

TRANSPORTNÉ PROTEÍNY A ENZÝMY V EPITELI BACHORA RUMINENTOV

MARTIN DAŇO, MICHAL GALAMBOŠ
a OĽGA ROSSKOPFOVÁ

Katedra jadrovej chémie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského v Bratislave, Mlynská dolina, 842 15 Bratislava
dano@fns.uniba.sk, galambos@fns.uniba.sk

Došlo 23.10.12, prijaté 3.1.13.

Kľúčové slová: transportný proteín, výmenník, enzým, bachor

Obsah

1. Úvod
2. Sodíkovo-protónový výmenník
3. Sodíkovo-protónový výmenník regulačný faktor
4. Uhlíčanový výmenník
5. Sodno-uhlíčanový kotransportér
6. Aniónový výmenník
7. Vakuolárna protónová ATPáza
8. Karboanhydráza
9. Acetyl-CoA syntetáza
10. Monokarboxylátový transportér
11. Sodno-draselná ATPáza
12. Záver

1. Úvod

Bachor (rumén) prežúvavcov je schopný sa prispôbiť prevládajúcim podmienkam, ktoré sú tvorené prijímanou stravou. U mliečného dobytky sa toto prispôsobenie nachádza predovšetkým v období oteľenia. V tejto fáze sa musí zviera vzhľadom na nastávajúcu resp. začínajúcu laktáciu adaptovať na energeticky bohatšiu stravu. Nedostatočná adaptácia bachorovej sliznice (mukózy) môže viesť ku chorobám ako endometritída, mastitída, laminitída, ruminálna acidóza, ketóza, premiestnenie žalúdka^{1–3}.

Epitel bachora na jednej strane reaguje proliferáciou, aby sa zabezpečila väčšia plocha na absorpciu živín⁴. Na strane druhej sa bunky epitelu funkčne prispôbia takým spôsobom, že ich povrch sa vybaví viacerými transportnými proteínmi. Absorpčné štúdie (technika ussingovej komory; metóda umytého bachora) preukázali toto funkčné prispôsobenie sa zosilnenou absorpciou živín a minerálnych látok (Na^+ , Mg^{2+})⁵.

Stúpajúci výkon jednotlivých buniek je možné spúšťať génovou expresiou enzýmov a transportných proteínov

epitelu bachora. Pri tom nastáva na úrovni transkripcie zmena v počte kópii mRNA určitých génov, stúpajúcou produkciou mRNA alebo zvýšeným odbúraním/zníženou produkciou. Ďalšia možná zmena je aj na úrovni translácie pri gébovej expresii. Tieto formy adaptácie sa označujú ako „long-term regulation“ (dlhodobá regulácia). Ďalej je možné, že už existujúce proteíny sú dodatočne aktivované/deaktivované enzýmami alebo regulačnými faktormi (napr. fosforylácia/defosforylácia). Ďalšou stratégiou je fúzovanie bunkovej membrány a vezikul z bunkového vnútra, ktoré ponúkajú intracelulárny rezervoár pre transportné proteíny (nastane exocytóza resp. „vesicle trafficking“). Oba tieto mechanizmy môžu rýchlejšie pôsobiť na bunkové mechanizmy a sú charakterizované pojmom „long-term regulation“. Zmena množstva kópii mRNA sa dá relatívne ľahko zistiť a ponúka možnosť preskúmania adaptačných mechanizmov epitelu bachora.

V nasledujúcich častiach budú charakterizované dôležité transportné proteíny a enzýmy buniek epitelu bachora vo svojich funkciách, ich biochemické vlastnosti, výskyt a regulácia.

2. Sodíkovo-protónový výmenník

Všetky známe sodíkovo-protónové výmenníky (NHE) transportujú 1 Na^+ do bunky, 1 H^+ z bunky⁶. NHE majú pre bunku niekoľko dôležitých vlastností. Homeostáza intracelulárneho pH, regulácia objemu bunky a transportu Na^+ (cit.⁷).

Doteraz bolo objavených 9 izoformiem NHE. Regulačné vlastnosti sú preskúmané u NHE1-4. NHE1-5 majú na 30–60 % rovnakú sekvenciu aminokyselín (AMK) (molekulová hmotnosť 81–93 kDa)⁸. NHE6 sa zhoduje s ostatnými izoformami iba na 20 % (cit.⁸). NHE7-9 sú štruktúrne divergentné a s NHE1-6 sa zhodujú na 23–27 % (cit.⁹). O NHE8 je známe, že môže transportovať K^+ oproti H^+ .

NHE1 je ubikvitný a bazolaterálny, aktivujú ho rastové faktory, proteínkinázy, cAMP. Inhibuje ho nedostatok ATP a amilorid. NHE2 je lokalizovaný v žalúdku, maternici, obličkách, pečeni a je apikálny. NHE3 je apikálny. V obličkách a svalstve ho aktivujú rastové faktory, glukokortikoidy, acidóza. NHE4 je aktivovaný hyperosmolaritou a inhibovaný nedostatkom ATP. Možno ho nájsť vo svaloch, obličkách, mozgu, žalúdočno-črevnom trakte a maternici¹⁰.

Primárna štruktúra NHE vykazuje dlhé N-konce (500 AMK). Tie začínajú v extracelulárnom priestore a 10 až 12krát prevyšujú bunkovú membránu (transmembránové segmenty (=TM). Hydrofilné C-konce (300 AMK) sú na cytozolickej strane¹⁰. TM6 a 7 sú najviac konzervatívne regióny medzi izoformami. Pravdepodobne kvôli existen-

cii homodiméru v bunkovej membráne¹⁰. Aktivita NHE je ovplyvnená viacerými signálmi. Napr. neurotransmitermi, rastovými faktormi, peptidickými hormónmi, cAMP, chemotaktickými podnetmi, osmotickými pomermi, hodnotami pH, glukokortikoidmi a hormónmi štítnej žľazy¹¹.

3. Sodíkovo-protónový výmenník regulačný faktor

Sodíkovo-protónový výmenník regulačný faktor (NHERF) má PDZ doména proteínu. PDZ doména je časť proteínu, ktorá môže reagovať s ostatnými proteínmi. Sú to PSD-95 (Post-Synaptic density-Protein, 95 kDa), DLG (Disc large Protein z *Drosophila melanogaster*) a ZO-1 (Zonula occludens 1 Protein)¹². PDZ domény sú relatívne malé (90 AMK) a skladajú sa zo 6 β -skladaných listov (β A- β F) a 2 α -helixov (α A a α B). Peptidické ligandy sa viažu do „žľabu“ medzi β B a α B špeciálnym mechanizmom¹². NHERF1 bol nájdený v renálnych epiteliových bunkách inhibíciou NHE3 prostredníctvom cAMP. O niečo neskôr bol identifikovaný NHE3 kináza A regulačný proteín (H3KARP, neskôr premenovaný na NHERF2)¹³. Oba NHERF majú dve PDZ domény. NHERF1 na základe svojich vlastností interaguje s proteínmi viažucich sa na cytoskelet bunky (proteíny z rodiny ecrínov, radixínov a moezínov). NHERF1 sa nazýva aj EBP50 (ercín-viažuci proteín, 50 kDa)¹⁴.

NHERF tvorí multiproteínový komplex. Pri tom sa viaže ercín cez PDZ II doménu NHERF s C-koncom NHE3. Ercín potom vytvára opäť väzbu s cytoskeletom (aktín). Ercín poskytuje okrem proteínkinázy A aj ukotvenie. ERM doména (doména viažuca ercín, radixín, moezín) z NHERF je zodpovedná za cAMP závislú fosforyláciu¹⁵. Naproti tomu, po pridaní β_2 -adrenergického agonistu nastáva stimulácia NHE3.

NHERF1 a 2 nie sú zodpovedné len za reguláciu NHE3. Prostredníctvom PDZ I a II tvoria väzby s mnohými inými iónovými transportérmi, signálnymi proteínmi a transkripčnými faktormi (medzi inými CFRT – cystic fibrosis transmembrane conductance regulator, HATPáza, TRP4 a 6)¹⁶. Okrem obličiek boli dokázané NHERF1 a 2 aj v retinálnom pigmentovom epiteli¹⁷, tenkom čreve¹⁸, kochleji (slimák v uchu človeka)¹⁹, mozgu²⁰, placenty²¹, endometriu (izolačná vrstva maternice)²².

Génová expresia NHERF1 bola pozorovaná v OK bunkách, inkubáciou so sérom alebo cAMP počas 6 a 24 hodín (cit.²³). Úroveň RNA po 24 hodinách inkubácie s cAMP sa menila v protiklade s výskytom proteínu v cytozole a nespájala sa s membránou. Výskyt proteínu bol redukovaný približne o 45 %. Pri inkubácii so sérom klesla hladina mRNA a aj výskyt cytozolických a membránových proteínových frakcií pre NHERF1.

4. Uhličitanový výmenník

K uhličitanovému výmenníku (NBC/AE) sa radia dve rodiny génov, SLC4 (solute carrier) a SLC26.

Génová rodina SLC4: Proteíny génovej rodiny SLC4 majú 10–14 transmembránových segmentov, jednu dlhšiu hydrofilnú doménu s N-koncom a jednu kratšiu hydrofilnú doménu s C-koncom. Oba konce sa nachádzajú v intracelulárnom priestore²⁴. Mout a Romero uvádzajú vo svojej štúdií gény typu SLC4 a ich tkanivovú distribúciu²⁵.

V tejto génovej rodine sú obsiahnuté tri $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ výmenníky (AE1 – 3) a päť $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ výmenníkov (NBCe1, NBCe2, NBCn1, NDCBE, NCBE). U NBCe1 a NBCe2 je transport elektrogénny (e – elektrogénny), ostatné transporty idú elektroneutrálne (n – elektroneutrálne). Väčšina z tejto génovej rodiny je inhibovaná DIDS (cit.²⁴). Ich úlohy sú rôzne. V erythrocytoch sa prostredníctvom $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ výmenníka starajú o prenos CO_2 z kapilár tkaniva do kapilár pľúc, umožňujú sekréciu alebo resorpciu kyslých a zásaditých látok v mnohých epiteliach (napr. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ resorpcia v obličkách, sekrécia HCl v žalúdku, $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ sekrécia v pankrease) a rozhodujúco určujú resorpciu NaCl v niektorých epiteliach (napr. v ileu a proximálnej časti hrubého čreva). Okrem regulácie objemu bunky, regulujú intracelulárne pH (cit.²⁴).

Génová rodina SLC26: C- a N-konce domény ležia mimo bunky a prevyšujú bunkovú membránu 10 až 14krát. Na C-konci má všetkých 10 SLC26 proteínov sulfátový transportér a anti-sigma doménu (STAS). Táto doména obsahuje variabilnú slučku (0–150 AMK) štruktúry β -skladaného listu a následne, po vsunutom α -helixe, slučku s nemeniacou sa sekvenciou²⁵. Mout a Romero uvádzajú vo svojej štúdií gény typu SLC26 a ich tkanivovú distribúciu²⁵.

5. Sodno-uhličitanový kotransportér

4 kotransportéry, NBC1 (NBCe1, SLC4A4), NBC2 (NBCn1, SLC4A7), NBC3 (kNBC3, SLC4A8), NBC4 (NBCe2, SLC4A5) a 2 NBC-príbuzné proteíny AE4 a NCBE sprostredkujú okrem AE4 kotransport 1 Na^+ a 3 HCO_3^- (cit.²⁶). NBC sú inhibované prídavkom DIDS, karboanhydrázy (acetazolamid) a cAMP/proteínkinázy A (PKA) a stimulované proteínkinázou C. Pre inhibíciu cAMP/PKA sa vyžaduje NHERF (cit.²⁶). Pravdepodobne cAMP mení stechiometriu transportu – 1 Na^+ a 2 HCO_3^- .

Pre NBC1 sa predpokladá ako pri AE1, že vzniká väzba medzi C-koncom transportéra a CA2 (cit.²⁶). NBC2 je rezistentný k inhibícii s DIDS, nie však k amiloridu a jeho analógom. Pri inkubácii subletálnej acidózy v bunkách mIMCD bola zistená o 90 % znížená regulácia, u NBC3 o 7násobne vyššia regulácia²⁷.

V bachore bola nájdená izoforma NBC, ktorá sa zhoduje s ľudským renálnym NBC na 62 %, na 66 % s renálnym NBC potkanov a na 65 % duodenálnym NBC myši²⁸.

6. Aniónový výmenník

Aniónový výmenník AE1 kóduje dlhší erytroidný AE1 (eAE1) a kratší renálny bazolaterálny AE1 (kAE1, k = kidney – oblička), AE1 a AE2 sú diméry²⁹.

Intra- a extracelulárne H⁺ inhibujú AE2, ktorý sprostredkováva výmenu Cl⁻ od seba nezávislým mechanizmom. Naproti tomu nastáva aktivácia AE2 prostredníctvom hypertónie a amoniaku²⁹.

AE1 v obličkách pri akútnej, chronicko-metabolickej a respiračnej acidóze zvýši reguláciu a pri akútnej alkalóze zníži reguláciu³⁰. V hrubom čreve je nedostatok Na⁺ zodpovedný za zníženú a aldosteron za zvýšenú reguláciu^{30,31}.

Nízka hladina mRNA pre AE2 a v zbernej rúre (*Tubulus renalis colligens*) zajacov sa objaví po pridaní tyroxínu. Metabolická alkalóza pôsobí opačne (priemerný vzrast –3,7násobne). U AE2 a 3 bola pozorovaná znížená regulácia (AE2, tenké črevo, pri odvykaní na materské mlieko; AE3, srdce, postnatálny)³⁰.

Bolo zistené, že prídavok DIDS (inhibitor rôznych HCO₃⁻ výmenných systémov) nemal vplyv na reguláciu AE na epiteli predžalúdka pri rôznych hodnotách pH (cit.³²).

7. Vakuolárna protónová ATPáza

Vakuolárna protónová ATPáza (vHATPáza) môže transportovať H⁺ prostredníctvom energie z hydrolytického štiepenia ATP aj proti silnému gradientu na bunkovej membráne. V lyzozómoch sa napríklad vyžaduje nízka hodnota pH, aby sa aktivoval enzým na hydrolyzu³³.

Iónová pumpa pozostáva z komplexu rôznych jednotiek a má dve funkčne odlišné domény. Extracelulárna, katalyzujúca doména V1, na ktorej sa hydrolyzuje ATP, a transmembránová protónovo-translokačná doména V0, ktorá vykonáva jednoduchý transport H⁺.

V1 doména sa delí na 8 podjednotiek (polypeptidov). Podjednotka A (VMA1), podjednotka B (VMA2), podjednotka C (VMA5), podjednotka D (VMA8), podjednotka E (VMA4), podjednotka F (VMA7), podjednotka G (VMA10), podjednotka H (VMA13).

V0 doména sa delí na nasledujúce podjednotky. Podjednotka a (VPH1), podjednotka b (VMA3), podjednotka c (VMA3), podjednotka c' (VMA11), podjednotka c" (VMA16), podjednotka d (VMA6)³⁴.

Okrem toho je možné identifikovať aj izoformu STV1 (100 kDa) a „montážne faktory“ VMA12 (25 kDa), VMA21 (8,5 kDa), VMA22 (21 kDa). Tieto faktory spájajú podjednotky³⁴.

Podjednotka B má dve izoformy, I a II. Niekedy je možné sa stretnúť s označením typ B1 (obličková forma) a typ B2 (mozgová forma)³⁵.

V rámci rôznych bunkových funkcií bola zistená účasť vHATPázy, okrem iného, na endocytóze a odbúravaní proteínov, transportných procesoch sprostredkovaných receptormi aj intracelulárne, na regulácii intracelulárneho pH, ako aj na udržiavaní transmembráno-

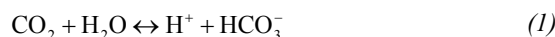
vého elektrického gradientu³⁶. Predpokladaná stechiometria je 2 H⁺ : 1 ATP (cit.³³).

Bolo objavených viacero proteínov, ktoré majú aktívny resp. inhibičný účinok na vHATPázu³⁷. Taktiež bola pozorovaná aktivácia proteínkinázou C a jej agonistami³⁸.

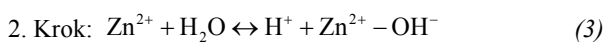
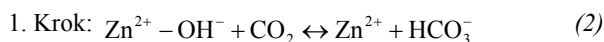
Metabolický inhibitor má efekt na substitúciu glukózy za 2-deoxyglukózu a/alebo aplikáciu inhibítora antimycínu A na bunky ovčích buniek epitelu bachora. Metabolický inhibitor silne redukoval pH omnoho zreteľnejšie než antimycín A. Ešte menší pokles zaznamenali prídavkom folio-mycínu, špecifického inhibítora vHATPázy (cit.³⁹).

8. Karboanhydráza

Karboanhydrázy (CA) sú Zn-metaloenzýmy a katalyzujú nasledujúcu reakciu:



Táto reakcia sa uskutočňuje v dvoch krokoch na aktívnom centre karboanhydrázy. Atóm zinku sa tetraedricky koordinuje tromi imidazolovými skupinami z molekúl histidínu a jedným OH⁻. V prvom kroku reaguje OH⁻ s CO₂ a vzniknutý HCO₃⁻ sa vymení s molekulou vody, a tým sa uvoľní. V druhom kroku sa štiepi H⁺, čím sa CA regeneruje.



Doteraz známe CA sa delia do troch tried. Trieda alfa sa vyskytuje v cicavcoch⁴⁰ a skladá sa z 11 enzymaticky aktívnych izozýmov a 3 inaktívnych homologických proteínov⁴¹, ktoré existujú ako monoméry. V triede beta sú diméry, tetraméry, hexaméry a oktaméry v rastlinách a riasach. Gama trieda pozostáva z trimérov a jediný známy zástupca je archeon *Methanosarcina thermophila*. Existuje aj delta trieda⁴⁰. V roku 1997 bola nájdená monomérna karboanhydráza TWCA1 v morskej rozsievke (*Thalassiosira weissflogii*).

Úlohy karboanhydrázy sú homeostáza báz a kyselín, podpora výmeny CO₂ v obličkách, erytrocytoch a pľúcach a pravdepodobne podpora syntézy mastných kyselín a aminokyselín⁴². CA existuje v sliznici predžalúdka prežúvavcov. V roku 1989 boli nájdené v epiteli bachora izozýmy CA1, 2 a 3, a to vo všetkých vrstvách s výnimkou *stratum corneum*⁴³.

Regulácia CA1–3 bola pozorovaná pri rôznych experimentálnych podmienkach. Predpokladá sa, že CA3 má vplyv na reguláciu v tukových bunkách potkanov. V 3T3 línii tukových buniek klesli koncentrácie CA3 po pridaní inzulínu, CA2 a 3 po kultivácii pri nízkych hodnotách pH o 50–90 % (cit.⁴⁴).

CA3 v kostrovom svalstve chráni bunky pri nadexpresii 3T3 buniek pred voľnými radikálmi a pred zvýšenou rýchlosťou apoptózy. Naproti tomu CA2 nevykazuje ochrannú funkciu buniek pri pôsobení peroxidom vodíka⁴⁵.

Pri experimentálnej kolitíde bola zistená zvýšená regulácia CA1 v aproximálnom hrubom čreve v regeneračnej fáze, pričom v prvých dňoch choroby klesala⁴⁶.

Schwartz skúmal expresiu izozýmov CA2 a 4 pri experimentálne indukovanej chronickej metabolickej acidóze (CMA) v obličkách potkanov použitím metód northern a southern blot. Na renálnom cortexe zistil zvýšenú hladinu mRNA z CA2 (cit.^{47,48}). Taktiež bolo pozorované aj zvýšenie hladiny mRNA z CA4 pri CMA v cortexe a dreni obličiek⁴⁸.

9. Acetyl-CoA syntetáza

Aby bol acetát sodný použiteľný pre bunku, musí byť najprv aktivovaný. To sa stane pri spojení s koenzýmom A (CoA) pomocou acetyl-CoA syntetázy (ASC). Vznikajúci acetyl-CoA sa môže využiť buď pre biosyntézu mastnej kyseliny, alebo sa využije v citrátovom cykle.

V eukaryotoch to beží v dvoch krokoch cez medziprodukt acetyl-AMP. Enzým viaže najskôr ATP, potom acetát. V prvom kroku sa acetylový zvyšok pri štiepení s ATP viaže s AMP, pričom sa uvoľňuje pyrofosfát. V druhom kroku sa AMP nahradí CoA (cit.⁴⁹).

Enzým má veľkosť 70 kDa, väčšiu (N-koniec) doménu (<500 AMK) a menšiu (C-koniec) doménu (cca 110 AMK). Aktívne centrum sa nachádza medzi doménami. Podľa toho, čo sa viaže na aktívne miesto, mení sa C-koniec domény⁴⁹. Ac-CoA syntetáza z izolovaného tkaniva kráv je glykoproteín. Eukarioty majú dva izozýmy ACS1 (cytozolický) a ACS2 (mitochondrická matrica)^{50,51}.

Vysoká aktivita ACS bola pozorovaná v pečeni, mliečnej žľaze, obličkách a mozgu ošípanej. Menšia aktivita bola nameraná v mozgu, pľúcach a v kostrovom svalstve. Skúmanie subcelulárnych lokalizácií preukázalo nasledovné rozdelenie: v srdci a mliečnej žľaze sú dve tretiny enzýmov v cytoplazme a jedna tretina v mitochondriách. V pľúcach a pečeni sa najväčšia časť nachádza v mitochondriách. V obličkách to je 50 % v cytoplazme a 50 % v mitochondriách. Medzi oboma izozýmami nie sú rozdiely. Afinita enzýmu v epiteli bachora klesá v rade butyrát > propionát > acetát⁵².

V bachore boli nájdené dve Ac-CoA syntetázy s krátkym reťazcom. Jedna je schopná aktivovať acetát, propionát aj butyrát, druhá len butyrát ako substrát. Subcelulárna lokalizácia oboch syntetáz nie je známa⁵³.

V pečeni ošípanej je len malé množstvo ACS, naproti tomu veľké množstvo propionyl-, butyryl- a valeryl-CoA syntetáz⁵⁴. V pečeni potkanov stúpa aktivita izozýmu 1, ak sa zvýši prísun acetátu v dôsledku metabolizmu baktérii počas trávenia potravy⁴⁹. Aktivita sa zvyšuje aj nastavením diéty bohatej na sacharidy, ktoré podporujú syntézu mastných kyselín⁵⁵. Expresia ACS1 sa indukuje, ak hladina sterolu v bunkách klesá. Deje sa to v dôsledku SREBP

(sterol regulatory element-binding proteins)⁵⁶.

V kostrovom a srdcovom svalstve myši značne stúpa (6,5násobne v kostrovom a 2násobne v srdcovom svalstve) hladina mRNA ACS2 pod ketogénnymi podmienkami (pôst). Zároveň klesá o 50 % hladina mRNA ACS1 v kostrovom svalstve⁵¹.

Pre ACS je známy postranlačný regulačný systém v eukaryotoch označovaný ako Sir2 (sirtuin-dependent protein acetylation/deacetylation system – SDPADS)⁵⁷. Tento systém riadi aktivitu ACS acetyláciou alebo deacetyláciou na lyzínovom zvyšku č. 609. Existujú však špekulácie, či hrá úlohu hladina NAD⁺ v bunkách pri deacetylácii, a tým pre aktiváciu proteínu. Nízka hladina NAD⁺ signalizuje nízku energetickú hladinu bunky a vedie k poklesu aktivity ACS (cit.⁴⁹).

10. Monokarboxylátový transportér

Izofomy monokarboxylátového transportéru (MCT) patria do génovej rodiny SLC16 (cit.⁵⁸). Väčšina z nich pozostáva z 12 transmembránových domén α -helixovej štruktúry⁵⁹. Medzi TM6 a 7 sa nachádza veľká slučka s menej konzervatívnou sekvenciou a jej veľkosť sa pohybuje medzi 29 AMK v MCT4 a 105 AMK v MCT5. Slučka, N- a C-konce sú lokalizované v cytoplazme.

Existuje viacero transportných mechanizmov. V obličkách tiež vystupuje aj sodíkovo-monokarboxylátový symport. V najmenšej miere sa vyskytuje protónovo-monokarboxylátový symport⁶⁰ a v hrubom čreve aniónový výmenný mechanizmus⁶¹.

V bachore sobov bola dokázaná prítomnosť MCT1 a 4 (cit.⁶²). U teliat bola nájdená mRNA z MCT1 v predžalúdku, slepom čreve a aproximálnom distálnom hrubom čreve⁶³. U kôz bol MCT1 kvantifikovaný v celom intestinálnom trakte pomocou analýzy western blot⁶⁴. Epitel bachora oviec bol skúmaný pomocou špecifických antiteliesok pre MCT1. Kultivované bunky epitelu bachora, tak aj bunky *stratum basale* bachorovej sliznice vykazujú pozitívnu reakciu⁶⁵. Úlohou MCT1 je realizovať v epiteli bachora evakuáciu laktátu a ketolátok spolu s protónmi. Kirat dokázal na epiteli bachora kôz transport SCFA (acetátu a propionátu) cez MCT1 (cit.⁶⁴). Afinita transportéru k substrátu klesá v rade MCT2 > MCT1 > MCT4 (cit.⁶⁶).

Transkripčná regulácia MCT1 bola pozorovaná v GIT, mozgu, svalstve pod rôznymi experimentálnymi podmienkami. V kultivovaných ľudských bunkách hrubého čreva (AA/C1) sa zvýšila regulácia (5,2násobné množstvo mRNA) MCT1 v prostredí média obsahujúcom butyrát (2 mmol dm⁻³). Propionát a acetát nemali vplyv na reguláciu. Okrem toho sa zvýšila rýchlosť príjmu butyrátu 5násobne (cit.⁶⁷).

Množstvo mRNA voľne žijúcich sobov bolo porovnané s množstvom mRNA sobov žijúcich v zajatí. Množstvo z MCT1 v epiteli bachora voľne žijúcich sobov bolo väčšie. Vysvetľuje sa to príjmom lišajníkov, ktoré uvoľňujú veľké množstvá ľahko stráviteľných sacharidov. Expresia

sia MCT1 a CD147 v epiteli bachora mláďat sobov bola závislá od veku medzi 2. a 10. dňom života⁶².

Vlastnosti izoforiem 1,2 a 5 môžu byť dôležité pri regulácii. MCT1 má dĺžku 3'-UTR (untranslated region) 1,6 kilobáz, ktoré sa ohýbajú do slučky, čím sa vytvára priestor pre interakciu. Tu je možné naviazanie regulačného faktora viažuceho proteínu, ktoré zabráni translácii⁶⁸.

MCT1 a 4 sú asociované s proteínom CD147. Tento transmembránový glykoproteín bol dokázaný spolu s MCT1 v srdcových bunkách. MCT1 interaguje s CD147 cez arginínový zvyšok v TM8 MCT a zvyšok kyseliny glutámovej v transmembránovom segmente CD147 (cit.⁶⁹). CD147 môže mať vplyv na katalytickú aktivitu transportéru alebo regulovať translokáciu k membráne⁵⁹.

11. Sodno-draselná ATPáza

Na^+/K^+ ATPáza (NaKA) katalyzuje transport 3 Na^+ z bunky a 2 K^+ do bunky, za súčasného štiepenia ATP na ADP a P. Pozostáva z dvoch polypeptidov, katalytické α podjednotky a β podjednotky, glykoproteínu, ktorý sa nezúčastňuje priamo na katalýze⁷⁰. Podjednotka α je veľká 110 kDa, β 55 kDa. Podjednotka α tvorí v lipidovej dvojvrstve bunkovej membrány 10 transmembránových segmentov štruktúry α helixu. N- a C-konce ležia v cytoplazme⁷¹. TM podjednotky α ležia blízko seba a tvoria pravdepodobne akýsi kanál⁷⁰.

Polypeptidický reťazec β podjednotky má iba jeden TM. Krátky N-koniec vyčnieva do cytoplazmy. Extracelulárny C-koniec je dlhší, vybavený tromi sulfhydrylovými skupinami a tromi N-glykolyzačnými miestami. N-glykolyzačné miesta sú obsadené vetvenými sacharidmi a tvoria asi 1/3 hmotnosti β podjednotky. Obe podjednotky spolu interagujú, a to cez TM α podjednotky a TM9–10 β podjednotky⁷².

Okrem spomínaných dvoch podjednotiek bola objavená v obličkách ďalšia, γ podjednotka (7,4 kDa)⁷³. Reguluje senzitivitu NaKA pre kationy pri asociácii α a β podjednotky⁷⁴.

Množstvo NaKA molekúl sa v plazmatickej membráne mení v závislosti od tkaniva⁷⁰. Funkcia NaKA spočíva vo vyrovnávaní membránového potenciálu, a tým v regulácii objemu bunky. Činnosťou NaKA sa vytvára gradient Na^+ , ktorý sa využíva v mnohých bunkách v rôznych transportných systémoch (napr. $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{Cl}^-$ kotransport, $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ a Na^+/H^+ výmenníky; Na^+ kanály).

Doteraz boli objavené 4 izoformy α podjednotky⁷⁵ a 3 izoformy β podjednotky⁷⁶. Tie sa vyskytujú v rôznych tkanivách v rôznych kombináciách. Z nich vznikajúce izozymy majú rôzne kinetické vlastnosti.

Podjednotka $\alpha 1$ bola nájdená cez antitelieska v obličkách a v epiteli bachora ošípanej. V mozgu hovädzieho dobytku $\alpha 2$ a $\alpha 3$. Vlastnosti $\alpha 1$ v epiteli bachora doteraz nie sú známe⁷⁷.

Pre NaKA je známa rýchla regulácia fosforyláciou α podjednotky. Za to sú zodpovedné 4 formy proteinkináz

(PK). PK závislá na cAMP (PKA), PK závislá od cGMP (PKG), PK závislá od Ca-fosfolipidu (PKC) a tirozinkináza. Fosforylácia môže znamenať nárast, ale aj brzdenie aktivity podľa toho, ktorý izozým je fosforylovaný⁷⁰. Zníženie aktivity PKC a PKG je možné endocytózou fosforylovaných molekúl, aktivácia vniknutím nových molekúl NaKA do bunkovej membrány⁷⁸. Podjednotka β aktivuje NaKA prostredníctvom extracelulárneho draslíka⁷⁹. Ďalšie regulujúce endogénne proteíny sú ankyrin, melitín, a digitalis podobné faktory⁷⁰.

Pri regulácii NaKA v obličkách cez PTH (parathormón) je potrebný NHERF1 (cit.⁸⁰). PTH pôsobí pravdepodobne uvoľňovaním cAMP a PKA. McDonough sa domnieval na základe rôznych translabilít mRNA α a β podjednotiek, že β podjednotka NaKA na rozdiel od α tvorí prebytok, a tento prebytok je rýchlo degradovaný⁸¹. Toto bolo potvrdené na bunkách LLC-PK₁/Cl₄ (obličková bunková línia ošípanej)⁸². Po stimulácii buniek bol nameraný trojnásobný nadbytok β nad α podjednotkami, z ktorých 50 % bolo degradovaných v priebehu jednej hodiny. Tu NaKA transportuje sodík z bunky a draslík do bunky. Zvýšená regulácia sa prejavuje pri vyššej intracelulárnej koncentrácii Na^+ a/alebo pri nižšej intracelulárnej koncentrácii K^+ .

Vplyvom g-strofantínu (1 mmol dm⁻³) sa v epitelych bunkách obličiek zvyšovali koncentrácia Na^+ a hladina mRNA $\alpha 1$ a $\beta 1$ podjednotiek po troch hodinách 2,3 resp. 2,4 násobne u kontroly s maximom po 12 h (cit.⁸³).

12. Záver

V rôznych tkanivách sú známe pre-transportné proteíny AE2, MCT1, NBC, NHE1, NHE3, enzýmy CA, ACS2, iónové pumpy NaKA, vHATPázu, NHERF1 a rôzne regulačné mechanizmy. Zmena relatívneho počtu mRNA v epiteli bachora je závislá od stravy. Kombináciou metód ussingových komôr, PCR, merania pH a rádioizotopovej indikácie je možné zistiť dôležité transportné funkcie a mechanizmy epitelu bachora ruminentov⁸⁴. Získavanie takýchto informácií má veľký ochranný a ekonomický význam. Napríklad straty spôsobené subakútnou ruminálnou acidózou boli v roku 1999 odhadované na 1,12 \$ za deň na kravu.

LITERATÚRA

1. Nagaraja T. G., Chengappa M. M.: J. Anim. Sci. 76, 287 (1998).
2. Owens F. N., Secrist D. S., Hill, W. J., Gill, D. R.: J. Anim. Sci. 76, 275 (1998).
3. Rémond D., Meschy F., Boivin R.: Ann. Zootech. 45, 97 (1996).
4. Weiss B.: Berl. Münch. Tierärztl. Wochenschr. 107, 73 (1994).
5. Sehested J., Andersen J. B., Aaes O.: Acta. Agric. Scand. Sect. A. Animal. Sci. 50, 47 (2000).

6. Burckhardt G., Di Sole F., Helmle-Kolb C.: *J. Nephrol.* 15, S3 (2002).
7. Yang W., Shen Z., Martens H.: *J. Anim. Sci.* 90, 307 (2012).
8. Orłowski J., Grinstein S.: *Biol. Chem.* 272, 22373 (1997).
9. Nakamura N., Tanaka S., Teko Y.: *J. Biol. Chem.* 280, 1561 (2005).
10. Graham C., Gatherer I., Haslam I.: *Am. J. Physiol.* 292, R997 (2007).
11. Kandasamy R. A., Orłowski J.: *J. Biol. Chem.* 271, 10551 (1996).
12. Harris B. Z., Lim W. A.: *J. Cell. Sci.* 114, 3219 (2001).
13. Yun C. H., Oh S., Zizak M.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 3010 (1997).
14. Reczek D., Berryman M., Bretscher A.: *J. Cell. Biol.* 139, 169 (1997).
15. Weinman E. J., Cunningham R., Shenolikar S.: *Pflügers. Arch.* 450, 137 (2005).
16. Weinman E. J., Hall R. A., Friedman P. A.: *Annu. Rev. Physiol.* 68, 491 (2006).
17. Nawort M., West K., Huang J.: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 45, 393 (2004).
18. Morales F. C., Takahashi Y., Kreimann E. L.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 17705 (2004).
19. Kanjhan R., Hryciw D. H., Yun C. C.: *Cell. Tissue. Res.* 323, 53 (2006).
20. Paquet M., Kuwajima M., Yun C. C.: *J. Comp. Neurol.* 494, 752 (2006).
21. Pepe G. J., Burch M. G., Sibley C. P.: *Endocrinol.* 142, 3685 (2001).
22. Stemmer-Rachmaninow A. O., Wiederhold T., Nielsen G. P.: *Am. J. Pathol.* 158, 57 (2001).
23. Weinman E. J., Steplock D., Lamprecht G.: *Miner. Electrolyte. Metab.* 25, 135 (1995).
24. Romero M. F., Fulton C. M., Boron W. F.: *Pflügers. Arch.* 447, 495 (2004).
25. Mount D. B., Romero M. F.: *Pflügers. Arch.* 447, 710 (2004).
26. Soleimani M.: *J. Nephrol.* 15, S32 (2002).
27. Amlal H., Burnham C. E., Soleimani M.: *Am. J. Physiol.* 276, F903 (1999).
28. Hun K., Muller F., Honscha K. U.: *J. Comp. Physiol. B.* 173, 277 (2003).
29. Alper S. L.: *Exp. Physiol.* 91, 153 (2006).
30. Alper S. L., Darman R. B., Chernova M. N.: *J. Nephrol.* 15, S41 (2002).
31. Rajendran V. M., Binder H. J.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915, 15 (2000).
32. Bilk S. *Dissertation*. Veterinär-Physiologisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig, BRD, 2008.
33. Nakhoul N. L., Hamm L. L.: *J. Nephrol.* 15, S22 (2002).
34. Graham L. A., Powell B., Stevens T. H.: *J. Exp. Biol.* 203, 61 (2000).
35. Bernasconi P., Rausch T., Struve I.: *J. Biol. Chem.* 265, 17428 (1990).
36. Stevens T. H., Forgac M.: *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 13, 779 (1997).
37. Zhang K., Wang Z. Q., Gluck S.: *J. Biol. Chem.* 267, 14539 (1992).
38. Nanda A., Gukovskaya A., Tseng J.: *J. Biol. Chem.* 267, 22740 (1992).
39. Kuzinski J., Zitan R., Warnke-Gurdel CH.: *J. Biomed. Biotechnol.* 12, 525034 (2010).
40. Tripp B. C., Smith K., Ferry J. G.: *J. Biol. Chem.* 276, 48615 (2001).
41. Lehotonen J., Shen B., Vihinen M.: *J. Biol. Chem.* 279, 2719 (2004).
42. Sly W. S., Hu, P. Y.: *Annu. Rev. Biochem.* 64, 375 (1995).
43. Asari M., Sasaki K., Kano Y.: *Arch. Histol. Cytol.* 52, 337 (1989).
44. Lynch C. J., Hazen S. A., Horetsky R. L.: *Am. J. Physiol.* 265, C234 (1993).
45. Raisanen S. R., Lehenkari P., Tasanen M.: *Faseb. J.* 13, 513 (1999).
46. Renes I. B., Verburg M., Van Nispen D. J.: *Int. J. Colorectal. Dis.* 17, 317 (2002).
47. Schwartz G. J., Winkler C. A., Zavilowitz B. J.: *Am. J. Physiol.* 265, F764 (1993).
48. Tsuruoka S., Kittelberger A. M., Schwartz G. J.: *Am. J. Physiol.* 274, F259 (1998).
49. Starai V. J., Escalante-Semerena J. C.: *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2020 (2004).
50. Loikkanen I., Haghighi S., Vainio S.: *Mech. Dev.* 115, 139 (2002).
51. Fujino T., Kondo J., Ishikawa M.: *J. Biol. Chem.* 276, 11420 (2001).
52. Quraishi S., Cook R. M.: *J. Agric. Food. Chem.* 20, 91 (1972).
53. Scaife J. R., Tichivangana J. Z.: *Biochim. Biophys. Acta* 619, 445 (1980).
54. Ricks C. A., Cook R. M.: *J. Dairy. Sci.* 64, 2324 (1981).
55. Barth C., Sladek M., Decker K.: *Biochim. Biophys. Acta* 260, 1 (1972).
56. Ikeda Y., Yamamoto J., Okamura M.: *J. Biol. Chem.* 276, 34259 (2001).
57. Smith J. S., Brachmann C. B., Celic I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6658 (2000).
58. Halestrap A. P., Meredith D.: *Pflügers. Arch.* 447, 619 (2004).
59. Halestrap A. P., Price N. T.: *Biochem. J.* 343, 281 (1999).
60. Poole R. C., Halestrap A. P.: *Am. J. Physiol.* 264, C761 (1993).
61. Connor E. E., Li R. W., Baldwin R. L.: *Animal* 4, 993 (2010).
62. Koho N., Maijala V., Norberg H.: *Comp. Biochem. Physiol., Part A: Mol. Integr. Physiol.* 141, 29 (2005).
63. Kirat D., Inoue H., Iwano H.: *Res. Vet. Sci.* 79, 45 (2005).
64. Kirat D., Masouka J., Hayashi H.: *J. Physiol.* 576, 635

- (2006).
65. Müller F., Huber K., Pfannkuche H.: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver. Physiol.* **283**, G1139 (2002).
 66. Dimmer K. S., Friedrich B., Lang F.: *Biochem. J.* **350**, 219 (2002).
 67. Cuff M. A., Lambert D. W., Shirazi-Beechey S. P.: *J. Physiol.* **539**, 361 (2002).
 68. Miyamoto S., Chiorini J. A., Urcelay E.: *Biochem. J.* **315**, 791 (1996).
 69. Enerson B. E., Drewes L. R.: *J. Pharm. Sci.* **92**, 1531 (2003).
 70. Lopina O. D.: *Biochemistry (Mosc.)* **66**, 1122 (2001).
 71. Fambrough D. M., Lemas M. V., Hamrick M.: *Am. J. Physiol.* **266**, C579 (1994).
 72. Sarvazyan N. A., Modyanov N. N., Askari A.: *J. Biol. Chem.* **270**, 26528 (1995).
 73. Forbush B., Kaplan J. H., Hoffman J. F.: *Biochemistry* **17**, 3667 (1987).
 74. Arystarkhova E., Wetzell R. K., Asinovski N. K.: *J. Biol. Chem.* **274**, 33183 (1999).
 75. Blanco G., Melton R. J., Sanchez G.: *Biochemistry* **38**, 13661 (1999).
 76. Malik N., Canfield V. A., Beckers M. C.: *J. Biol. Chem.* **271**, 22754 (1996).
 77. Hansen O.: *Acta Physiol. Scand.* **163**, 201 (1998).
 78. Bertorello A. M., Komarova Y., Smith K.: *Mol. Biol. Cell* **14**, 1149 (2003).
 79. Jaisser F., Canessa C. M., Horisberger J. D.: *J. Biol. Chem.* **267**, 16895 (1992).
 80. Lederer E. D., Khundmiri S. J., Weinman E. J.: *J. Am. Soc. Nephrol.* **14**, 1711 (2003).
 81. McDonough A. A., Farley R. A.: *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* **2**, 725 (1993).
 82. Lescale-Matys L., Putnam D. S., McDonough A. A.: *Am. J. Physiol.* **264**, C583 (1993).
 83. Muto S., Nemoto J., Okada K.: *Kidney. Int.* **57**, 1617 (2000).
 84. Kuruc J.: *Rádiobiológia. OMEGA INFO. Bratislava* 2009.

M. Daňo, M. Galamboš, and O. Rosskopfová
(Department of Nuclear Chemistry, Comenius University, Bratislava): **Transport Proteins and Enzymes in Rumen Epithelia of Ruminants**

The rumen of ruminants is able to adapt to prevailing diet conditions. On the one hand, the rumen epithelium reacts by proliferation to provide for larger surface for nutrient absorption. On the other hand, the surface of epithelial cells contains a number of transport proteins. This review describes the functions of major transport proteins and enzymes of rumen epithelial cells, their biochemical properties, occurrence, and regulation of proteins.