir (Inoue ve ark 2014). ZIP2 m RNA ekspresyonu sınırlı dokularda kısmen düşüktür (Gaither ve Eide 2000), ama monositlerde (Cousins ve ark 2003) çinko tükenmesi ile ve makrofajlarda GM-CSF ile (Subramanian ve ark 2013), ve de keratinosit farklılaşması sırasında (Inoue ve ark 2014) anlamlı şekilde uyarılırken, tümoral olaylarda ZIP2 ekspresyonunun azaldığı bilinmektedir (Desouki ve ark 2007).

Çalışmamızın bu kısmıyla ilgili bulgularını bire-bir tartışabileceğimiz bir literatüre rastlayamadık. Ancak ZIP proteinlerinin sitosolik çinkoyu arttırıcı yönde etki gösterdiği bilinmektedir (Klug 2010). Çalışmamızda özellikle ZIP2 proteinlerinin pinealektomiden etkilenmemesi bir sonraki bölümde tartışacağımız bir bulgu olan serum çinko düzeylerinin azalmasıyla ilişkili olabilir. Tam tersi melatonin uygulamasının beyin korteksi, hipotalamus ve hipokampusta ZIP2 düzeylerinde artışa yol açması da melatonin desteğinde artan serum çinkosuyla ilişkili gibi görünmektedir.

4.4. Çalışma Gruplarının Serum Çinko Düzeylerinin Tartışılması

Çalışmamızda en düşük serum çinko seviyeleri pinealektomi uygulanan grup 2’de elde edildi. Pinealektomi + melatonin uygulanan grubun (grup 3) serum çinko düzeyleri Pinealektomi grubundan (grup 2) daha yüksekti. Çalışmamızda en yüksek serum çinko seviyeleri melatonin uygulanan grupta (grup 4) elde edildi.

Pineal bez beyinde çinko açısından en zengin bölgedir (Fabris ve ark 1991). Yaşlanmayla birlikte plazma melatonin seviyeleri azalmaktadır (Reiter ve ark 1981). Benzer şekilde yaşlanma ile çinkonun gastrointestinal emiliminin azaldığı ve plazma çinko seviyelerinin düştüğü hem insanlarda (Turnlund ve ark 1986), hem de hayvanlarda gösterilmiştir (Sugarman ve Munro 1980). Mocchegiani ve arkadaşları (1996), tarafından gerçekleştirilen çalışmada pinealektomize farelere 1 ay boyunca melatonin (100 µg/fare) uygulaması farelerde vücut çinko havuzunu negatiften pozitif değere çevirmiştir. Aynı farelere melatonin uygulamasına 1 ay boyunca ara verilmesi negatif çinko havuzunun tekrar ortaya çıkmasına yol açmıştır. Aynı farelere yeniden bir aylık melatonin uygulaması negatif çinko havuzunun onarılmasını sağlamıştır. Benzer bulgular yaşlı farelerde de gösterilmiştir (Mocchegiani ve ark 1994). Melatonin muhtemelen bu etkisini çinkonun sindirim sisteminden emilimini artırarak göstermektedir. Barsaklarda melatonin için spesifik bağlama bölgelerinin bulunması da bu hormonun çinkonun sindirim sisteminden emilimini artırmasında temel bir mekanizma gibi görülmektedir (Lee ve Pang 1992, Lee ve Pang 1993). Ancak çinko ile melatonin arasındaki bu ilişkinin tek yönlü olmadığı da söylenebilir. Çinko melatonin sentezi için önemli bir nörotransmitter olan serotoninin senteziyle ilişkilidir (Johnson 2001). Özellikle serotonin oluşumunda L-amino asit dekarboksilaz tarafından katalizlenen reaksiyon basamağında çinko kofaktör olarak rol oynamaktadır. Sonuç olarak, çinko serotonin, serotonin de melatonin sentezi için gerekli olduğundan bir çinko defekti melatonin seviyelerinin azalmasıyla sonuçlanabilir (Johnson 2001). Zaten çinko eksikliğinin serum melatonin düzeylerinde baskılanmaya, çinko uygulamasının ise melatonin salınımında önemli bir artışa yol açtığı rapor edilmiştir (Bediz ve ark 2003). Yukarıda bahsedilen çalışmalar melatoninin sindirim sisteminde çinkonun emilimiyle ilişkili olabileceğini düşündürür. Sindirim sisteminde melatonin reseptörlerinin varlığı bu düşüncüyü kuvvetlendirir (Lee ve Pang 1992, Lee ve Pang 1993).

Gerçekleştirdiğimiz çalışmada pinealektomize sıçanlarda elde ettiğimiz azalmış veya melatonin uygulamasıyla elde ettiğimiz artmış serum çinko düzeyleri yukarıda sonuçları verilen araştırmacıların raporlarıyla uyumludur.

Çalışmamızın bir bütün olarak bulguları pineal bezin beyin dokusunda özellikle ZnT3 ve metallothioneinlerin regülasyonu ile yakın ilişkili olduğunu

göstermektedir. Özellikle pineal bezin beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamustaki ZnT3 regölasyonuyla ilişkili elde ettiğimiz bulgunun med-line taramalara dayanarak ilk ve orijinal bulgu olduğunu söyleyebiliriz.



5. SONUÇ ve ÖNERİLER

Çalışmamızın bulguları bir bütün olarak değerlendirildiğinde;

1. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada pinealektomi; beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamustaki metallothionein düzeylerinde önemli azalmayla sonuçlandı. Pinealektomize veya cerrahi işlem yapılmamış normal sıçanlara melatonin desteği ise aynı parametrelerde artışla sonuçlandı.

2. Gerçekleştirdiğimiz çalışmada pinealektomi beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamusta ZnT3 düzeylerini önemli şekilde azaltırken, melatonin uygulaması hipotalamus ve hipokampustaki ZnT3 düzeylerinde artışla sonuçlandı. Beyin korteksindeki ZnT3 düzeyleri melatonin uygulamasıyla değişmedi.

3. Yine çalışmamızda pinealektomi kontrol grubuna oranla beyin korteksi ve hipotalamustaki ZIP2 düzeylerinde bir değişikliğe yol açmazken, hipokampustaki ZIP2 düzeylerinde baskılanmayla sonuçlandı. Melatonin uygulaması ise beyin korteksi, hipotalamus ve hipokampusta ZIP2 düzeylerinde artışa yol açtı.

4. Pinealektomi serum çinko düzeylerinde baskılanmayla, melatonin desteği ise serum çinkosunda artışla sonuçlanmıştır.

5. Çalışmamızın bir bütün olarak bulguları pineal bezin beyin dokusunda özellikle ZnT3 ve metallothioneinlerin regülasyonu ile yakın ilişkili olduğunu göstermektedir.

6. Özellikle pineal bezin beyin korteksi, hipokampus ve hipotalamustaki ZnT3 regülasyonu ile ilişkili elde ettiğimiz bulgunun med-line taramalara dayanarak ilk ve orijinal bulgu olduğunu söyleyebiliriz.

6. KAYNAKLAR

- Acuña-Castroviejo D, Escames G, Venegas C, Díaz-Casado ME, Lima-Cabello E, López LC, Rosales-Corral S, Tan DX, Reiter RJ, 2014. Extrapineal melatonin: sources, regulation, and potential functions. *Cell. Mol. Life Sci*, 71, 16, 2997–3025.
- Acuña-Castroviejo D, Martín M, Macías M, Escames G, León J, Khaldy H, Reiter RJ, 2001. Melatonin, mitochondria, and cellular bioenergetics. *J. Pineal Res*, 30, 2, 65–74.
- Acuña-Castroviejo D, Reiter RJ, Menéndez-Peláez A, Pablos MI, Burgos A, 1994. Characterization of high-affinity melatonin binding sites in purified cell nuclei of rat liver. *J. Pineal Res*, 16, 2, 100–12.
- Adlard PA, Parncutt JM, Finkelstein DI, Bush AI, 2010. Cognitive loss in zinc transporter-3 knock-out mice: a phenocopy for the synaptic and memory deficits of Alzheimer's disease? *J Neurosci*, 30, 1631–36.
- Adlard PA, Parncutt J, Lal V, James S, Hare D, Doble P, Finkelstein DI, Bush AI, 2015. Metal chaperones prevent zinc-mediated cognitive decline. *Neurobiol Dis*, 81, 196–202.
- Agil A, Reiter RJ, Jiménez-Aranda A, Ibán-Arias R, Navarro-Alarcón M, Marchal JA, Adem A, Fernández-Vázquez G, 2013. Melatonin ameliorates low-grade inflammation and oxidative stress in young Zucker diabetic fatty rats. *J. Pineal Res*, 54, 4, 381–88.
- Akagi T, Kaneda M, Ishii K, Hashikawa T, 2001. Differential subcellular localization of zinc in the rat retina. *J Histochem Cytochem*, 49, 87–96.
- Alberti S, Cevenini E, Ostan R, Capri M, Salvioli S, Bucci L, Ginaldi L, De Martinis M, Franceschi C, Monti D, 2006. Age-dependent modifications of Type 1 and Type 2 cytokines within virgin and memory CD4+ T cells in humans. *Mech Ageing Dev*, 127, 6, 560–66.
- Allegra M, Reiter RJ, Tan DX, Gentile C, Tesoriere L, Livrea MA, 2003. The chemistry of melatonin's interaction with reactive species. *J. Pineal Res*, 34, 1, 1–10.
- Amado D, Mazzacoratti MGN, 2004. O papel da melatonina na epilepsia. *Cienc. Cult. (São Paulo)*, 56, 1.
- Amaral FG, Castrucci AM, Cipolla-Neto J, Poletini MO, Mendez N, Richter HG, Sellix MT, 2014. Environmental control of biological rhythms: effects on development, fertility and metabolism. *J Neuroendocrinol*, 26, 9, 603–12.
- Andreini C, Bertini I, 2012. A bioinformatics view of zinc enzymes. *J Inorg*, 111, 150–6.
- Andreini C, Bertini I, Cavallaro G, 2011. Minimal function al site sallowa classification of zinc sites in proteins. *PLoS One*, 6, 26325.
- Andrews GK, 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochem Pharmacol*, 1, 59(1), 95–104.
- Andrews GK, 2008. Regulation and function of Zip4, the acrodermatitis enteropathica gene. *Biochem Soc Trans*, 36, 1242–6.
- Antala S, Dempski RE, 2012. The human ZIP4 transporter has two distinct binding affinities and mediates transport of multiple transition metals. *Biochemistry*, 51, 963–73.
- Aras MA, Aizenman E, 2011. Redox regulation of intracellular zinc: molecular signaling in the life and death of neurons. *Antioxid Redox Signal*, 15, 2249–63.
- Arus D, Dancs A, Nagy NV, Gajda T, 2013. A comparative study on the possible zinc binding sites of the human ZnT3 zinc transporter protein. *Dalton Trans*, 42, 12031–40.
- Asmussen JW, Von Sperling ML, Penkowa M, 2009. Intraneuronal signaling pathways of metallothionein. *J Neurosci Res*, 87, 13, 2926–36.
- Assaf SY, Chung SH, 1984. Release of endogenous Zn²⁺ from brain tissue during activity. *Nature*, 308, 734–6.
- Aydemir TB, Liuzzi JP, McClellan S, Cousins RJ, 2009. Zinc transporter ZIP8 (SLC39A8) and zinc influence IFN- γ expression in activated human T cells. *J Leukoc Biol*, 86, 337–48.

- Ba LA, Doering M, Burkholz T, Jacob C, 2009. Metal trafficking: from maintaining the metal homeostasis to future drug design. *Metallomics*, 1, 292-311.
- Babula P, Masarik M, Adam V, Eckschlager T, Stiborova M, Trnkova L, Skutkova H, Provaznik I, Hubalek J, Kizek R, 2012. Mammalian metallothioneins: properties and functions. *Metallomics*, 4, 8, 739-50.
- Balik A, Kretschmannová K, Mazna P, Svobodová I, Zemková H, 2004. Melatonin action in neonatal gonadotrophs. *Physiol Res*, 53, 1, 153-66.
- Baltaci AK, Mogulkoc R, Kul A, Bediz CS, Ugur A, 2004. Opposite effects of zinc and melatonin on thyroid hormones in rats. *Toxicology*, 195, 1, 69-75.
- Baltaci AK, Mogulkoc R, Turkoz Y, Bediz CS, Ozugurlu F, 2004. The effect of pinealectomy and zinc deficiency on nitric oxide levels in rats with induced *Toxoplasma gondii* infection. *Swiss medical weekly*, 134, 23-24, 359-63.
- Barnett JP, Blindauer CA, Kassar O, Khazaipoul S, Martin EM, Sadler PJ, Stewart AJ, 2013. Allosteric modulation of zinc speciation by fatty acids. *Biochim Biophys Acta*, 1830, 5456-64.
- Bateman A, Birney E, Durbin R, Eddy SR, Howe KL, Sonnhammer EL, 2000. The Pfam protein families database. *Nucleic Acids Res*, 28, 263-6.
- Bediz CS, Baltaci AK, Mogulkoc R, 2003. Both zinc deficiency and supplementation affect plasma melatonin levels in rats. *Acta physiologica Hungarica*, 90, 4, 335-9.
- Bellomo E, Massarotti A, Hogstrand C, Maret W, 2014. Zinc ions modulate protein tyrosine phosphatase 1B activity. *Metallomics*, 6, 1229-39.
- Benítez-King G, 2006. Melatonin as a cytoskeletal modulator: implications for cell physiology and disease. *J. Pineal Res*, 40, 1, 1-9.
- Berg JM, Shi Y, 1996. The galvanization of biology: a growing appreciation for the roles of zinc. *Science*, 271, 1081-5.
- Besser L, Chorin E, Sekler I, Silverman WF, Atkin S, Russell JT, Hershfinkel M, 2009. Synaptically released zinc triggers metabotropic signaling via a zinc-sensing receptor in the hippocampus. *J Neurosci*, 29, 2890-1.
- Beyer N, Coulson DT, Heggarty S, Ravid R, Hellemans J, Irvine GB, Johnston JA, 2012. Zinc transporter mRNA levels in Alzheimer's disease postmortem brain. *J Alzheimers Dis*, 29, 863-73.
- Beyer N, Coulson DT, Heggarty S, Ravid R, Irvine GB, Hellemans J, Johnston JA, 2009. ZnT3 mRNA levels are reduced in Alzheimer's disease post-mortem brain. *Mol Neurodegener*, 4, 53.
- Beyersmann D, Haase H, 2001. Functions of zinc in signaling, proliferation and differentiation of mammalian cells. *Biometals*, 14, 3-4, 331-41.
- Bin BH, Fukada T, Hosaka T, Yamasaki S, Ohashi W, Hojyo S, Miyai T, Nishida K, Yokoyama S, Hirano T, 2011. Biochemical characterization of human ZIP13 protein: a homo-dimerized zinc transporter involved in the spondylocheiro dysplastic EhlersDanlos syndrome. *J Biol Chem*, 286, 40255-65.
- Bin BH, Hojyo S, Hosaka T, Bhin J, Kano H, Miyai T, Ikeda M, Kimura-Someya T, Shirouzu M, Cho EG, Fukue K, Kambe T, Ohashi W, Kim KH, Seo J, Choi DH, Nam YJ, Hwang D, Fukunaka A, Fujitani Y, Yokoyama S, Superti-Furga A, Ikegawa S, Lee TR, Fukada T, 2014. Molecular pathogenesis of Spondylocheiroadysplastic Ehlers-Danlos syndrome caused by mutant ZIP13 proteins. *EMBO Mol Med*, 6, 1028-42.
- Bjorklund NL, Reese LC, Sadagoparamanujam VM, Ghirardi V, Woltjer RL, Taglialetela G, 2012. Absence of a myloid beta oligomers at the postsynapse and regulated synaptic Zn²⁺ in cognitively intact aged individuals with Alzheimer's disease neuropathology. *Mol Neurodegener*, 7, 23.
- Bofill R, Capdevila M, Atrian S, 2009. Independent metal-binding features recombinant convergently draw a step gradation between Zn- and Cu- thioneins. *Metallomics*, 1, 229-34.
- Borazan H, Tuncer S, Yalcin N et al, 2010. Effects of preoperative oral melatonin medication on postoperative analgesia, sleep quality, and sedation in patients undergoing elective prostatectomy: a randomized clinical trial. *J Anesth*, 24, 155-60.

- Bossers K, Wirz KT, Meerhoff GF, Essing AH, van Dongen JW, Houba P, Kruse CG, Verhaagen J, Swaab DF, 2010. Concerted changes in transcripts in the prefrontal cortex precede neuropathology in Alzheimer's disease. *Brain*, 133(12), 3699-723.
- Botella H, Stadthagen G, Lugo-Villarino G, de Chastellier C, Neyrolles O, 2012. Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends Microbiol*, 20, 106–112.
- Boutin JA, 2007. Melatonin binding site MT3 is QR2: state of the art. *Soc Biol*, 201, 97-103.
- Brautigan DL, Bornstein P, Gallis B, 1981. Phosphotyrosyl-protein phosphatase. Specific inhibition by Zn. *J Biol Chem*, 256, 6519–22.
- Bremmer I, 1991. Nutritional and physiological significance of metallothionein. *Meth Enzymol*, 205, 25-35.
- Brewer GJ, 2009. Zinc and tetrathiomolybdate for the treatment of Wilson's disease and the potential efficacy of anticopper therapy in a wide variety of diseases. *Metallomics*, 1, 199-206.
- Broun ER, Greist A, Tricot G, Hoffman R, 1990. Excessive zinc ingestion. A reversible cause of sideroblastic anemia and bone marrow depression. *JAMA*, 264, 1441–3.
- Brown KH, Pearson JM, Rivera J, Allen LH, 2002. Effect of supplemental zinc on the growth and serum zinc concentrations of prepubertal children: a meta-analysis of randomized controlled trials. *Am J Clin Nutr*, 75, 1062–71.
- Brydon L, Roka F, Petit L, de Coppet P, Tissot M, Barrett P, Morgan PJ, Nanoff C, Strosberg AD, Jockers R, 1999. Dual signaling of human Mel1a melatonin receptors via G(i2), G(i3), and G(q/11) proteins. *Mol Endocrinol*, 13, 12, 2025-38.
- Bulbuler N, Dogru O, Yekeler H, Cetinkaya Z, Ilhan N, Kirkil C, 2005. Effect of melatonin on wound healing in normal and pinealectomized rats. *J Surg Res*, 123, 1, 3-7.
- Byeon Y, Lee K, Park YI, Park S, Back K, 2013. Molecular cloning and functional analysis of serotonin N-acetyltransferase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Pineal Res*, 55, 4, 371-6.
- Cai B, Zheng Q, Huang ZX, 2005. The properties of the metal-thiolate clusters in recombinant mouse metallothionein-4. *Protein J*, 24, 6, 327-36.
- Cardinali DP, Ladizesky MG, Boggio V, Cutrera RA, Mautalen C, 2003. Melatonin effects on bone: experimental facts and clinical perspectives. *J Pineal Res*, 34, 2, 81-7.
- Carillo-Vico A, Lardone PJ, Alvarez- Sanchez N, Rodriguez- Rodriguez A, Guerreto JM, 2013. Melatonin: buffering the immune system. *Int. J. Mol. Sci*, 14, 8638- 83.
- Carpenè E, Andreani G, Isani G, 2007. Metallothionein functions and structural characteristics. *J Trace Elem Med Biol*, 21, 1, 35-9.
- Casey CE, Hambidge KM, Neville MC, 1985. Studies in human lactation: zinc, copper, manganese and chromium in human milk in the first month of lactation. *Am J Clin Nutr*, 41, 1193–1200.
- Caumo W, Torres F, Moreira NL Jr et al, 2007. The clinical impact of preoperative melatonin on postoperative outcomes in patients undergoing abdominal hysterectomy. *Anesth Analg*, 105, 1263–71.
- Celinski K, Konturek SJ, Konturek PC, Brzozowski T, Cichoz-Lach H, Slomka M, Malgorzata P, Bielanski W, Reiter RJ, 2011. Melatonin or L-tryptophan accelerates healing of gastroduodenal ulcers in patients treated with omeprazole. *J Pineal Res*, 50, 4, 389-94.
- Chabosseau P, Tuncay E, Meur G, Bellomo EA, Hessels A, Hughes S, Johnson PR, Bugliani M, Marchetti P, Turan B, Lyon AR, Merks M, Rutter GA, 2014. Mitochondrial and ER-Targeted eCALWY Probes Reveal High Levels of Free Zn. *ACS Chem Biol*, 9, 2111–20.
- Chandra RK, 1983. Trace elements and immune responses. *Immunology today*, 4, 11, 322-5.
- Chao Y, Fu D, 2004. Kinetic study of the antiport mechanism of an *Escherichia coli* zinc transporter, ZitB. *J Biol Chem*, 279, 12043–50.
- Chen RW, Ganther HE, 1975. Relative cadmium-binding capacity of metallothionein and other cytosolic fractions in various tissues of the rat. *Environ Physiol Biochem*, 5, 6, 378-88.

- Cherezov V, Hofer N, Szebenyi DM, Kolaj O, Wall JG, Gillilan R, Srinivasan V, Jaroniec CP, Caffrey M, 2008. Insights into the mode of action of a putative zinc transporter CzcB from *Thermophilus*. *Structure*, 16, 1378–88.
- Cherian MG, Huang PC, Klaassen CD, Liu YP, Longfellow DG, Waalkes MP, 1993. National Cancer Institute workshop on the possible roles of metallothionein in carcinogenesis. *Cancer Res*, 53(4), 922–5.
- Chiaverini N, De Ley M, 2010. Protective effect of metallothionein on oxidative stress-induced DNA damage. *Free Radic Res*, 44, 6, 605–13.
- Chowanadisai W, Graham DM, Keen CL, Rucker RB, Messerli MA, 2013. Neurulation and neurite extension require the zinc transporter ZIP12 (slc39a12). *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 9903–8.
- Chowanadisai W, Lonnerdal B, Kelleher SL, 2006. Identification of a mutation in SLC30A2 (ZnT-2) in women with low milk zinc concentration that results in transient neonatal zinc deficiency. *J Biol Chem*, 281, 39699–707.
- Christensen MK, Frederickson CJ, 1998. Zinc-containing afferent projections to the rat corticomedial amygdaloid complex: a retrograde tracing study. *J Comp Neurol*, 26, 400(3), 375–90.
- Christianson DW, 1991. Structural biology of zinc. *Adv Protein Chem*, 42, 281–355.
- Chung RS, Howells C, Eaton ED, Shabala L, Zovo K, Palumaa P, Sillard R, Woodhouse A, Bennett WR, Ray S, Vickers JC, West AK, 2010. The native copper- and zinc-binding protein metallothionein blocks copper-mediated A β aggregation and toxicity in rat cortical neurons. *PLoS One*, 11, 5, 8, 12030.
- Chung RS, Penkowa M, Dittmann J, King CE, Bartlett C, Asmussen JW, Hidalgo J, Carrasco J, Leung YK, Walker AK, Fung SJ, Dunlop SA, Fitzgerald M, Beazley LD, Chuah MI, Vickers JC, West AK, 2008. Redefining the role of metallothionein within the injured brain: extracellular metallothioneins play an important role in the astrocyte-neuron response to injury. *J Biol Chem*, 283(22), 15349–58.
- Chung RS, Vickers JC, Chuah MI, West AK, 2003. Metallothionein-IIA promotes initial neurite elongation and postinjury reactive neurite growth and facilitates healing after focal cortical brain injury. *J Neurosci*, 15, 23(8), 3336–42.
- Chunjin Li, Xu Zhou, 2015. Melatonin and male reproduction. *Clinica Chimica Acta*, 446, 175–180.
- Claustrat B, Lestonb J, 2015. Melatonin: Physiological effects in humans. *Neurochirurgie*, 61, 77–84.
- Cole TB, Wenzel HJ, Kafer KE, Schwartzkroin PA, Palmiter RD, 1999. Elimination of zinc from synaptic vesicles in the intact Mouse brain by disruption of the ZnT3 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 1716–21.
- Coleman JE, 1992. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem*, 61, 897–946.
- Colvin RA, Bush AI, Volitakis I, Fontaine CP, Thomas D, Kikuchi K, Holmes WR, 2008. Insights into Zn²⁺ homeostasis in neurons from experimental and modeling studies. *Am J Physiol Cell Physiol*, 294, 726–42.
- Colvin RA, Fontaine CP, Laskowski M, Thomas D, 2003. Zn²⁺ transporters and Zn²⁺ homeostasis in neurons. *Eur J Pharmacol*, 31, 479(1–3), 171–85.
- Colvin RA, Holmes WR, Fontaine CP, Maret W, 2010. Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. *Metallomics*, 2, 306–17.
- Conklin DS, McMaster JA, Culbertson MR, Kung C, 1992. COT1, a gene involved in cobalt accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*, 12, 3678–88.
- Costa EJ, Lopes RH, Lamy-Freund MT, 1995. Permeability of pure lipid bilayers to melatonin. *J. Pineal Res*, 19, 3, 123–6.
- Costello LC, Franklin RB, 2011. Zinc is decreased in prostate cancer: an established relationship of prostate cancer! *J Biol Inorg Chem*, 16, 3–8.

- Costello LC, Franklin RB, Zou J, Feng P, Bok R, Swanson MG, Kurhanewicz J, 2011. Human prostate cancer ZIP1/ zinc /citrate genetic/ metabolic relationship in the TRAMP prostate cancer animal model. *Cancer Biol Ther*, 12, 1078–84.
- Coudray N, Valvo S, Hu M, Lasala R, Kim C, Vink M, Zhou M, Provasi D, Filizola M, Tao J, Fang J, Penczek PA, Ubarretxena-Belandia I, Stokes DL, 2013. In ward-facing conformation of the zinc transporter YiiP revealed by cryoelectron microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA*, 110, 2140–5.
- Cousins RJ, Blanchard RK, Popp MP, Liu L, Cao J, Moore JB, Green CL, 2003. A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess genes expressed in human THP-1 mononuclear cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100, 6952–7.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Roife AM, 2002. Metallothionein: the multipurpose protein. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 59, 4, 627–47.
- Crawford IL, Connor JD, 1973. Localization and release of glutamic acid in relation to the hippocampal mossy fibre pathway. *Nature*, 17, 244(5416), 442–3.
- Csermely P, Szamel M, Resch K, Somogyi J, 1988. Zinc can increase the activity of protein kinase C and contributes to its binding to plasma membranes in T lymphocytes. *J Biol Chem*, 263, 6487–90.
- Cuajungco MP, Lees GJ, 1997. Zinc metabolism in the brain: relevance to human neurodegenerative disorders. *Neurobiol Dis*, 4, 137–69.
- Cui Y, Vogt S, Olson N, Glass AG, Rohan TE, 2007. Levels of zinc, selenium, calcium, and iron in benign breast tissue and risk of subsequent breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*, 16, 1682–5.
- Dansch G, Zimmer J, 1978. An improved Timm sulphide silver method for light and electron microscopic localization of heavy metals in biological tissues. *Histochemistry*, 55, 27–40.
- Dempski RE, 2012. The cation selectivity of the ZIP transporters. *Curr Top Membr*, 69, 221–45.
- Desouki MM, Geradts J, Milon B, Franklin RB, Costello LC, 2007. hZip2 and hZip3 zinc transporters are down regulated in human prostate adenocarcinomatous glands. *Mol Cancer*, 6, 37.
- Devirgiliis C, Zalewski PD, Perozzi G, Murgia C, 2007. Zinc fluxes and zinc transporter genes in chronic diseases. *Mutat Res*, 622, 84–93.
- Ding ZC, Ni FY, Huang Z X, 2010. Neuronal growth -inhibitory factor (metallothionein-3): structure-function relationships. *FEBS J*, 277, 2912–20.
- Dou X, Tian X, Zheng Y, Huang J, Shen Z, Li H, Wang X, Mo F, Wang W, Wang S, Shen H, 2014. Psychological stress induced hippocampus zinc dyshomeostasis and depression-like behavior in rats. *Behav Brain Res*, 273, 133–8.
- Dreosti IE, 1983. Zinc and the central nervous system. In: Dreosti IE, Smith RM, eds. *Neurobiology of the Trace Elements*, 1, 135–62.
- Drew JE, Williams LM, Hannah LT, Barrett P, Abramovich DR, 1998. Melatonin receptors in the human fetal kidney: 2- [125I] iodomelatonin binding sites correlated with expression of Mel1a and Mel1b receptor genes. *J Endocrinol*, 156, 2, 261–7.
- Dubbels R, Reiter RJ, Klenke E, Goebel A, Schnakenberg E, Ehlers C, Schiwara HW, Schloot W, 1995. Melatonin in edible plants identified by radioimmunoassay and by high performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pineal Res*, 18, 1, 28–31.
- Dubocovich ML, 1995. Melatonin receptors: are there multiple subtypes? *Trends Pharmacol Sci*, 16, 2, 50–6.
- Dubocovich ML, Delagrange P, Krause DN, Sugden D, Cardinali DP, Olcese J, 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXV. Nomenclature, classification, and pharmacology of G protein-coupled melatonin receptors. *Pharmacol Rev*, 62, 3, 343–80.
- Dubocovich ML, Markowska M, 2005. Functional MT1 and MT2 melatonin receptors in mammals. *Endocrine*, 27, 2, 101–10.
- Dubocovich ML, Rivera-Bermudez MA, Gerdin MJ, Masana MI, 2003. Molecular pharmacology, regulation and function of mammalian melatonin receptors. *Front Biosci*, 1, 8, 1093–108.

- Dubocovich ML, Yun K, Al-Ghoul WM, Benloucif S, Masana MI, 1998. Selective MT2 melatonin receptor antagonists block melatonin-mediated phase advances of circadian rhythms. *FASEB J*, 12, 12, 1211-20.
- Dufner-Beattie J, Langmade SJ, Wang F, Eide D, Andrews GK, 2003. Structure, function, and regulation of a subfamily of mouse zinc transporter genes. *J Biol Chem*, 278, 50142– 50.
- Dufourny L, Levasseur A, Migaud M, Callebaut I, Pontarotti P, Malpoux B, Monget P, 2008. GPR50 is the mammalian ortholog of Mel1c: evidence of rapid evolution in mammals. *BMC Evol Biol*, 9, 8, 105.
- Durnam DM, Palmiter RD, 1987. Analysis of the detoxification of heavy metal ions by mouse metallothionein. *Experientia Suppl*, 52, 457-63.
- Ebisawa T, Karne S, Lerner MR, Reppert SM, 1994. Expression cloning of a high-affinity melatonin receptor from *Xenopus* dermal melanophores. *Proc Natl Acad Sci USA*, 21, 91(13), 6133-7.
- Ehsani S, Huo H, Salehzadeh A, Pocanschi CL, Watts JC, Wille H, Westaway D, Rogaeva E, St George-Hyslop PH, Schmitt-Ulms G, 2011. Family reunion—the ZIP/prion gene family. *Prog Neurobiol*, 93, 405–20.
- Ehsani S, Salehzadeh A, Huo H, Reginold W, Pocanschi CL, Ren H, Wang H, So K, Sato C, Mehrabian M, Strome R, Trimble WS, Hazrati LN, Rogaeva E, Westaway D, Carlson GA, Schmitt-Ulms G, 2012. LIV-1ZIPectodomainsheddinginprion-infectedmice resembles cellular response to transition metal starvation. *J Mol Biol*, 422, 556–74.
- Eide DJ, 2004. The SLC39 family of metal ion transporters. *Pflügers Arch*, 447, 796–800.
- Eide D, Broderius M, Fett J, Guerinet ML, 1996. A novel iron-regulated metal transporter from plants identified by functional expression in yeast. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 5624–8.
- Eng BH, Guerinet ML, Eide D, Saier MH, 1998. Jr. Sequence analyses and phylogenetic characterization of the ZIP family of metal ion transport proteins. *J Membr Biol*, 166, 1–7.
- Erickson JC, Hollopeter G, Thomas SA, Froelick GJ, Palmiter RD, 1997. Disruption of the metallothionein-III gene in mice: analysis of brain zinc, behavior, and neuron vulnerability to metals, aging, and seizures. *J Neurosci*, 15, 17(4), 1271-81.
- Erlich SS, Apuzzo ML, 1985. The pineal gland: anatomy, physiology, and clinical significance. *J Neurosurg*, 63, 3, 321-41.
- Erren TC, Reiter RJ, 2010. Axelrod, the pineal and the melatonin hypothesis: lessons of 50 years to shape chronodisruption research. *Neuro Endocrinol Lett*, 31, 585-7.
- Fabris N, Mocchegiani E, Provinciali M, 1997. Plasticity of neuroendocrine-thymus interactions during aging. *Exp Gerontol*, 32, 4-5, 415-29.
- Fabris N, Mocchegiani E, Muzzioli M, Provinciali M, 1991. The role of zinc in neuroendocrine-immune interactions during aging. *Ann N Y Acad Sci*, 621, 314-26.
- Fahrni CJ, 2007. Biological applications of X-ray fluorescence microscopy: exploring the subcellular topography and speciation of transition metals. *Curr Opin Chem Biol*, 11, 121–7.
- Faller P, 2010 Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): reactivity and structure of metal-thiolate clusters. *FEBS J*, 277, 2921-3290.
- Ferry G, Hecht S, Berger S, Moulharat N, Coge F, Guillaumet G, Leclerc V, Yous S, Delagrangé P, Boutin JA, 2010. Old and new inhibitors of quinone reductase 2. *Chem Biol Interact*, 30, 2, 103-9.
- Fischer TW, Kleszczyński K, Hardkop LH, Kruse N, Zillikens D, 2013. Melatonin enhances antioxidative enzyme gene expression (CAT, GPx, SOD), prevents their UVR-induced depletion, and protects against the formation of DNA damage (8-hydroxy-2'-deoxyguanosine) in ex vivo human skin. *J. Pineal Res*, 54, 3, 303–12.
- Fischer TW, Slominski A, Zmijewski MA, Reiter RJ, Paus R, 2008. Melatonin as a major skin protectant: from free radical scavenging to DNA damage repair. *Exp. Dermatol*, 17, 9, 713–30.
- Franklin PA, Pullen RGL, Hall GH, 1992. Blood-brain Exchange routes and distribution of 65 Zn in rat brain. *Neurochem Res*, 17, 767-71.

- Franz MC, Anderle P, Burzle M, Suzuki Y, Freeman MR, Hediger MA, Kovacs G, 2013. Zinc transporters in prostate cancer. *Mol Aspects Med*, 34, 735–41.
- Frederickson CJ, 1989. Neurobiology of zinc and zinc-containing neurons. *Int Rev Neurobiol*, 31, 145-238.
- Frederickson CJ, Danscher G, 1990. Zinc-containing neurons in hippocampus and related CNS structures. *Prog Brain Res*, 83, 71-84.
- Frederickson CJ, Koh JY, Bush AI, 2005. The neurobiology of zinc in health and disease. *Nat Rev Neurosci*, 6, 449–62.
- Frederickson CJ, Moncrieff DW, 1994. Zinc –containing neurons. *Biol Signals*, 3(3), 127-139.
- Frederickson CJ, Perez-Clausell J, Danscher G, 1987. Zinc-containing 7SNGF complex. Evidence from zinc histochemistry for localization in salivary secretory granules. *J Histochem Cytochem*, 35, 579–83.
- Frederickson CJ, Suh SW, Silva D, Frederickson CJ, Thompson RB, 2000. Importance of zinc in thral nervous syse centem: the zinc-containing neuron. *J Nutr*, 130, 5, 1471-83.
- Fujimoto S, Itsumura N, Tsuji T, Anan Y, Tsuji N, Ogra Y, Kimura T, Miyamae Y, Masuda S, Nagao M, Kambe T, 2013. Cooperative functions of ZnT1, metallothionein and ZnT4 in the cytoplasm rerequired for full activation of TNAP in the early secretory pathway. *PLoS One*, 8, 77445.
- Fujie T, Segawa Y, Uehara A, Nakamura T, Kimura T, Yoshida E, Yamamoto C, Uchiyama M, Naka H, Kaji T, 2016. Zinc diethyldithiocarbamate as an inducer of metallothionein in cultured vascular endothelial cells. *J Toxicol Sci*, 41(2), 217-24.
- Fujishiro H, Yano Y, Takada Y, Tanihara M, Himeno S, 2012. Roles of ZIP8, ZIP14, and DMT1in transport of cadmium and manganese in Mouse kidney proximal tubulecells. *Metallomics*, 4, 700–8.
- Fukada T, Civic N, Furuichi T, Shimoda S, Mishima K, Higashiyama H, Idaira Y, Asada Y, Kitamura H, Yamasaki S, Hojyo S, Nakayama M, Ohara O, Koseki H, Dos Santos HG, Bonafe L, Ha-Vinh R, Zankl A, Unger S, Kraenzlin ME, Beckmann JS, Saito I, Rivolta C, Ikegawa S, Superti-Furga A, Hirano T, 2008. The zinc transporter SLC39A13/ ZIP13 is required for connective tissue development; its involvement in BMP/TGFbeta signaling pathways. *PLoS One*, 3, 3642.
- Fukada T, Kambe T, 2011. Molecular and genetic features of zinc transporters in physiology and pathogenesis. *Metallomics*, 3, 662–74.
- Fukada T, Yamasaki S, Nishida K, Murakami M, Hirano T, 2011. Zinc homeostasis and signaling in health and diseases: zinc signaling. *J Biollnorg Chem*, 16, 1123–34.
- Fukunaka A, Kurokawa Y, Teranishi F, Sekler I, Oda K, Ackland ML, Faundez V, Hiromura M, Masuda S, Nagao M, Enomoto S, Kambe T, 2011. Tissue nonspecific alkaline phosphatase is activated via a two-step mechanism by zinc transport complexes in the early secretory pathway. *J Biol Chem*, 286, 16363–73.
- Fukunaka A, Suzuki T, Kurokawa Y, Yamazaki T, Fujiwara N, Ishihara K, Migaki H, Okumura K, Masuda S, Yamaguchi-Iwai Y, Nagao M, Kambe T, 2009. Demonstration and characterization of the heterodimerization of ZnT5 and ZnT6 in the early secretory pathway. *J Biol Chem*, 284, 30798–806.
- Gaggelli E, Kozlowski H, Valensin D, Valensin G, 2006. Copper homeostasis and neurodegenerative disorders (Alzheimer's, prion, and Parkinson's diseases and amyotrophic lateral sclerosis). *Chem Rev*, 106(6), 1995-2044.
- Gaither LA, Eide DJ, 2000. Functional expression of the human hZIP2 zinc transporter. *J Biol Chem*, 275, 5560–4.
- Gaither LA, Eide DJ, 2001. Eukaryotic zinc transporters and their regulation. *Biomaterials*, 14, 251–70.
- Gaither LA, Eide DJ, 2001. The human ZIP1 transporter mediates zinc uptake in human K562 erythroleukemia cells. *J Biol Chem*, 276, 22258–64.
- Galano A, Tan DX, Reiter RJ, 2011. Melatonin as a natural ally against oxidative stress: a physicochemical examination. *J Pineal Res*, 51, 1, 1-16.

- Galano A, Tan DX, Reiter RJ, 2013. On the free radical scavenging activities of melatonin's metabolites, AFMK and AMK. *J. Pineal Res*, 54, 3, 245–57.
- Gamsjaeger R, Liew CK, Loughlin FE, Crossley M, Mackay JP, 2007. Sticky fingers: zincfingers as protein-recognition motifs. *Trends Biochem Sci*, 32, 63–70.
- Gao J, Zhao N, Knutson MD, Enns CA, 2008. The hereditary hemochromatosis protein, HFE, inhibits iron uptake via down-regulation of Zip14 in HepG2 cells. *J Biol Chem*, 283, 21462–8.
- García JJ, López-Pingarrón L, Almeida-Souza P, Tres A, Escudero P, García-Gil FA, Tan DX, Reiter RJ, Ramírez JM, Bernal-Pérez M, 2014. Protective effects of melatonin in reducing oxidative stress and in preserving the fluidity of biological membranes: a review. *J. Pineal Res*, 56, 3, 225–37.
- García-Salcedo JA, Gijón P, Nolan DP, Tebabi P, Pays E, 2003. A chromosomal SIR2 homologue with both histone NAD-dependent ADP-ribosyltransferase and deacetylase activities is involved in DNA repair in *Trypanosoma brucei*. *EMBO J*, 22, 21, 5851–62.
- Gayle A, Chapman, John Kay, Peter Kille, 1999. Structural and functional analysis of the rat metallothionein III genomic locus. *Biochimica et Biophysica Acta*, 321–9.
- Ghafghazi T, McDaniel ML, Lacy PE, 1981. Zinc induced inhibition of insulin secretion from isolated rat islets of Langerhans. *Diabetes*, 30, 341–5.
- Ghosh SK, Kim P, Zhang XA, Yun SH, Moore A, Lippard SJ, Medarova Z, 2010. A novel imaging approach for early detection of prostate cancer based on endogenous zinc sensing. *Cancer Res*, 70, 6119–27.
- Girijashanker K, HeL, Soleimani M, Reed JM, LiH, Liu Z, Wang B, Dalton TP, Nebert DW, 2008. Slc39a14 gene encodes ZIP14, a metal/bicarbonate symporter: similarities to the ZIP8 transporter. *Mol Pharmacol*, 73, 1413–23.
- Gitto E, Romeo C, Reiter RJ et al, 2004. Melatonin reduces oxidative stress in surgical neonates. *J Pediatr Surg*, 39, 184–9.
- Giunta C, Elcioglu NH, Albrecht B, Eich G, Chambaz C, Janecke AR, Yeowell H, Weis M, Eyre DR, Kraenzlin M, Steinmann B, 2008. Spondylocheirodysplastic form of the Ehlers Danlos syndrome—an autosomal-recessive entity caused by mutations in the zinc transporter gene SLC39A13. *Am J Hum Genet*, 82, 1290–305.
- Golub MS, Keen CL, Gershwin ME, Hendrickx AG, 1995. Developmental zinc deficiency and behavior. *J Nutr*, 125, 8, 2263–71.
- Gómez-Moreno G, Guardia J, Ferrera MJ, Cutando A, Reiter RJ, 2010. Melatonin in diseases of the oral cavity. *Oral Dis*, 16, 3, 242–7.
- Guerinot ML, 2000. The ZIP family of metal transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1465, 190–8.
- Guo H, Jin X, Zhu T, Wang T, Tong P, Tian L, Peng Y, Sun L, Wan A, Chen J, Liu Y, Li Y, Tian Q, Xia L, Zhang L, Pan Y, Lu L, Liu Q, Shen L, Xiong W, Li J, Tang B, Feng Y, Zhang X, Zhang Z, Pan Q, Hu Z, Xia K, 2014. SLC39A5 mutations interfering with the BMP/TGF-beta pathway in non-syndromic high myopia. *J Med Genet*, 51, 518–25.
- Guo L, Lichten LA, Ryu MS, Liuzzi JP, Wang F, Cousins RJ, 2010. STAT5-glucocorticoid receptor interaction and MTF-1 regulate the expression of ZnT2 (Slc30a2) in pancreatic acinar cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 107, 2818–23.
- Guo XH, Li YH, Zhao YS, Zhai YZ, Zhang LC, 2017. Anti aging effects of melatonin on the myocardial mitochondria of rats and associated mechanisms. *Mol Med Rep*, 15(1), 403–10.
- Gupta S, Chai J, Cheng J, D'Mello R, Chance MR, Fu D, 2014. Visualizing the kinetic power stroke that drives proton-coupled zinc (ii) transport. *Nature*, 512, 101–4.
- Gustafson GT, 1967. Heavy metals in rat mast cell granules. *Lab Invest*, 17, 588–98.

- Gustin JL, Zanis MJ, Salt DE, 2011. Structure and evolution of the plant cation diffusion facilitator family of ion transporters. *BMC Evol Biol*, 11, 76.
- Gyorkey F, Min KW, Huff JA, Gyorkey P, 1967. Zinc and magnesium in human prostate gland: normal, hyperplastic, and neoplastic. *Cancer Res*, 27, 1348–53.
- Haase H, Maret W, 2003. Intracellular zinc fluctuations modulate protein tyrosine phosphatase activity in insulin/insulin-like growth factor-1 signaling. *ExpCellRes*, 291, 289–98.
- Haase H, Maret W, 2005. Protein tyrosine phosphatases as targets of the combined insulinomimetic effects of zinc and oxidants. *Biometals*, 18, 333–8.
- Haase H, Mocchegiani E, Rink L, 2006. Correlation between zinc status and immune function in the elderly. *Biogerontology*, 7, 421–8.
- Haase H, Ober-Blobaum JL, Engelhardt G, Hebel S, Heit A, Heine H, Rink L, 2008. Zinc signals are essential for lipopolysaccharide-induced signal transduction in monocytes. *J Immunol*, 181, 6491–2.
- Haase H, Rink L, 2009. Functional significance of zinc-related signaling pathways in immune cells. *Annu Rev Nutr*, 29, 133–52.
- Haase H, Rink L, 2014. Multiple impacts of zinc on immune function. *Metallomics*, 6, 1175–80.
- Hambidge M, 2000. Human zinc deficiency. *J Nutr*, 130, 1344–9.
- Hambidge M, Krebs NF, 2001. Interrelationships of key variables of human zinc homeostasis: relevance to dietary zinc requirements. *Annu Rev Nutr*, 21, 429–52.
- Hamer DH, 1986. Metallothionein. *Annual review of biochemistry*, 55, 913–51.
- Hansson A, 1996. Extracellular zinc ions induces mitogen-activated protein kinase activity and protein tyrosine phosphorylation in bombesin-sensitive Swiss 3T3 fibroblasts. *Arch Biochem Biophys*, 328, 233–8.
- Haq F, Mahoney M, Koropatnick J, 2003. Signaling events for metallothionein induction. *Mutat Res*, 10, 533(1-2), 211-26.
- Hardeland R, Cardinali DP, Srinivasan V, Spence DW, Brown GM, Pandi-Perumal SR, 2011. Melatonin—a pleiotropic, orchestrating regulator molecule. *Prog Neurobiol*, 93, 3, 350–84.
- Hardeland R, Madrid JA, Tan DX, Reiter RJ, 2012. Melatonin, the circadian multioscillator system and health: the need for detailed analyses of peripheral melatonin signaling. *J. Pineal Res*, 52, 2, 139–66.
- Hardeland R, Poeggeler B, 2003. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res*, 34, 4, 233–41.
- Harpsoe NG, Andersen LP, Gogenur I et al, 2015. Clinical pharmacokinetics of melatonin: a systematic review. *Eur J Clin Pharmacol*, 71, 901–9.
- Harrison NL, Gibbons SJ, 1994. Zn²⁺: an endogenous modulator of ligand- and voltage-gated ion channels. *Neuropharmacology*, 33, 8, 935–52.
- Hasler DW, Jensen LT, Zerbe O, Winge DR, Vasák M, 2000. Effect of the two conserved prolines of human growth inhibitory factor (metallothionein-3) on its biological activity and structure fluctuation: comparison with a mutant protein. *Biochemistry*, 28, 39(47), 14567–75.
- Haug FM, 1967. Electron microscopical localization of the zinc in hippocampal mossy fibre synapses by a modified sulfide silver procedure. *Histochemie*, 8, 355–68.
- Hernández-Plata E, Quiroz-Compeán F, Ramírez-García G, Barrientos EY, Rodríguez-Morales NM, Flores A, Wrobel K, Wrobel K, Méndez I, Díaz-Muñoz M, Robles J, Martínez-Alfaro M, 2015. Melatonin reduces lead levels in blood, brain and bone and increases lead excretion in rats subjected to subacute lead treatment. *Toxicol Lett*, 233(2), 78–83.
- Hershey CO, Hershey LA, Varnes A, Vibhakar SD, Lavin P, Strain WH, 1983. Cerebrospinal fluid trace element content in dementia: clinical, radiologic, and pathologic correlations. *Neurology*, 33, 10, 1350–3.
- Hickman AB, Klein DC, Dyda F, 1999. Melatonin biosynthesis: the structure of serotonin N-Acetyltransferase at 2.5 Å resolution suggests a catalytic mechanism. *Mol Cell*, 3, 23–32.

- Hidalgo J, Aschner M, Zatta P, Vasák M, 2001. Roles of the metallothionein family of proteins in the central nervous system. *Brain Res Bull*, 15, 55(2), 133–45.
- Higuchi T, Hattori M, Tanaka Y, Ishitani R, Nureki O, 2009. Crystal structure of the cytosolic domain of the cation diffusion facilitator family protein. *Proteins*, 76, 768–71.
- Hirano T, Murakami M, Fukada T, Nishida K, Yamasaki S, Suzuki T, 2008. Roles of zinc and zinc signaling in immunity: zinc as an intracellular signaling molecule. *Adv Immunol*, 97, 149–76.
- Hirsch-Rodriguez E, Imbesi M, Manev R, Uz T, Manev H, 2007. The pattern of melatonin receptor expression in the brain may influence antidepressant treatment. *Medical Hypotheses*, 69, 1, 120–4.
- Hirzel K, Muller U, Latal AT, Hulsmann S, Grudzinska J, Seeliger MW, Betz H, Laube B, 2006. Hyper ekplexia phenotype of glycine receptor alpha1 subunit mutant mice identifies Zn²⁺ as an essential endogenous modulator of glycinergic neurotransmission. *Neuron*, 52, 679–90.
- Hoch E, Lin W, Chai J, Hershfinkel M, Fu D, Sekler I, 2012. Histidine pairing at the metal transport site of mammalian ZnT transporters controls Zn²⁺ over Cd²⁺ selectivity. *Proc Natl Acad Sci USA*, 109, 7202–7.
- Hogstrand C, Kille P, Ackland ML, Hiscox S, Taylor KM, 2013. A mechanism for epithelial mesenchymal transition and anoikis resistance in breast cancer triggered by zinc channel ZIP6 and STAT3 (signal transducer and activator of transcription3). *Biochem J*, 455, 229–37.
- Hojyo S, Fukada T, Shimoda S, Ohashi W, Bin BH, Koseki H, Hirano T, 2011. The zinc transporter SLC39A14/ZIP14 controls G-protein coupled receptor-mediated signaling required for systemic growth. *PLoS One*, 6, 18059.
- Homma K, Fujisawa T, Tsuburaya N, Yamaguchi N, Kadowaki H, Takeda K, Nishitoh H, Matsuzawa A, Naguro I, Ichijo H, 2013. SOD1 as a molecular switch for initiating the homeostatic ER stress response under zinc deficiency. *Mol Cell*, 52, 75–86.
- Hood MI, Skaar EP, 2012. Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nat Rev Microbiol*, 10, 525–37.
- Howells C, West AK, Chung RS, 2010. Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): evaluation of the biological function of growth-inhibitory factor in the injured and neurodegenerative brain. *FEBS J*, 277, 14, 2931–9.
- Hozumi I, Hasegawa T, Honda A, Ozawa K, Hayashi Y, Hashimoto K, Yamada M, Koumura A, Sakurai T, Kimura A, Tanaka Y, Satoh M, Inuzuka T, 2011. Patterns of levels of biological metals in CSF differ among neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci*, 303, 95–9.
- Hozumi I, Suzuki JS, Kanazawa H, Hara A, Saio M, Inuzuka T, Miyairi S, Naganuma A, Tohyama C, 2008. Metallothionein-3 is expressed in the brain and various peripheral organs of the rat. *Neurosci Lett*, 13, 438(1), 54–8.
- Huang EP, 1997. Metal ions and synaptic transmission: think zinc. *Proc Natl Acad Sci USA*, 9, 94(25), 13386–7.
- Huang L, Kirschke CP, 2007. Adileucine sorting Signal in ZIP1 (SLC39A1) mediates endocytosis of the protein. *FEBS J*, 274, 3986–97.
- Huang L, Kirschke CP, Lay YA, Levy LB, Lamirande DE, Zhang PH, 2012. Znt7-null mice are more susceptible to diet-induced glucose intolerance and insulin resistance. *J Biol Chem*, 287, 33883–96.
- Huang L, Tepaamorndech S, 2013. The SLC30 family of zinc transporters: a review of current understanding of their biological and pathophysiological roles. *Mol Aspects Med*, 34, 548–60.
- Huang ZX, 2010. Neuronal growth-inhibitory factor (metallothionein-3): a unique metalloprotein. *FEBS J*, 277, 14, 2911.
- Huber KL, Hardy JA, 2012. Mechanism of zinc-mediated inhibition of caspase-9. *Protein Sci*, 21, 1056–65.
- Hurtuk A, Dome C, Holloman CH, Wolfe K, Welling DB, Dodson EE, Jacob A, 2011. Melatonin: can it stop the ringing? *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 120, 7, 433–40.

- Inoue Y, Hasegawa S, Ban S, Yamada T, Date Y, Mizutani H, Nakata S, Tanaka M, Hirashima N, 2014. ZIP2 protein, a zinc transporter, is associated with keratinocyte differentiation. *J Biol Chem*, 289, 21451–62.
- Iriti M, Varoni EM, Vitalini S, 2010. Melatonin in traditional Mediterranean diets. *J Pineal Res*, 49, 2, 101-5.
- Islam MS, Loots du T, 2007. Diabetes, metallothionein, and zinc interactions: a review. *Biofactors*, 29(4), 203-12.
- Itsumura N, Inamo Y, Okazaki F, Teranishi F, Narita H, Kambe T, Kodama H, 2013. Compound heterozygous mutations in SLC30A2/ZnT2 results in low milk zinc concentrations: a novel mechanism for zinc deficiency in a breast-fed infant. *PLoS One*, 8, 64045.
- Jakubowski J, Kornfeld K, 1999. A local, high-density, single-nucleotide polymorphism map used to clone *Caenorhabditis elegans* cdf-1. *Genetics*, 153, 743–52.
- Jan JE, Reiter RJ, Wong PK, Bax MC, Ribary U, Wasdell MB, 2011. Melatonin has membrane receptor-independent hypnotic action on neurons: an hypothesis. *J Pineal Res*, 50, 3, 233-40.
- Janjetovic Z, Nahmias ZP, Hanna S, Jarrett SG, Kim TK, Reiter RJ, Slominski AT, 2014. Melatonin and its metabolites ameliorate ultraviolet B-induced damage in human epidermal keratinocytes. *J Pineal Res*, 57, 1, 90–102.
- Jenkitkasemwong S, Wang CY, Mackenzie B, Knutson MD, 2012. Physiologic implications of metal-ion transport by ZIP14 and ZIP8. *Biometals*, 25, 643–55.
- Jeong J, Eide DJ, 2013. The SLC39 family of zinc transporters. *Mol Aspects Med*, 34, 612–19.
- Jirakulaporn T, Muslin AJ, 2004. Cation diffusion facilitator proteins modulate Raf-1 activity. *J Biol Chem*, 279, 27807–815.
- Johnson S, 2001. Micronutrient accumulation and depletion in schizophrenia, epilepsy, autism and Parkinson's disease? *Med Hypotheses*, 56(5), 641-5.
- Jung-Hynes B, Reiter RJ, Ahmad N, 2010. Sirtuins, melatonin and circadian rhythms: building a bridge between aging and cancer. *J Pineal Res*, 48, 1, 9-19.
- Kagi JH, 1991. Overview of metallothionein. *Methods Enzymol*, 205, 613-26.
- Kagi JHR, Kojima Y, 1987. *Metallothionein II*, Birkhauser Verlag, Basel.
- Kaina B, Lohrer H, Karin M, Herrlich P, 1990. Overexpressed human metallothionein IIA gene protects Chinese hamster ovary cells from killing by alkylating agents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 7, 2710-4.
- Kambe T, 2012. Molecular architecture and function of ZnT transporters. *Curr Top Membr*, 69, 199–220.
- Kambe T, 2013. Regulation of zinc transport. In: *Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry-Metals in Cells*, edited by Culotta V, Scott RA. Chichester: Wiley, 301–9.
- Kambe T, Andrews GK, 2009. Novel proteolytic processing of the ectodomain of the zinc transporter ZIP4 (SLC39A4) during zinc deficiency is inhibited by acrodermatitis enteropathica mutations. *Mol Cell Biol*, 29, 129–39.
- Kambe T, Geiser J, Lahner B, Salt DE, Andrews GK, 2008. Slc39a1 to 3 (subfamily II) Zip genes in mice have unique cell-specific functions during adaptation to zinc deficiency. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 294, 1474–81.
- Kambe T, Hashimoto A, Fujimoto S, 2014. Current understanding of ZIP and ZnT zinc transporters in human health and diseases. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 71, 17, 3281-95.
- Kambe T, Narita H, Yamaguchi-Iwai Y, Hirose J, Amano T, Sugiura N, Sasaki R, Mori K, Iwanaga T, Nagao M, 2002. Cloning and characterization of a novel mammalian zinc transporter, zinc transporter 5, abundantly expressed in pancreatic beta cells. *J Biol Chem*, 277, 19049–55.
- Kambe T, Suzuki T, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, 2006. Sequence similarity and functional relationship among eukaryotic ZIP and CDF transporters. *Genomics Proteomics Bioinformatics*, 4, 1–9.

- Kamizono A, Nishizawa M, Teranishi Y, Murata K, Kimura A, 1989. Identification of a gene conferring resistance to zinc and cadmium ions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 219, 161–7.
- Kaneko M, Noguchi T, Ikegami S, Sakurai T, Kakita A, Toyoshima Y, Kambe T, Yamada M, Inden M, Hara H, Oyanagi K, Inuzuka T, Takahashi H, Hozumi I, 2015. Zinc transporters ZnT3 and ZnT6 are downregulated in the spinal cords of patients with sporadic amyotrophic lateral sclerosis. *J Neurosci Res*, 93, 370–9.
- Kang YJ, 2006. Metallothionein redox cycle and function. *Experimental biology and medicine* (Maywood, N.J.), 231, 9, 1459–67.
- Kang YJ, 2007. Antioxidant defense against anthracycline cardiotoxicity by metallothionein. *Cardiovasc Toxicol*, 7, 2, 95–100.
- Kanethi P, Qiao X, Diaz ME, Peden AA, Meyer GE, Carskadon SL, Kapfhamer D, Sufalko D, Robinson MS, Noebels JL, Burmeister M, 1998. Mutation in AP-3 delta in the mocha mouse links endosomal transport to storage deficiency in platelets, melanosomes, and synaptic vesicles. *Neuron*, 21, 111–22.
- Kappers JA, 1976. The mammalian pineal gland, a survey. *Acta Neurochir (Wien)*, 34, 1–4, 109–49.
- Karabulut-Bulan O, Bayrak BB, Arda-Pirincci P, Sarikaya-Unal G, Us H, Yanardag R, 2015. Role of Exogenous Melatonin on Cell Proliferation and Oxidant/Antioxidant System in Aluminum-Induced Renal Toxicity. *Biol Trace Elem Res*, 168(1), 141–9.
- Karbownik M, Tan D, Manchester LC, Reiter RJ, 2000. Renal toxicity of the carcinogen delta-aminolevulinic acid: antioxidant effects of melatonin. *Cancer Lett*, 161, 1, 1–7.
- Karolczak M, Korf HW, Stehle JH, 2005. The rhythm and blues of gene expression in the rodent pineal gland. *Endocrine*, 27, 2, 89–100.
- Kasarskis EJ, 1984. Zinc metabolism in normal and zinc-deficient rat brain. *Exp Neurol*, 85, 1, 114–27.
- Kawachi M, Kobae Y, Kogawa S, Mimura T, Kramer U, Maeshima M, 2012. Amino acid screening based on structural modeling identifies critical residues for the function, ion selectivity and structure of Arabidopsis MTP1. *FEBS J*, 279, 2339–56.
- Kawachi M, Kobae Y, Mimura T, Maeshima M, 2008. Deletion of a histidine-rich loop of AtMTP1, a vacuolar Zn²⁺/H⁺ antiporter of Arabidopsis thaliana, stimulates the transport activity. *J Biol Chem*, 283, 8374–83.
- Kawamura T, Ogawa Y, Nakamura Y, Nakamizo S, Ohta Y, Nakano H, Kabashima K, Katayama I, Koizumi S, Kodama T, Nakao A, Shimada S, 2012. Severe dermatitis with loss of epidermal Langerhans cells in human and mouse zinc deficiency. *J Clin Invest*, 122, 722–32.
- Keilin D, Mann T, 1939. Carbonic anhydrase. *Nature*, 144, 442–3.
- Kelleher SL, Lonnerdal B, 2003. Zn transporter levels and localization change throughout lactation in rat mammary gland and are regulated by Zn in mammary cells. *J Nutr*, 133, 3378–85.
- Kelleher SL, McCormick NH, Velasquez V, Lopez V, 2011. Zinc in specialized secretory tissues: roles in the pancreas, prostate, and mammary gland. *Adv Nutr*, 2, 101–11.
- Kelly EJ, Sandgren EP, Brinster RL, Palmiter RD, 1997. A pair of adjacent glucocorticoid response elements regulate expression of two mouse metallothionein genes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(19), 10045–50.
- Kim CH, Kim JH, Lee J, Ahn YS, 2003. Zinc-induced NF-kappaB inhibition can be modulated by changes in the intracellular metallothionein level. *Toxicology and applied pharmacology*, 190, 2, 189–96.
- Kimura T, Kambe T, 2016. The Functions of Metallothionein and ZIP and ZnT Transporters: An Overview and Perspective. *Int J Mol Sci*, 17(3), 336.
- King JC, Shames DM, Woodhouse LR, 2000. Zinc homeostasis in humans. *J Nutr*, 130, 1360–6.

- Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, Yamashita S, Kaisho T, Akira S, Murakami M, Hirano T, 2006. Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat Immunol*, 7, 971–7.
- Klassen RB, Crenshaw K, Kozyraki R, Verroust PJ, Tio L, Atrian S, Allen PL, Hammond TG, 2004. Megalin mediates renal uptake of heavy metal metallothionein complexes. *Am J Physiol Renal Physiol*, 287, 3, 393-403.
- Klein DC, 2007. Arylalkylamine N-acetyltransferase: "the Timezyme". *J Biol Chem*, 282, 7, 4233-7.
- Kleszczynski K, Fischer TW, 2012. Melatonin and human skin aging. *Dermatoendocrinol*, 4, 3, 245–52.
- Klug A, 2010. The discovery of zinc fingers and their applications in gene regulation and genome manipulation. *Annu Rev Biochem*, 79, 213-31.
- Kobayashi S, Hirota Y, Sayato-Suzuki J, Takehana M, Nishimura H, Nishimura N, Tohyama C, 1994. Possible role of metallothionein in the cellular defense mechanism against UVB irradiation in neonatal human skin fibroblasts. *Photobiol*, 59, 6, 650-6.
- Koh JY, Suh SW, Gwag BJ, He YY, Hsu CY, Choi DW, 1996. The role of zinc in selective neuronal death after transient global cerebral ischemia. *Science*, 272, 1013–16.
- Korkmaz A, Topal T, Tan DX, Reiter RJ, 2009. Role of melatonin in metabolic regulation. *Rev Endocr Metab Disord*, 10, 4, 261-70.
- Koyama H, Nakade O, Takada Y, Kaku T, Lau KH, 2002. Melatonin at pharmacologic doses increases bone mass by suppressing resorption through down-regulation of the RANKL-mediated osteoclast formation and activation. *J Bone Miner Res*, 17, 7, 1219-29.
- Krebs NF, 2013. Update on zinc deficiency and excess in clinical pediatric practice. *Ann Nutr Metab*, 62, 1, 19–29.
- Krezel A, Maret W, 2006. Zinc-buffering capacity of a eukaryotic cell at physiological Zn. *J Biol Inorg Chem*, 11, 1049–62.
- Krezel A, Maret W, 2007. Dual nanomolar and picomolar Zn(II) binding properties of metallothionein. *Journal of the American Chemical Society*, 129, 35, 10911-21.
- Krishna SS, Majumdar I, Grishin NV, 2003. Structural classification of zinc fingers: survey and summary. *Nucleic Acids Res*, 31, 532–50.
- Kristiansen LH, Rungby J, Sondergaard LG, Stoltenberg M, Danscher G, 2001. Autometallography allows ultrastructural monitoring of zinc in the endocrine pancreas. *Histochem Cell Biol*, 115, 125–9.
- Krizkova S, Ryvolova M, Hrabeta J, Adam V, Stiborova M, Eckschlagner T, Kizek R, 2012. Metallothioneins and zinc in cancer diagnosis and therapy. *Drug Metab Rev*, 44, 4, 287-301.
- Kuszack J, Rodin MA, 1977. New technique of pinealectomy for adult rats. *Pro Experimentis* 32, 283-4.
- Kuş İ, Sarsılmaz M, 2002. Pineal Bezin Morfolojik Yapısı ve Fonksiyonları. *T Klin Tıp Bilimleri*, 22, 221-6.
- Kvetnoy I, 2002. Extrapineal melatonin in pathology: new perspectives for diagnosis, prognosis and treatment of illness. *Neuro Endocrinol Lett*, 23, 1, 92-6.
- Laity JH, Andrews GK, 2007. Understanding the mechanisms of zinc-sensing by metalresponse element binding transcription factor-1 (MTF-1). *Arch Biochem Biophys*, 463, 201–10.
- Laity JH, Lee BM, Wright PE, 2001. Zinc finger proteins: new insights into structural and functional diversity. *Curr Opin Struct Biol*, 11, 39–46.
- Lang U, Aubert ML, Conne BS, Bradtke JC, Sizonenko PC, 1983. Influence of exogenous melatonin on melatonin secretion and the neuroendocrine reproductive axis of intact male rats during sexual maturation. *Endocrinology*, 112, 5, 1578-84.

- Langmade SJ, Ravindra R, Daniels PJ, Andrews GK, 2000. The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene. *J Biol Chem*, 275, 34803–9.
- Lasry I, Golan Y, Berman B, Amram N, Glaser F, Assaraf YG, 2014. In situ dimerization of multiple wildtype and mutant zinc transporters in live cells using bimolecular fluorescence complementation. *J Biol Chem*, 289, 7275–92.
- Lasry I, Seo YA, Ityel H, Shalva N, Pode-Shakked B, Glaser F, Berman B, Berezovsky I, Goncarenko A, Klar A, Levy J, Anikster Y, Kelleher SL, Assaraf YG, 2012. A dominant negative heterozygous G87R mutation in the zinc transporter, ZnT-2 (SLC30A2), results in transient neonatal zinc deficiency. *J Biol Chem*, 287, 29348–61.
- Lee JY, Cole TB, Palmiter RD, Suh SW, Koh JY, 2002. Contribution by synaptic zinc to the gender-disparate plaque formation in human Swedish mutant APP transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99, 7705–10.
- Lee JY, Kim JS, Byun HR, Palmiter RD, Koh JY, 2011. Dependence of the histofluorescently reactive zinc pool on zinc transporter-3 in the normal brain. *Brain Res*, 1418, 12–22.
- Lee PP, Pang SF, 1992. Identification and characterization of melatonin binding sites in the gastrointestinal tract of ducks. *Life Sci*, 50(2), 117–25.
- Lee PP, Pang SF, 1993. Melatonin and its receptors in the gastrointestinal tract. *Biol Signals*, 2(4), 181–93.
- Leja-Szpak A, Jaworek J, Pierzchalski P, Reiter RJ, 2010. Melatonin induces pro-apoptotic signaling pathway in human pancreatic carcinoma cells (PANC-1). *J Pineal Res*, 49, 3, 248–55.
- León J, Acuña-Castroviejo D, Escames G, Tan DX, Reiter RJ, 2005. Melatonin mitigates mitochondrial malfunction. *J. Pineal Res*, 38, 1, 1–9.
- Lerner AB, Case JD, Takahashi Y, Lee TH, Mori W, 1958. Isolation of melatonin the pineal gland factor lightens melanocytes. *J Am Chem*, 80, 2587.
- Liang X, Dempsey RE, Burdette SC, 2016. Zn²⁺ at a cellular crossroads. *Curr Opin Chem Biol*, 31, 120–5.
- Lichten LA, Cousins RJ, 2009. Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annu Rev Nutr*, 29, 153–76.
- Lichten LA, Ryu MS, Guo L, Embury J, Cousins RJ, 2011. MTF-1-mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction. *PLoS One*, 6, 21526.
- Lim HD, Kim YS, Ko SH, Yoon IJ, Cho SG, Chun YH, Choi BJ, Kim EC, 2012. Cytoprotective and anti-inflammatory effects of melatonin in hydrogen peroxide-stimulated CHON-001 human chondrocyte cell line and rabbit model of osteoarthritis via the SIRT1 pathway. *J. Pineal Res*, 53, 3, 225–37.
- Lin H, Burton D, Li L, Warner DE, Phillips JD, Ward DM, Kaplan J, 2009. Gain-of-function mutations identify amino acids within transmembrane domains of the yeast vacuolar transporter Zrc1 that determine metal specificity. *Biochem J*, 422, 273–83.
- Lin W, Chai J, Love J, Fu D, 2010. Selective electrodiffusion of zinc ions in a Zrt-, Irt-like protein, ZIPB. *J Biol Chem*, 285, 39013–20.
- Liu Z, Li H, Soleimani M, Girijashanker K, Reed JM, He L, Dalton TP, Nebert DW, 2008. Cd²⁺ versus Zn²⁺ uptake by the ZIP8 HCO₃⁻ dependent symporter: kinetics, electrogenicity and trafficking. *Biochem Biophys Res Commun*, 365, 814–20.
- Liuzzi JP, Aydemir F, Nam H, Knutson MD, Cousins RJ, 2006. Zip14 (Slc39a14) mediates non-transferrin-bound iron uptake into cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 13612–17.
- Liuzzi JP, Bobo JA, Lichten LA, Samuelson DA, Cousins RJ, 2004. Responsive transporter genes within the murine intestinal-pancreatic axis form a basis of zinc homeostasis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 14355–60.
- Liuzzi JP, Cousins RJ, 2004. Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr*, 24, 151–72.
- Lonnerdal B, 2007. Trace element transport in the mammary gland. *Annu Rev Nutr*, 27, 165–77.

- Lovenberg W, Jequier E, Sjoerdsma A, 1967. Tryptophan hydroxylation: measurement in pineal gland, brainstem, and carcinoid tumor. *Science*, 13, 155, 3759, 217-9.
- Lovenberg W, Weissbach H, Udenfriend S, 1962. Aromatic L-amino acid decarboxylase. *J Biol Chem*, 237, 89-93.
- Lowes DA, Alkawash AM, Webster NR, Reid VL, Galley HF, 2011. Melatonin and structurally similar compounds have differing effects on inflammation and mitochondrial function in endothelial cells under conditions mimicking sepsis. *Br. J. Anaesth*, 107, 2, 193-201.
- Lu M, Fu D, 2007. Structure of the zinc transporter YiiP. *Science*, 317, 1746-8.
- Lu M, Chai J, Fu D, 2009. Structural basis for autoregulation of the zinc transporter YiiP. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 1063-7.
- Mack JM, Schamne MG, Sampaio TB, Pêtille RA, Fernandes PA, Markus RP, Prediger RD, 2016. Melatonergic System in Parkinson's Disease: From Neuroprotection to the Management of Motor and Nonmotor Symptoms. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 3472032.
- Malhotra S, Sawhney G, Pandhi P, 2004. The therapeutic potential of melatonin: a review of the science. *MedGenMed*, 6(2), 46.
- Manchester LC, Poeggeler B, Alvares FL, Ogden GB, Reiter RJ, 1995. Melatonin immunoreactivity in the photosynthetic prokaryote *Rhodospirillum rubrum*: implications for an ancient antioxidant system. *Cell. Mol. Biol. Res*, 41, 5, 391-5.
- Manning DL, Daly RJ, Lord PG, Kelly KF, Green CD, 1988. Effects of oestrogen on the expression of a 4.4 kb mRNA in the ZR-75-1 human breast cancer cell line. *Mol Cell Endocrinol*, 59, 205-12.
- Manso Y, Adlard PA, Carrasco J, Vasak M, Hidalgo J, 2011. Metallothionein and brain inflammation. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 16, 7, 1103-13.
- Mao X, Kim BE, Wang F, Eide DJ, Petris MJ, 2007. A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity. *J Biol Chem*, 282, 6992-7000.
- Maret W, 2004. Zinc and sulfur: a critical biological partnership. *Biochemistry*, 43, 3301-9.
- Maret W, 2011. Metals on the move: zinc ions in cellular regulation and in the coordination dynamics of zinc proteins. *Biometals*, 24, 411-8.
- Maret W, 2013. Zinc biochemistry: from a single zinc enzyme to a key element of life. *Adv Nutr*, 4, 82-91.
- Maret W, Jacob C, Vallee BL, Fischer EH, 1999. Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 1936-40.
- Maret W, Sandstead HH, 2006. Zinc requirements and the risks and benefits of zinc supplementation. *J Trace Elem Med Biol*, 20, 3-18.
- Marger L, Schubert CR, Bertrand D, 2014. Zinc: an under appreciated modulatory factor of brain function. *Biochem Pharmacol*, 91(4), 426-35.
- Markesbery WR, Ehmann WD, Alauddin M, Hossain TI, 1984. Brain trace element concentrations in aging. *Neurobiol Aging*, 5, 1, 19-28.
- Martel G, Hevi C, Friebely O, Baybutt T, Shumyatsky GP, 2010. Zinc transporter 3 is involved in learned fear and extinction, but not in innate fear. *LearnMem*, 17, 582-90.
- Martín M, Macías M, Escames G, León J, Acuña-Castroviejo D, 2000. Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress. *FASEB J*, 14, 12, 1677-9.
- Marvin RG, Wolford JL, Kidd MJ, Murphy S, Ward J, Que EL, Mayer ML, Penner-Hahn JE, Haldar K, O'Halloran TV, 2012. Fluxes of "free" and total zinc are essential for progression of intraerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum*. *Chem Biol*, 19, 731-41.

- Masana MI, Doolen S, Ersahin C, Al-Ghoul WM, Duckles SP, Dubocovich ML, Krause DN, 2002. MT (2) melatonin receptors are present and functional in rat caudal artery. *J Pharmacol Exp Ther*, 302, 3, 1295-302.
- Masters BA, Quaife CJ, Erickson JC, Kelly EJ, Froelick GJ, Zambrowicz BP, Brinster RL, Palmiter RD, 1994. Metallothionein III is expressed in neurons that sequester zinc in synaptic vesicles. *J Neurosci*, 10, 5844-57.
- Mauriz JL, Collado PS, Veneroso C, Reiter RJ., González-Gallego J, 2013. A review of the molecular aspects of melatonin's anti-inflammatory actions: recent insights and new perspectives. *J. Pineal Res*, 54, 1, 1-14.
- Maverakis E, Fung MA, Lynch PJ, Draznin M, Michael DJ, Ruben B, Fazel N, 2007. Acrodermatitis enteropathica and an overview of zinc metabolism. *J Am Acad Dermatol*, 56, 116-24.
- Mawson CA, Fischer MI, 1951. Zinc content of the genital organs of the rat. *Nature*, 167, 859.
- Maze P, 1914. Influences respectives des elements de la solution mineral dumais. *Annales de l'Institut Pasteur*, 28, 21-69.
- McAllister BB, Dyck RH, 2017. Zinc transporter 3 (ZnT3) and vesicular zinc in central nervous system function. *Neurosci Biobehav Rev*, 80, 329-50.
- McCranor BJ, Bozym RA, Vitolo MI, Fierke CA, Bambrick L, Polster BM, Fiskum G, Thompson RB, 2012. Quantitative imaging of mitochondrial and cytosolic free zinc levels in an in vitro model of ischemia/reperfusion. *J Bioenerg Biomembr*, 44, 253-63.
- McMahon RJ, Cousins RJ, 1998. Regulation of the zinc transporter ZnT-1 by dietary zinc. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 28, 95(9), 4841-6.
- Menendez-Pelaez A, Reiter RJ, 1993. Distribution of melatonin in mammalian tissues: the relative importance of nuclear versus cytosolic localization. *J. Pineal Res*, 15, 2, 59-69.
- Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, Rodilla V, 2000. Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 35, 1, 35-70.
- Miletta MC, Bieri A, Kernland K, Schoni MH, Petkovic V, Fluck CE, Eble A, Mullis PE, 2013. Transient neonatal zinc deficiency caused by a heterozygous G87R mutation in the zinc transporter ZnT-2 (SLC30A2) gene in the mother highlighting the importance of Zn2 for normal growth and development. *Int J Endocrinol*, 259189.
- Miller J, McLachlan AD, Klug A, 1985. Repetitive zinc-binding domains in the protein transcription factor IIIA from *Xenopus* oocytes. *EMBO J*, 4, 1609-14.
- Milnerowicz H, Bizoń A, 2010. Determination of metallothionein in biological fluids using enzyme-linked immunoassay with commercial antibody. *Acta Biochim Pol*, 57, 1, 99-104.
- Milnerowicz H, Jabłonowska M, Bizoń A, 2009. Change of zinc, copper, and metallothionein concentrations and the copper-zinc superoxide dismutase activity in patients with pancreatitis. *Pancreas*, 38, 6, 681-8.
- Miroddi M, Bruno R, Galletti F, Calapai F, Navarra M, Gangemi S, Calapai G, 2015. Clinical pharmacology of melatonin in the treatment of tinnitus: a review. *Eur J Clin Pharmacol*, 71, 3, 263-70.
- Miyai T, Hojyo S, Ikawa T, Kawamura M, Irie T, Ogura H, Hijikata A, Bin BH, Yasuda T, Kitamura H, Nakayama M, Ohara O, Yoshida H, Koseki H, Mishima K, Fukada T, 2014. Zinc transporter SLC39A10/ZIP10 facilitates antiapoptotic signaling during early B cell development. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111, 11780-5.
- Mocchegiani E, Bulian D, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Lesnikov V, Pierpaoli W, Fabris N, 1996. The zinc pool is involved in the immune-reconstituting effect of melatonin in pinealectomized mice. *J Pharmacol Exp Ther*, 277, 3, 1200-8.
- Mocchegiani E, Bulian D, Santarelli L, Tibaldi A, Muzzioli M, Pierpaoli W, Fabris N, 1994. The immuno-reconstituting effect of melatonin or pineal grafting and its relation to zinc pool in aging mice. *J Neuroimmunol*, 53(2), 189-201.

- Mocchegiani E, Malavolta M, Costarelli L, Giacconi R, Cipriano C, Piacenza F, Tesi S, Basso A, Pierpaoli S, Lattanzio F, 2010. Zinc, metallothioneins and immunosenescence. *Proc Nutr Soc*, 69(3), 290-9.
- Montanini B, Blaudez D, Jeandroz S, Sanders D, Chalot M, 2007. Phylogenetic and functional analysis of the Cation Diffusion Facilitator (CDF) family: improved signature and prediction of substrate specificity. *BMC Genomics*, 8, 107.
- Moynahan EJ, 1974. Letter: Acrodermatitis enteropathica: a lethal inherited human zinc deficiency disorder. *Lancet*, 2, 399-400.
- Mozaffari S, Rahimi R, Abdollahi M, 2010. Implications of melatonin therapy in irritable bowel syndrome: a systematic review. *Curr Pharm Des*, 16, 33, 3646-55.
- Muller A, Geyer G, 1969. [Submicroscopic heavy metal localization in the prosecretory cells of the Paneth cells of the mouse]. *Gegenbaurs Morphol Jahrb*, 113, 70-7.
- Murakami M, Hirano T, 2008. Intracellular zinc homeostasis and zinc signaling. *Cancer Sci*, 99, 1515-22.
- Naidu PS, Singh A, Kaur P, Sandhir R, Kulkarni SK, 2003. Possible mechanism of action in melatonin attenuation of haloperidol-induced orofacial dyskinesia. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*, 74(3), 641-8.
- Nair NP, Hariharasubramanian N, Pilapil C, Isaac I, Thavundayil JX, 1986. Plasma melatonin – an index of brain aging in humans? *Biol. Psychiatry*, 21, 2, 141-50.
- Nakashima AS, Butt RH, Dyck RH, 2011. Alterations in protein and gene expression within the barrel cortex of ZnT3 knock out mice: experience-independent and -dependent changes. *Neurochem Int*, 59, 860-70.
- Nava M, Romero F, Quiroz Y, Parra G, Bonet L, Rodríguez-Iturbe B, 2000. Melatonin attenuates acute renal failure and oxidative stress induced by mercuric chloride in rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 279, 5, 910-8.
- Ni H, Sun Q, Tian T, Feng X, Sun BL, 2015. Long-term expression of metabolism-associated genes in the rat hippocampus following recurrent neonatal seizures and its regulation by melatonin. *Mol Med Rep*, 12(2), 2727-34.
- Nie L, Wei G, Peng S, Qu Z, Yang Y, Yang Q, Huang X, Liu J, Zhuang Z, Yang X, 2017. Melatonin ameliorates anxiety and depression-like behaviors and modulates proteomic changes in triple transgenic mice of Alzheimer's disease. *Biofactors*, 8, 43(4), 593-611.
- Nies DH, CzcRandCzc D, 1992. Gene product affecting regulation of resistance to cobalt, zinc, and cadmium (czc system) in *Alcaligenes eutrophus*. *J Bacteriol*, 174, 8102-110.
- Nir I, 2003. Melatonin for the treatment of disorders in circadian rhythm and sleep: could it form a basis for medication? *Receptors Channels*, 9, 379-85.
- Noh H, Paik HY, Kim J, Chung J, 2014. The changes of zinc transporter ZnT gene expression in response to zinc supplementation in obese women. *Biological trace element research*, 162, 1-3, 38-45.
- Nordberg M, 1998. Metallothioneins: historical review and state of knowledge. *Talanta*, 46, 2, 243-54.
- Nosjean O, Ferro M, Coge F, Beauverger P, Henlin JM, Lefoulon F, Fauchere JL, Delagrè P, Canet E, Boutin JA, 2000. Identification of the melatonin-binding site MT3 as the quinone reductase 2. *J Biol Chem*, 275(40), 31311-7.
- Nosjean O, Nicolas JP, Klupsch F, Delagrè P, Canet E, Boutin JA, 2001. Comparative pharmacological studies of melatonin receptors: MT1, MT2 and MT3/QR2. Tissue distribution of MT3/QR2. *Biochem Pharmacol*, 1, 61(11), 1369-79.
- Nozaki C, Vergnano AM, Filliol D, Ouagazzal AM, Le Goff A, Carvalho S, Reiss D, Gaveriaux-Ruff C, Neyton J, Paoletti P, Kieffer BL, 2011. Zinc alleviates pain through high-affinity binding to the NMDA receptor NR2A subunit. *Nat Neurosci*, 14, 1017-22.
- O'Dell BL, Newberne PM, Savage JE, 1958. Significance of dietary zinc for the growing chicken. *J Nutr*, 65, 503-18.

- Oh Y, Chung KC, 2012. Small ubiquitin-like modifier (SUMO) modification of zinc finger protein 131 potentiates its negative effect on estrogen signaling. *The Journal of biological chemistry*, 287, 21, 17517-29.
- Ohana E, Hoch E, Keasar C, Kambe T, Yifrach O, Hershfinkel M, Sekler I, 2009. Identification of the Zn²⁺ binding site and mode of operation of a mammalian Zn²⁺ transporter. *J Biol Chem*, 284, 17677–86.
- Outten CE, O'Halloran TV, 2001. Femtomolar sensitivity of metalloregulatory proteins controlling zinc homeostasis. *Science*, 292, 2488–92.
- Palm R, Strand T, Hallmans G, 1986. Zinc, total protein, and albumin in CSF of patients with cerebrovascular diseases. *Acta Neurol Scand*, 74, 4, 308-13.
- Palmiter RD, Cole TB, Findley SD, 1996. ZnT-2, a mammalian protein that confers resistance to zinc by facilitating vesicular sequestration. *EMBO J*, 15, 1784–91.
- Palmiter RD, Cole TB, Quaife CJ, Findley SD, 1996. ZnT-3, a putative transporter of zinc into synaptic vesicles. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93, 14934–9.
- Palmiter RD, Findley SD, 1995. Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc. *EMBO J*, 14, 639–49.
- Palmiter RD, Findley SD, Whitmore TE, Durnam DM, 1992. MT-III, a brain-specific member of the metallothionein gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 15, 89(14), 6333-7.
- Palmiter RD, Huang L, 2004. Efflux and compartmentalization of zinc by members of the SLC30 family of solute carriers. *Pflügers Arch*, 447, 744–51.
- Palumaa P, Eriste E, Njankova O, Pokras L, Jörnvall H, Sillard R, 2002. Brain-specific metallothionein-3 has higher metal-binding capacity than ubiquitous metallothioneins and binds metals noncooperatively. *Biochemistry*, 41(19), 6158-63.
- Palumaa P, Tammiste I, Kruusel K, Kangur L, Jörnvall H, Sillard R, 2004. Metal binding of metallothionein-3 versus metallothionein-2: lower affinity and higher plasticity. *Biochim Biophys Acta*, 14, 1747(2), 205-11.
- Pandi-Perumal SR, Trakht I, Srinivasan V, Spence DW, Maestroni GJ, Zisapel N, Cardinali DP, 2008. Physiological effects of melatonin: role of melatonin receptors and signal transduction pathways. *Prog Neurobiol*, 85, 3, 335-53.
- Pang SF, Tang F, Tang PL, 1984. Negative correlation of age and the levels of pineal melatonin, pineal N-acetylserotonin, and serum melatonin in male rats. *J. Exp. Zool*, 229, 1, 41–7.
- Paradies G, Petrosillo G, Paradies V, Reiter RJ, Ruggiero FM, 2010. Melatonin, cardiolipin and mitochondrial bioenergetics in health and disease. *J Pineal Res*, 48, 4, 297-310.
- Park JD, Liu Y, Klaassen CD, 2001. Protective effect of metallothionein against the toxicity of cadmium and other metals (1). *Toxicology*, 163, 2-3, 93-100.
- Park JG, Qin Y, Galati DF, Palmer AE, 2012. New sensors for quantitative measurement of mitochondrial Zn²⁺. *ACS Chem Biol*, 7, 1636–40.
- Park S, Byeon Y, Kim YS, Back K, 2013. Kinetic analysis of purified recombinant rice N-acetylserotonin methyltransferase and peak melatonin production in etiolated rice shoots. *J. Pineal Res*, 54, 2, 139–44.
- Parlakpınar H, Sahna E, Ozer MK, Ozugurlu F, Vardi N, Acet A, 2002. Physiological and pharmacological concentrations of melatonin protect against cisplatin-induced acute renal injury. *J Pineal Res*, 33, 3, 161-6.
- Paulsen IT, Saier MH, 1997. Jr. A novel family of ubiquitous heavy metal ion transport proteins. *J Membr Biol*, 156, 99–103.
- Penkowa M, Carrasco J, Giralt M, Moos T, Hidalgo J, 1999. CNS wound healing is severely depressed in metallothionein I- and II-deficient mice. *J Neurosci*, 19(7), 2535-45.
- Penkowa M, Giralt M, Camats J, Hidalgo J, 2002. 1st 9. Metallothionein 1+2 protect the CNS during neuroglial degeneration induced by 6-aminonicotinamide. *J Comp Neurol*, 5, 444(2), 174-89.

- Penny ME, 2013. Zinc supplementation in public health. *Ann Nutr Metab*, 62, 1, 31–42.
- Perez-Clausell J, Danscher G, 1985. Intravesicular localization of zinc in rat telencephalic boutons. A histochemical study. *Brain Res*, 337, 91–8.
- Perreau-Lenz S, Kalsbeek A, Garidou ML, Wortel J, van der Vliet J, van Heijningen C, Simonneaux V, Pévet P, Buijs RM, 2003. Suprachiasmatic control of melatonin synthesis in rats: inhibitory and stimulatory mechanisms. *Eur J Neurosci*, 17, 2, 221–8.
- Peters JL, Dufner-Beattie J, Xu W, Geiser J, Lahner B, Salt DE, Andrews GK, 2007. Targeting of the mouse *Slc39a2* (*Zip2*) gene reveals highly cell-specific patterns of expression, and unique functions in zinc, iron, and calcium homeostasis. *Genesis*, 45, 339–52.
- Petkovic V, Miletta MC, Eble A, Iliev DI, Binder G, Fluck CE, Mullis PE, 2013. Effect of zinc binding residues in growth hormone (GH) and altered intracellular zinc content on regulated GH secretion. *Endocrinology*, 154, 4215–25.
- Pierpaoli W, Regelson W, 1994. Pineal control of aging: effect of melatonin and pineal grafting on aging mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 2, 787–91.
- Pinilla-Tenas JJ, Sparkman BK, Shawki A, Illing AC, Mitchell CJ, Zhao N, Liuzzi JP, Cousins RJ, Knutson MD, Mackenzie B, 2011. *Zip14* is a complex broad-scope metal-ion transporter whose functional properties support roles in the cellular uptake of zinc and nontransferrin-bound iron. *Am J Physiol Cell Physiol*, 301, 862–71.
- Pintor J, Martin L, Pelaez T, Hoyle CH, Peral A, 2001. Involvement of melatonin MT (3) receptors in the regulation of intraocular pressure in rabbits. *Eur J Pharmacol*, 30, 416(3), 251–4.
- Pirodda A, Raimondi MC, Ferri GG, 2010. Exploring the reasons why melatonin can improve tinnitus. *Med Hypotheses*, 75, 2, 190–1.
- Pocanschi CL, Ehsani S, Mehrabian M, Wille H, Reginold W, Trimble WS, Wang H, Yee A, Arrowsmith CH, Bozoky Z, Kay LE, Forman-Kay JD, Rini JM, Schmitt-Ulms G, 2013. The ZIP5 ectodomain co-localizes with PrP and may acquire a PrP-like fold that assembles into a dimer. *PLoS One*, 8, 72446.
- Podar D, Scherer J, Noordally Z, Herzyk P, Nies D, Sanders D, 2012. Metal selectivity determinants in a family of transition metal transporters. *J Biol Chem*, 287, 3185–96.
- Poeggeler B, Reiter RJ, Tan DX, Chen LD, Manchester, L.C., 1993. Melatonin, hydroxyl radical-mediated oxidative damage, and aging: a hypothesis. *J. Pineal Res*, 14, 4, 151–68.
- Pountney DL, Fundel SM, Faller P, Birchler NE, Hunziker P, Vasák M, 1994. Isolation, primary structures and metal binding properties of neuronal growth inhibitory factor (GIF) from bovine and equine brain. *FEBS Lett*, 30, 345(2-3), 193–7.
- Prasad AS, 1985. Clinical manifestations of zinc deficiency. *Annu Rev Nutr*, 5, 341–63.
- Prasad AS, 2003. Zinc deficiency. *BMJ*, 326, 409–10.
- Prasad AS, Beck FW, Bao B, Fitzgerald JT, Snell DC, Steinberg JD, Cardozo LJ, 2007. Zinc supplementation decreases incidence of infections in the elderly: effect of zinc on generation of cytokines and oxidative stress. *Am J Clin Nutr*, 85, 837–44.
- Prasad AS, Halsted JA, Nadimi M, 1961. Syndrome of iron deficiency anemia, hepatosplenomegaly, hypogonadism, dwarfism and geophagia. *Am J Med*, 31, 532–46.
- Pullen RGL, Franklin PA, Hall GH, 1990. 65 Zinc uptake from blood into brain and other tissues in the rat. *Neurochem Res*, 15, 1003–8.
- Pullen RGL, Franklin PA, Hall HG, 1991. 65 Zinc uptake from blood into brain in the rat. *J Neurochem*, 56, 485–9.
- Qiao W, Mooney M, Bird AJ, Winge DR, Eide DJ, 2006. Zinc binding to a regulatory zinc-sensing domain monitored in vivo by using FRET. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103, 8674–9.
- Qin Y, Dittmer PJ, Park JG, Jansen KB, Palmer AE, 2011. Measuring steady-state and dynamic endoplasmic reticulum and Golgi Zn²⁺ with genetically encoded sensors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 7351–6.

- Qin Z, Caruso JA, Lai B, Matusch A, Becker JS, 2011. Trace metal imaging with high spatial resolution: applications in biomedicine. *Metallomics*, 3, 28–37.
- Quadri M, Federico A, Zhao T, Breedveld GJ, Battisti C, Delnooz C, Severijnen LA, Di Toro Mammarella L, Mignarri A, Monti L, Sanna A, Lu P, Punzo F, Cossu G, Willemsen R, Rasi F, Oostra BA, vande Warrenburg BP, Bonifati V, 2012. Mutations in SLC30A10 cause Parkinson is manddystoni a withhy permanganesemia, polycythemia, andchronicliver disease. *Am J Hum Genet*, 90, 467–77.
- Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD, 1994. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia. *Biochemistry*, 14, 33(23), 7250-9.
- Quiroz Y, Ferrebuz A, Romero F, Vaziri ND, Rodriguez-Iturbe B, 2008. Melatonin ameliorates oxidative stress, inflammation, proteinuria, and progression of renal damage in rats with renal mass reduction. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294, 2, 336-44.
- Raudenska M, Gumulec J, Podlaha O, Sztalmachova M, Babula P, Eckschlager T, Adam V, Kizek R, Masarik M, 2014. Metallothionein polymorphisms in pathological processes. *Metallomics*, 6, 1, 55-68.
- Raulin J, 1869. Etudes clinique sur la vegetation. *Annales des Sciences Naturelle: Botanique*, 11, 93–299.
- Reiter R, 1991. Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *Physiology*, 6, 223-7.
- Reiter RJ, 1981. The mammalian pineal gland: structure and function. *Am J Anat*, 162, 4, 287-13.
- Reiter RJ, 1992. The ageing pineal gland and its physiological consequences. *Bioessays*, 14, 3, 169–75.
- Reiter RJ, 1993. Electromagnetic fields and melatonin production. *Biomed Pharmacother*, 47, 10, 439-44.
- Reiter RJ, 2000. Melatonin: lowering the high price of free radicals. *News Physiol. Sci*, 15, 246–50.
- Reiter RJ, Craft CM, Johnson JE, King TS, Richardson BA, Vaughan GM, Vaughan MK, 1981. Age-associated reduction in nocturnal pineal melatonin levels in female rats. *Endocrinology*, 109, 4, 1295–7.
- Reiter RJ, Richardson BA, Johnson LY, Ferguson BN, Dinh DT, 1980. Pineal melatonin rhythm: reduction in aging Syrian hamsters. *Science*, 210, 4476, 1372–3.
- Reiter RJ, Tan DX, Fuentes-Broto L, 2010. Melatonin: a multitasking molecule. *Prog Brain Res*, 181:127-51.
- Reiter RJ, Tan DX, Korkmaz A, Erren TC, Piekarski C, Tamura H, Manchester LC, 2007. Light at night, chronodisruption, melatonin suppression, and cancer risk: a review. *Crit Rev Oncog*, 13, 4, 303-28.
- Reiter RJ, Tan DX, Osuna C, Gitto E, 2000. Actions of melatonin in the reduction of oxidative stress. A review. *J Biomed Sci*, 7, 6, 444-58.
- Reiter RJ, Tan DX, Rosales-Corral S, Manchester LC, 2013. The universal nature, unequal distribution and antioxidant functions of melatonin and its derivatives. *Mini Rev. Med. Chem*, 13, 3, 373–84.
- Religa D, Strozyk D, Cherny RA, Volitakis I, Haroutunian V, Winblad B, Naslund J, Bush AI, 2006. Elevated cortical zinc in Alzheimer disease. *Neurology*, 67, 69–75.
- Reppert SM, Weaver DR, Godson C, 1996. Melatonin receptors step into the light: cloning and classification of subtypes. *Trends Pharmacol Sci*, 17, 3, 100-2.
- Reyes JG, 1996. Zinc transport in mammalian cells. *Am J Physiol Cell Physiol*, 270, 401–10.
- Robson T, Grindley H, Hall A, Vormoor J, Lohrer H, 1994. Increased DNA-repair capacity and the modulation of 2 proteins in and metallothionein overexpressing Chinese hamster cell line. *Mutat Res*, 314, 2, 143-57.

- Roca AL, Godson C, Weaver DR, Reppert SM, 1996. Structure, characterization, and expression of the gene encoding the mouse Mel1a melatonin receptor. *Endocrinology*, 137, 8, 3469-77.
- Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolín I, Herrera F, Martín V, Reiter RJ, 2004. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. *J. Pineal Res*, 36, 1, 1–9.
- Rodriguez GA, Tai LM, LaDu MJ, Rebeck GW, 2014. Human APOE4 increases microglia reactivity at A β plaques in a mouse model of A β deposition. *J Neuroinflammation*, 19, 11, 111.
- Ross MH, Pawlina W, 2013. *Histology – A Text & Atlas*. Latest Edition.
- Roth JA, Kim BG, Lin WL, Cho MI, 1999. Melatonin promotes osteoblast differentiation and bone formation. *J Biol Chem*, 30, 274(31), 22041-7.
- Roy S, Kumar A, Baig MH, Masařík M, Provazník I, 2015. Virtual screening, ADMET profiling, molecular docking and dynamics approaches to search for potent selective natural molecules based inhibitors against metallothionein-III to study Alzheimer's disease. *Methods*, 83, 105-10.
- Ruttkey-Nedecky B, Nejdí L, Gumulec J, Zitka O, Masarik M, Eckschlager T, Stiborova M, Adam V, Kizek R, 2013. The role of metallothionein in oxidative stress. *Int J Mol Sci*, 15, 14(3), 6044-66.
- Sabolić I, Breljak D, Skarica M, Herak-Kramberger CM, 2010. Role of metallothionein in cadmium traffic and toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals*, 23, 5, 897-926
- Salazar G, Craige B, Love R, Kalman D, Faundez V, 2005. Vglut1 and ZnT3 co-targeting mechanisms regulate vesicular zinc stores in PC12 cells. *J Cell Sci*, 118, 1911–21.
- Salazar G, Falcon-Perez JM, Harrison R, Faundez V, 2009. SLC30A3 (ZnT3) oligomerization by dityrosine bonds regulates its subcellular localization and metal transport capacity. *PLoS One*, 4, 5896.
- Salazar G, Love R, Styers ML, Werner E, Peden A, Rodriguez S, Gearing M, Wainer BH, Faundez V, 2004. AP-3-dependent mechanisms control the targeting of a chloride channel (ClC-3) in neuronal and non-neuronal cells. *J Biol Chem*, 279, 25430–9.
- Sanchez-Hidalgo M, de la Lastra CA, Carrascosa-Salmoral MP, Naranjo MC, Gomez-Corvera A, Caballero B, Guerrero JM, 2009. Age-related changes in melatonin synthesis in rat extrapineal tissues. *Exp Gerontol*, 44, 5, 328-34.
- Sandstead HH, 1991. Zinc deficiency. A public health problem? *Am J Dis Child*, 145, 853–9.
- Sandstead HH, 2013. Human zinc deficiency: discovery to initial translation. *Adv Nutr*, 4, 76–81.
- Sato M, Kondoh M, 2002. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med*, 196, 1, 9-22.
- Satoh M, Kondo Y, Mita M, Nakagawa I, Naganuma A, Imura N, 1993. Prevention of carcinogenicity of anticancer drugs by metallothionein induction. *Cancer Res*, 53(20), 4767-8.
- Sawashita J, Takeda A, Okada S, 1997. Change of zinc distribution in rat brain with increasing age. *Brain Res Dev Brain Res*, 20, 102(2), 295-8.
- Schaeffer HJ, Sirotkin AV, 1995. Melatonin and serotonin directly regulate oxytocin, insulin-like growth factor-I and progesterone secretion by cultured human granulosa cells. *Adv Exp Med Biol*, 395, 547-8.
- Schaible UE, Kaufmann SH, 2004. Iron and microbial infection. *Nat Rev Microbiol*, 2, 946– 53.
- Schmitt S, Kury S, Giraud M, Dreno B, Kharfi M, Bezieau S, 2009. An update on mutations of the SLC39A4 gene in acrodermatitis enteropathica. *Hum Mutat*, 30, 926–33.
- Schmitt-Ulms G, Ehsani S, Watts JC, Westaway D, Wille H, 2009. Evolutionary descent of prion genes from the ZIP family of metal ion transporters. *PLoS One*, 4, 7208.
- Scott DA, Fisher AM, 1938. The insulin and the zinc content of normal and diabetic pancreas. *J Clin Invest*, 17, 725–8.
- Sener G, Toklu H, Kapucu C, Ercan F, Erkanli G, Kacmaz A, Tilki M, Yegen BC, 2005. Melatonin protects against oxidative organ injury in a rat model of sepsis. *Surg. Today* 35, 1, 52–9.

- Sensi SL, Canzoniero LM, Yu SP, Ying HS, Koh JY, Kerchner GA, Choi DW, 1997. Measurement of intracellular free zinc in living cortical neurons: routes of entry. *J Neurosci*, 17, 9554–64.
- Sensi SL, Paoletti P, Bush AI, Sekler I, 2009. Zinc in the physiology and pathology of the CNS. *Nat Rev Neurosci*, 10, 780–91.
- Sensi SL, Paoletti P, Koh JY, Aizenman E, Bush AI, Hershfinkel M, 2011. The neurophysiology and pathology of brain zinc. *J Neurosci*, 31, 16076–85.
- Sharir H, Zinger A, Nevo A, Sekler I, Hershfinkel M, 2010. Zinc released from injured cells is acting via the Zn²-sensing receptor, ZnR, to trigger signaling leading to epithelial repair. *J Biol Chem*, 285, 26097–106.
- Shaw CF, Stillman MJ, Suzuki KT, 1992. *Metallothioneins: Synthesis, Structure and Properties of Metallothioneins, Phytochelatins and Metal- Thiolate Complexes*, VCH Publishers, New York.
- Shuai Y, Guo J, Peng SQ, Zhang LS, 2007. [Metallothionein inhibited DOX-induced cardiac apoptosis in mice]. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 38, 4, 620-3.
- Shusterman E, Beharier O, Shiri L, Zarivach R, Etzion Y, Campbell CR, Lee IH, Okabayashi K, Dinudom A, Cook DI, Katz A, Moran A, 2014. ZnT-1 extrudes zinc from mammalian cells functioning as a Zn²/Hexchanger. *Metallomics*, 6, 1656–63.
- Simpkins C, Lloyd T, Li S, Balderman S, 1998. Metallothionein-induced increase in mitochondrial inner membrane permeability. *The Journal of surgical research*, 75, 1, 30-4.
- Simpkins CO, 2000. Metallothionein in human disease. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 46, 2, 465-88.
- Sindreu C, Palmiter RD, Storm DR, 2011. Zinc transporter ZnT-3 regulates presynaptic Erk1/2 signaling and hippocampus-dependent memory. *Proc Natl Acad Sci USA*, 108, 3366–70.
- Slominski A, Fischer TW, Zmijewski MA, Wortsman J, Semak I, Zbytek B, Slominski RM, Tobin DJ, 2005. On the role of melatonin in skin physiology and pathology. *Endocrine*, 27, 2, 137-48.
- Slominski A, Tobin DJ, Zmijewski MA, Wortsman J, Paus R, 2008. Melatonin in the skin: synthesis, metabolism and functions. *Trends Endocrinol Metab*, 19, 1, 17-24.
- Slominski RM, Reiter RJ, Schlabritz-Loutsevitch N, Ostrom RS, Slominski AT, 2012. Melatonin membrane receptors in peripheral tissues: distribution and functions *Mol Cell Endocrinol*, 4, 351(2), 152-66.
- Smart TG, Xie X, Krishek BJ, 1994. Modulation of inhibitory and excitatory amino acid receptor ion channels by zinc. *Prog Neurobiol*, 42, 3, 393-441.
- Smidt K, Jessen N, Petersen AB, Larsen A, Magnusson N, Jeppesen JB, Stoltenberg M, Culvenor JG, Tsatsanis A, Brock B, Schmitz O, Wogensen L, Bush AI, Rungby J, 2009. SLC30A3 responds to glucose- and zinc variations in beta-cells and is critical for insulin production and in vivo glucose metabolism during beta-cell stress. *PLoS One*, 4, 5684.
- Smith JL, Xiong S, Markesbery WR, Lovell MA, 2006. Altered expression of zinc transporters-4 and -6 in mild cognitive impairment, early and late Alzheimer's disease brain. *Neuroscience*, 140, 879–88.
- Stafford SL, Bokil NJ, Achard ME, Kapetanovic R, Schembri MA, McEwan AG, Sweet MJ, 2013. Metal ions in macrophage antimicrobial pathways: emerging roles for zinc and copper. *Biosci Rep*, 33.
- Stankovic RK, Chung RS, Penkowa M, 2007. Metallothioneins I and II: neuroprotective significance during CNS pathology. *Int J Biochem Cell Biol*, 39, 3, 484-9.
- Stehle JH, Saade A, Rawashdeh O, Ackermann K, Jilg A, Sebestény T, Maronde E, 2011. A survey of molecular details in the human pineal gland in the light of phylogeny, structure, function and chronobiological diseases. *J. Pineal Res*, 51, 1, 17–43.
- Stillman M, 1995. Metallothioneins. *Coord Chem Rev*, 144, 461-511.
- Stojilković SS, Chang JP, Ngo D, Tasaka K, Izumi S, Catt KJ, 1989. Mechanism of action of GnRH: the participation of calcium mobilization and activation of protein kinase C in gonadotropin secretion. *J Steroid Biochem*, 33, 4B, 693-703.

- Stuart GW, Searle PF, Palmiter RD, 1985. Identification of multiple metal regulatory elements in Mouse metallothionein-Ipromoter by assaying synthetic sequences. *Nature*, 317, 828–31.
- Subramanian Vignesh K, Landero Figueroa JA, Porollo A, Caruso JA, Deepe GS Jr, 2013. Granulocyte macrophage-colony stimulating factor induced Zn sequestration enhances macrophage superoxide and limits intracellular pathogen survival. *Immunity*, 39, 697–710.
- Sugarman B, Munro HN, 1980. Altered [65Zn] chloride accumulation by aged rats' adipocytes in vitro. *J Nutr*, 110(11), 2317–20.
- Suh SW, Won SJ, Hamby AM, Yoo BH, Fan Y, Sheline CT, Tamano H, Takeda A, Liu J, 2009. Decreased brain zinc availability reduces hippocampal neurogenesis in mice and rats. *J Cereb Blood Flow Metab*, 29, 1579–88.
- Summer KH, Klein D, de Ruiter N, Abel J, 1989. Metallothionein induction by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Biol Trace Elem Res*, 21, 165–9.
- Sutherland DE, Stillman MJ, 2011. The "magic numbers" of metallothionein. *Metallomics: integrated biometal science*, 3, 5, 444–63.
- Suzuki T, Ishihara K, Migaki H, Matsuura W, Kohda A, Okumura K, Nagao M, Yamaguchi-Iwai Y, Kambe T, 2005. Zinc transporters, ZnT5 and ZnT7, are required for the activation of alkaline phosphatases, zinc-requiring enzymes that are glycosylphosphatidylinositol-anchored to the cytoplasmic membrane. *J Biol Chem*, 280, 637–43.
- Szewczyk B, 2013. Zinc homeostasis and neurodegenerative disorders. *Front Aging Neurosci*, 5, 33.
- Takahashi S, 2012. Molecular functions of metallothionein and its role in hematological malignancies. *J Hematol Oncol*, 27, 5, 41.
- Takahashi Y, Ogra Y, Suzuki KT, 2005. Nuclear trafficking of metallothionein requires oxidation of a cytosolic partner. *Journal of cellular physiology*, 202, 2, 563–9.
- Takeda A, 2000. Movement of zinc and its functional significance in the brain. *Brain Res Brain Res Rev*, 34, 3, 137–48.
- Takeda A, 2014. Significance of Zn (2+) signaling in cognition: insight from synaptic Zn (2+) dyshomeostasis. *J Trace Elem Med Biol*, 28(4), 393–6.
- Takeda A, Akiyama T, Sawashita J, Okada S, 1994. Brain uptake of trace metals, zinc and manganese, in rats. *Brain Res*, 21, 640(1–2), 341–4.
- Takeda A, Kodama Y, Ohnuma M, Okada S, 1998. Zinc transport from the striatum and substantia nigra. *Brain Res Bull*, 1, 47(1), 103–6.
- Takeda A, Minami A, Takefuta S, Tochigi M, Oku N, 2001. Zinc homeostasis in the brain of adult rats fed zinc-deficient diet. *J Neurosci Res*, 1, 63(5), 447–52.
- Takeda A, Nakamura M, Fujii H, Tamano H, 2013. Synaptic Zn²⁺ homeostasis and its significance. *Metallomics*, 5, 417–23.
- Takeda A, Ohnuma M, Sawashita J, Okada S, 1997. Zinc transport in the rat olfactory system. *Neurosci Lett*, 28, 225(1), 69–71.
- Takeda A, Sawashita J, Okada S, 1995. Biological half-lives of zinc and manganese in rat brain. *Brain Res*, 9, 695(1), 53–8.
- Takeda A, Takefuta S, Okada S, Oku N, 2000. Relationship between brain zinc and transient learning impairment of adult rats fed zinc-deficient diet. *Brain Res*, 24, 859(2), 352–7.
- Takeda A, Tamano H, 2009. Insight into zinc signaling from dietary zinc deficiency. *Brain Res Rev*, 62, 33–44.
- Tamaki M, Fujitani Y, Hara A, Uchida T, Tamura Y, Takeno K, Kawaguchi M, Watanabe T, Ogihara T, Fukunaka A, Shimizu T, Mita T, Kanazawa A, Imaizumi MO, Abe T, Kiyonari H, Hojyo S, Fukada T, Kawauchi T, Nagamatsu S, Hirano T, Kawamori R, Watada H, 2013. The diabetes-susceptible gene SLC30A8/ZnT8 regulates hepatic insulin clearance. *J Clin Invest*, 123, 4513–24.
- Tamura H, Nakamura Y, Korkmaz A, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Reiter RJ, 2009. Melatonin and the ovary: physiological and pathophysiological implications. *Fertil Steril*, 92, 1, 328–43.

- Tamura H, Nakamura Y, Terron MP, Manchester LC, Tan DX, Sugino N, Iorio LJ, Reiter RJ, 2008. Melatonin and pregnancy in the human. *Reprod Toxicol*, 25, 3, 291-303.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Galano A, Reiter RJ, 2014. Cyclic-3-hydroxymelatonin (C3HOM), a potent antioxidant, scavenges free radicals and suppresses oxidative reactions. *Curr. Med. Chem*, 21, 13, 1557–65.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, Paredes SD, Korkmaz A, Sainz RM, Mayo JC, Fuentes-Broto L, Reiter RJ, 2010. The changing biological roles of melatonin during evolution: from an antioxidant to signals of darkness, sexual selection and fitness. *Biol Rev Camb Philos Soc*, 85, 3, 607-23.
- Tan DX, Manchester LC, Burkhardt S, Sainz RM, Mayo JC, Kohen R, Shohami E, Huo YS, Hardeland R, Reiter RJ, 2001. N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine, a biogenic amine and melatonin metabolite, functions as a potent antioxidant. *FASEB J*, 15, 12, 2294-6.
- Tan DX, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ, 2007. One molecule, many derivatives: a never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? *J. Pineal Res*, 42, 1, 28–42.
- Tan DX, Pöeggeler B, Reiter RJ, Chen LD, Chen S, Manchester LC, Barlow-Walden LR, 1993. The pineal hormone melatonin inhibits DNA-adduct formation induced by the chemical carcinogen safrole in vivo. *Cancer Lett*, 15, 70(1-2), 65-71.
- Tapiero H, Tew KD, 2003. Trace elements in human physiology and pathology: zinc and metallothioneins. *Biomedicine & pharmacotherapy = Biomedecine & pharmacotherapie*, 57, 9, 399-11.
- Taylor CM, Bacon JR, Aggett PJ, Bremner I, 1991. Homeostatic regulation of zinc absorption and endogenous losses in zinc-deprived men. *Am J Clin Nutr*, 53, 755–63.
- Taylor KM, 2000. LIV-1 breast cancer protein belongs to new family of histidine-rich membrane proteins with potential to control intracellular Zn²⁺ homeostasis. *IUBMB Life*, 49, 249–53.
- Taylor KM, Hiscox S, Nicholson RI, Hogstrand C, Kille P, 2012. Protein kinase CK2 triggers cytosolic zinc signaling pathways by phosphorylation of zinc channel ZIP7. *Sci Signal*, 5, 11.
- Taylor KM, Morgan HE, Johnson A, Nicholson RI, 2005. Structure-function analysis of a novel member of the LIV-1 subfamily of zinc transporters, ZIP14. *FEBS Lett*, 579, 427–32.
- Taylor KM, Morgan HE, Smart K, Zahari NM, Pumford S, Ellis IO, Robertson JF, Nicholson RI, 2007. The emerging role of the LIV-1 subfamily of zinc transporters in breast cancer. *Mol Med*, 13, 396–6.
- Taylor KM, Nicholson RI, 2003. The LZT proteins; the LIV-1 subfamily of zinc transporters. *Biochim Biophys Acta*, 1611, 16–30.
- Thiers RE, Vallee BL, 1957. Distribution of metals in subcellular fractions of rat liver. *J Biol Chem*, 226, 911–20.
- Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M, 2011. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World journal of surgical oncology*, 9, 54.
- Thorlacius-Ussing O, 1987. Zinc in the anterior pituitary of rat: a histochemical and analytical work. *Neuroendocrinology*, 45, 233–42.
- Todd WR, Elvehjem CA, Hart EB, 1934. Zinc in the nutrition of the rat. *Am J Physiol*, 107, 146–56.
- Tomat E, Lippard SJ, 2010. Imaging mobile zinc in biology. *Curr Opin Chem Biol*, 14, 225–30.
- Torres-Farfan C, Richter HG, Rojas-García P, Vergara M, Forcelledo ML, Valladares LE, Torrealba F, Valenzuela GJ, Serón-Ferré M, 2003. Mt 1 Melatonin receptor in the primate adrenal gland: inhibition of adrenocorticotropin-stimulated cortisol production by melatonin. *J Clin Endocrinol Metab*, 88, 1, 450-8.
- Tsujikawa K, Imai T, Kakutani M, Kayamori Y, Mimura T, Otaki N, Kimura M, Fukuyama R, Shimizu N, 1991. Localization of metallothionein in nuclei of growing primary cultured adult rat hepatocytes. *FEBS Lett*, 3, 283(2), 239-42.

- Tuerk MJ, Fazel N, 2009. Zinc deficiency. *Curr Opin Gastroenterol*, 25, 136–43.
- Turnlund JR, Durkin N, Costa F, Margen S, 1986. Stable isotope studies of zinc absorption and retention in young and elderly men. *J Nutr*, 116(7), 1239–47.
- Tuschl K, Clayton PT, Gospe SM Jr, Gulab S, Ibrahim S, Singhi P, Aulakh R, Ribeiro RT, Barsottini OG, Zaki MS, Del Rosario ML, Dyack S, Price V, Rideout A, Gordon K, Wevers RA, Chong WK, Mills PB, 2012. Syndrome of hepatic cirrhosis, dystonia, polycythemia, and hypermanganesemia caused by mutations in *SLC30A10*, a manganese transporter in man. *Am J Hum Genet*, 90, 457–66.
- Uchida Y, 2010. Molecular mechanisms of regeneration in Alzheimer's disease brain. *Geriatr Gerontol Int*, 1, 158–68.
- Uchida Y, Takio K, Titani K, Ihara Y, Tomonaga M, 1991. The growth inhibitory factor that is deficient in the Alzheimer's disease brain is a 68 amino acid metallothionein-like protein. *Neuron*, 7, 2, 337–47.
- Vallee BL, Auld DS, 1990. Zinc coordination, function, and structure of zinc enzymes and other proteins. *Biochemistry*, 29, 5647–59.
- Vallee BL, Auld DS, 1993. New perspective on zinc biochemistry: cocatalytic sites in multi-zinc enzymes. *Biochemistry*, 6, 32(26), 6493–500.
- Vallee BL, Falchuk KH, 1993. The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev*, 73, 79–118.
- Vanecek J, Vollrath L, 1990. Developmental changes and daily rhythm in melatonin-induced inhibition of 3',5'-cyclic AMP accumulation in the rat pituitary. *Endocrinology*, 126, 3, 1509–13.
- Vasák M, 2005. Advances in metallothionein structure and functions. *J Trace Elem Med Biol*, 19, 1, 13–7.
- Vasak M, Meloni G, 2011. Chemistry and biology of mammalian metallothioneins. *Journal of biological inorganic chemistry: JBIC: a publication of the Society of Biological Inorganic Chemistry*, 16, 7, 1067–78.
- Vašák M, Meloni G, 2017. Mammalian Metallothionein-3: New Functional and Structural Insights. *Int J Mol Sci*, 18(6), 1117.
- Velazquez-Delgado EM, Hardy JA, 2012. Zinc-mediated allosteric inhibition of caspase-6. *J Biol Chem*, 287, 36000–11.
- Venegas C, García JA, Escames G, Ortiz F, López A, Doerrier C, García-Corzo L, López LC, Reiter RJ, Acuña-Castroviejo D, 2012. Extrapineal melatonin: analysis of its subcellular distribution and daily fluctuations. *J Pineal Res*, 52, 2, 217–27.
- Vergnano AM, Rebola N, Savtchenko LP, Pinheiro PS, Casado M, Kieffer BL, Rusakov DA, Mülle C, Paoletti P, 2014. Zinc Dynamics and action at excitatory synapses. *Neuron*, 82, 1101–14.
- Vinkenburg JL, Nicolson TJ, Bellomo EA, Koay MS, Rutter GA, Merks M, 2009. Genetically encoded FRET sensors to monitor intracellular Zn²⁺ homeostasis. *Nat Methods* 6: 737–40.
- Vogt K, Mellor J, Tong G, Nicoll R, 2000. The actions of synaptically released zinc at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuron*, 26, 187–96.
- Von Bulow V, Rink L, Haase H, 2005. Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF- α and IL-1 β production in monocytes by elevation of guanosine 3',5'-cyclic monophosphate. *J Immunol*, 175, 4697–705.
- Wagner D, Maser J, Lai B, Cai Z, Barry CE3rd, Honer Zu Bentrup K, Russell DG, Bermudez LE, 2005. Elemental analysis of *Mycobacterium avium*-, *Mycobacterium tuberculosis*-, and *Mycobacterium smegmatis*-containing phagosomes indicates pathogen-induced micro environments within the host cell's endosomal system. *J Immunol*, 174, 1491–1500.
- Wang F, Dufner-Beattie J, Kim BE, Petris MJ, Andrews G, Eide DJ, 2004. Zinc-stimulated endocytosis controls activity of the mouse ZIP1 and ZIP3 zinc uptake transporters. *J Biol Chem*, 279, 24631–9.

- Wang F, Kim BE, Dufner-Beattie J, Petris MJ, Andrews G, Eide DJ, 2004. Acrodermatitis enteropathica mutations affect transport activity, localization and zinc-responsive trafficking of the mouse ZIP4 zinc transporter. *Hum Mol Genet*, 13, 563–71.
- Wang F, Kim BE, Petris MJ, Eide DJ, 2004. The mammalian Zip5 protein is a zinc transporter that localizes to the basolateral surface of polarized cells. *J Biol Chem*, 279, 51433–41.
- Wang GW, Klein JB, Kang YJ, 2001. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes. *Pharmacol Exp Ther*, 298, 2, 461–8.
- Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J, Gitschier J, 2002. A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet*, 71, 66–73.
- Wang ZY, Dahlström A, 2008. Axonal transport of zinc transporter 3 and zinc containing organelles in the rodent adrenergic system. *Neurochem Res*, 33, 12, 2472–9.
- Weaver BP, Dufner-Beattie J, Kambe T, Andrews GK, 2007. Novel zinc-responsive posttranscriptional mechanisms reciprocally regulate expression of the mouse Slc39a4 and Slc39a5 zinc transporters (Zip4 and Zip5). *Biol Chem*, 388, 1301–12.
- Webley GE, Luck MR, 1986. Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells in vitro. *J Reprod Fertil*, 78, 2, 711–7.
- Wei Y, Fu D, 2006. Binding and transport of metal ions at the dimer interface of the Escherichia coli metal transporter YiiP. *J Biol Chem*, 281, 23492–502.
- Weiss JH, Sensi SL, Koh JY, 2000. Zn²⁺: a novel ionic mediator of neural injury in brain disease. *Trends Pharmacol Sci*, 21, 395–401.
- Wessbach A, 1960. A novel system for the incorporation of amino acids by extracts of E. coli B. *Biochim Biophys Acta*, 15, 41, 498–509.
- West AK, Hidalgo J, Eddins D, Levin ED, Aschner M, 2008. Metallothionein in the central nervous system: Roles in protection, regeneration and cognition. *Neurotoxicology*, 29, 3, 489–503.
- West AK, Stallings R, Hildebrand CE, Chiu R, Karin M, Richards RI, 1990. Human metallothionein genes: structure of the functional locus at 16q13. *Genomics*, 8, 3, 513–8.
- Westin G, Schaffner W, 1988. A zinc-responsive factor interacts with a metal-regulated enhancer element (MRE) of the Mouse metallothionein – I gene. *EMBO J*, 7, 3763–70.
- White C, Lee J, Kambe T, Fritsche K, Petris MJ, 2009. A role for the ATP7A copper transporting ATPase in macrophage bactericidal activity. *J Biol Chem*, 284, 33949–56.
- Wilson M, Hogstrand C, Maret W, 2012. Picomolar concentrations of free zinc(II) ions regulate receptor protein-tyrosine phosphatase beta activity. *J Biol Chem*, 287, 9322–6.
- Wimmer U, Wang Y, Georgiev O, Schaffner W, 2005. Two major branches of anti-cadmium defense in the mouse: MTF-1/metallothioneins and glutathione. *Nucleic Acids Res*, 33, 5715–27.
- Witt-Enderby PA, Bennett J, Jarzynka MJ, Firestone S, Melan MA, 2003. Melatonin receptors and their regulation: biochemical and structural mechanisms. *Life Sci*, 72, 20, 2183–98.
- Wood RJ, 2000. Assessment of marginal zinc status in humans. *J Nutr*, 130, 5, 1350–4.
- Wu JY, Tsou MY, Chen TH, Chen SJ, Tsao CM, Wu CC, 2008. Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats. *J. Pineal Res*, 45, 1, 106–16.
- Wu YH, Swaab DF, 2005. The human pineal gland and melatonin in aging and Alzheimer's disease. *J Pineal Res*, 38, 3, 145–52.
- Yamasaki S, Sakata-Sogawa K, Hasegawa A, Suzuki T, Kabu K, Sato E, Kurosaki T, Yamashita S, Tokunaga M, Nishida K, Hirano T, 2007. Zinc is a novel intracellular second messenger. *J Cell Biol*, 177, 637–45.
- Yavuz T, Kaya D, Behcet M, Ozturk E, Yavuz O, 2007. Effects of melatonin on Candida sepsis in an experimental rat model. *Adv. Ther*, 24, 1, 91–100.

- Yazıcı C, Köse K, 2004. Melatonin: Karanlığın antioksidan gücü. Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Dergisi, 13, 2, 56-65.
- Yu HS, Hernandez V, Haywood M, Wong CG, 1993. Melatonin inhibits the proliferation of retinal pigment epithelial (RPE) cells in vitro. In Vitro Cell Dev Biol Anim, 29, 5, 415-8.
- Zalewska M, Trefon J, Milnerowicz H, 2014. The role of metallothionein interactions with other proteins. Proteomics, 14, 11, 1343-56.
- Zalewski PD, Millard SH, Forbes IJ, Kapaniris O, Slavotinek A, Betts WH, Ward AD, Lincoln SF, Mahadevan I, 1994. Video image analysis of labile zinc in viable pancreatic islet cells using a specific fluorescent probe for zinc. J Histochem Cytochem, 42, 877-84.
- Zatta P, Raso M, Zambenedetti P, Rocco P, Petretto A, Mauri P, Cozzi B, 2006. Metallothionein-I-II expression in young and adult bovine pineal gland. Journal of chemical neuroanatomy, 31, 2, 124-9.
- Zawilska JB, Skene DJ, Arendt J, 2009. Physiology and pharmacology of melatonin in relation to biological rhythms. Pharmacol Rep, 61, 3, 383-410.
- Zhao H, Eide D, 1996. The yeast ZRT1 gene encodes the zinc transporter protein of a high-affinity uptake system induced by zinc limitation. Proc Natl Acad Sci USA, 93, 2454-8.
- Zhao H, Eide D, 1996. The ZRT2 gene encodes the low affinity zinc transporter in Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem, 271, 23203-10.
- Zheng H, Bermen NEJ, Klaassen CD, 1995. Neurochem Int, 27, 43-58.
- Zhou B, Wan C, Teng Q, Tao D, Wang Z, 2003. [Effect of melatonin and/or diazepam on circadian rhythm of cultured myocytes in rats]. Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban, 34, 4, 631-4.

7. EKLER

EK - A



T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ
DENEYSEL TIP ARAŞTIRMA VE UYGULAMA MERKEZİ MÜDÜRLÜĞÜ

Sayı : 41475755-2015/47
Konu : Etik Kurulu Onayı

17.03.2015

Sayın Prof. Dr. Abdülkerim Kasım BALTACI

"Pinealektomi ve Melatonin Uygulamasının Sıçan Beyin Dokusunda
Metallotionin, ZNT3, ZIP2 ve Çinko Düzeylerine Etkisi " isimli ve 2015/47 sayılı projeniz
17.03.2015 tarihinde yapılan Etik Kurul Toplantısında kabul edilmiştir.

Bilgilerinize rica ederim.

Doç.Dr. Yasemin ÖZNURLU
ETİK KURUL BAŞKAN VEKİLİ

SÜDAM Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu
İletişim: 0332 2230936

<http://www.selcuk.edu.tr/sudam/tr>
e-mail: sudametik@selcuk.edu.tr

8. ÖZGEÇMİŞ

09.06.1986 yılında Konya-Sarayönü ilçesinde doğdu. İlköğretim ve lise eğitimini aynı ilçede tamamladı. 2004 yılında girdiği Sivas Cumhuriyet Üniversitesinden yarı dönemde yatay geçişle Konya Selçuk Üniversitesi Fen Edebiyat Fakültesi Biyoloji Bölümüne geçti. 2008 yılında bu üniversiteden mezun oldu. 2010-2012 yılında Selçuk Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Moleküler Biyoloji Anabilim Dalında tezli yüksek lisans eğitimini yaptı. 2012 yılında Selçuk Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Fizyoloji (Tıp) Anabilim Dalında doktora eğitimine başladı. Evli ve iki çocuk annesidir.

