

OTKA nyilvántartási szám: **F 049058**

Témavezető neve: **Dr. Burghardt Beáta**

Téma címe: **Transzcelluláris bikarbonát szekréció és intracelluláris pH reguláció polarizált epitheliális sejtekben**

A kutatás időtartama: **2005-2008**

A KUTATÁS EREDMÉNYEI

Hipotézis és a kutatómunka célja

A nyálmirigyeket és a hasnyálmirigyeket epitheliális sejtek alkotják. A mirigyek szerkezeti és funkcionális hasonlóságot mutatnak, jellemző az acináris és duktális epithel sejtek megléte. Mivel a sejtek polarizáltak, ezért beszélhetünk mind acináris, mind duktális sejtekben apikális és bazolaterális membránról, és a transzcelluláris transzportfolyamatokhoz szükséges apikális és /vagy bazolaterális membránban található ionpumpákról, ko-transzporterekről, antiporterekről és csatornákról.

A mirigyek bőséges folyadékot (nyál és hasnyál) és speciális intraorális, illetve gasztrointesztinális funkcióval rendelkező exokrin fehérjéket választanak el, melyek központi szerepet játszanak a szájüreg, illetve az emésztőtraktus normál működésének fenntartásában és védelmében. Nyálmirigyekben a Thaysen és munkatársai által megfogalmazott „kétlépcsős hipotézis” szerint termelődik a nyál. Az acinusokban izotóniás, plazma-szerű elsődleges nyál képződik, mely folyadék ionösszetétele a duktuszokon való áthaladás során hipotóniássá alakul, fokozott Na^+ és Cl^- ion visszaszívás, de minimális vízszekréció és abszorpció mellett. A nyálmirigyek népegészségügyi szempontból jelentős megbetegedése a nyálmirigyek **hypofunkciója (xerostomia)**, amely leggyakrabban **Sjögren syndroma** és **terápiás radioaktív besugárzást** követően a nyálmirigyek szekréciós zavarához és ezáltal csökkent mennyiségű nyáltermeléshez vezet. A hasnyálmirigy betegségeiben a mirigy exokrin funkciója változik meg, mely egyben a hasnyál mennyiségének és összetételének megváltozását is jelenti. **Cysticus fibrosisban** az aktív kloridion transzportjában kulcsfontosságú szerepet játszó fehérje (CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) mutációját, és ennek következtében a mirigyszekrécióban létrejövő kóros működést mutattak ki.

A nyál- és hasnyálmirigy rendellenességei az emésztési folyamat súlyos zavarához vezetnek. Abból a célból, hogy a kórfolyamatok eredetét megismerjük, meg kell ismernünk azokat a membrán transzport folyamatokat és az ezek szabályozásáért felelős neurohumorális szabályozó mechanizmusokat, melyek a humán külső elválasztású mirigyek folyadék- és elektrolit-szekréciójáért felelősek. Hipotézisünk szerint a folyadék és elektrolit-szekréció jobb megismerése a transepitheliális bikarbonát szekréció és pH_i reguláció kérdéskörének feltérképezésén keresztül vizsgálható a leginkább. Emberi szövetek kellő mennyiségben való gyűjtésének etikai nehézségei új modellrendszerek alkalmazását teszik szükségessé. Ezért olyan emberi és patkány nyálmirigy és emberi hasnyálmirigy adenokarcinómából származó sejtvonalakat kívánunk alkalmazni, melyek permeábilis membránon tenyésztve a natív szövetekre jellemző fenotípust alakítanak ki.

A programban a következő feladatokat tűztük ki és végeztük el:

1. *Összehasonlítottuk a transzcelluláris bikarbonát szekrécióban és az intracelluláris pH (pH_i) szabályozásában szerepet játszó ioncsatornák és transzporterek expressziós mintázatát és eloszlását jól definiált patkány nyálmirigy (Par-C10), emberi hasnyálmirigy (Capan-1) és emberi tüdő karcinómából származó sejtvonalban (Calu-3).*
2. *Fiziológiás testrendszerek segítségével azonosítottuk a transzcelluláris bikarbonát szekréció és pH_i reguláció folyamatában szerepet játszó transzportereket permeábilis membránokon tenyésztett polarizált sejtvonalakon.*
3. *Vizsgáltuk a transepitheliális víztranszportban kulcsszerepet játszó AQP vízcsatornák lokalizációját emberi hasnyálmirigyben.*

Elért eredmények, kidolgozott módszerek, eljárások

A program indításakor két közlemény megjelentetését terveztük. A „Közlemények” rovatban töltöttük fel 3 megjelent, 1 db elfogadott és 1 db elküldött cikkünket, összesen 14,94 impakt faktoral. Ezzel vállalásunkat jelentősen túlteljesítettük. **Bár a végzett munka alap kutatás, a megszerzett új információk közvetve alapot szolgáltathatnak azon nyál- és hasnyálmirigy rendellenességek jobb megismeréséhez, ahol a kórokok kialakulásáért a humán külső elválasztású mirigyek folyadék- és elektrolit-szekréciójáért felelős transzporterek és ioncsatornák megváltozott működése a felelős.**

Eredményeinket 6 pontba foglalva a következő lényeges megfigyeléseket tettük:

1. A transepitheliális bikarbonát transzport bazolaterális komponenseinek vizsgálata Capan-1 sejteken:

A pancreas duktális bikarbonát szekréció vizsgálatára állatkísérletes modellek állnak rendelkezésünkre. Kísérleteinkben ezen eredményeket felhasználva Capan-1 humán pancreas duktális eredetű adenokarcinoma sejtvonalon kívántuk azonosítani a transzportban szerepet játszó csatornákat. Reverz transzkriptáz-polimeráz láncreakcióval (RT-PCR) vizsgáltuk a transzporterek és receptorok mRNS expresszióját. PTFE membránra ültetett Capan-1 polarizált monolayeren az intracelluláris pH-t (pH_i) fluoreszcens indikátor (BCECF) hozzáadásával, mikrofluorometriás módszerrel mértük. A bikarbonát szekréciót a pH_i csökkenés kezdeti meredekségéből határoztuk meg, a bazolaterális bikarbonát utánpótlás szelektív gátlását követően.

RT-PCR vizsgálataink során pNBC1, NHE1, SLC26A6 és CFTR transzporterek valamint VPAC1, szekretin, P2Y1,2,4,6 receptorok mRNS expresszióját mutattuk ki mind humán pancreas szövetben, mind Capan-1 sejteken. Polarizált monolayeren vizsgálva a sejteket az NH_4Cl pulzussal kiváltott savterhelést követő pH kompenzáció H_2DIDS és EIPA bazolaterális adására szignifikánsan csökkent. A gátlószerek lúminális alkalmazása a pH_i kompenzációt szignifikánsan nem befolyásolta. Szekretin és VIP bazolaterális, valamint ATP és UTP lúminális alkalmazása a bazolaterális NBC és NHE egyidejű gátlása mellett a kontrollhoz képest az pH_i csökkenését szignifikáns módon fokozta, míg ATP és UTP bazolaterális alkalmazása csökkentette azt. Vizsgálataink bizonyítják, hogy az NBC és NHE mind humán pancreas szövetben, mind Capan-1 sejteken jelen vannak. Capan-1 sejteken a bazolaterális membránban lokalizálódnak és a bazolaterális oldalról az apikális oldalra történő vektorialis szekréció során bikarbonát utánpótlás legfontosabb forrását jelentik. Kimutattuk továbbá, hogy az irányított bikarbonát szekréció serkenthető szekretinnel és VIP-val,

ATP/UTP adása pedig az alkalmazás helyétől függően serkenti, illetve gátolja a bikarbonát szekrécióját.

2. Az SLC26A6 anion kicserélő aktivitásának vizsgálata Calu-3 tüdő karcinómából származó epitheliális sejtekben:

A CFTR Cl⁻-csatorna direkt sejtközötti kapcsolatokon keresztül aktiválja az SLC26 család anion kicserélőit. Ez a megfigyelés fontos szerepet játszhat a sejtek HCO₃⁻ szekréciójában cisztikus fibrózisos betegeknél. A Calu-3 sejtvonal, amely emberi légutak submucosalis mirigyéből származik, egy jó modell a CFTR-függő HCO₃⁻ transzport vizsgálatára. Célunk, hogy jellemezzük ezekben a sejtekben az apikális oldalon megtalálható anion kicserélőket, illetve az intracellulárisan megemelkedett cAMP hatását a kicserélők aktivitására.

A Calu-3 sejtekből konfluens tenyészetet hoztunk létre Transwell poliészter membránokon, és pH-érzékeny BCECF-AM festékkel töltöttük fel őket. A filtereket HCO₃⁻ puffertelt oldattal perfundáltattuk és 37°C-on temperáltuk egy inverz fluoreszcens mikroszkóp munkaasztalán. Az intracelluláris pH-t (pH_i) standard mikrofluorometriás technikával rögzítettük. A Cl⁻ ionok glukonáttal való helyettesítése a bazolaterális oldalon a Calu-3 sejtek pH_i emelkedését okozta, az értéke 0,28±0,04-nek (átlag±SEM, n=4, P<0,01 páros t teszttel) adódott. Ez a hatás elmaradt, ha a sejteket 0.1 mM DIDS-cel előkezeltük, igazolva a korábbi megfigyeléseket, mely szerint AE2 expresszálódik a sejtek bazolaterális oldalán. A Cl⁻ ionok elvétele az apikális oldalról nem eredményezett pH_i változást a stimulálatlan sejtekben, ám 10 mM forskolin stimuláció esetén egy nagymértékű, gyors pH_i emelkedést észleltünk (0,60±0,03 (n=4, P<0,001)) a sejtekben. Ezt a pH változást 1 mM DIDS sem volt képes csökkenteni. A pH-visszatérés a kezelés után I⁻ vagy formát ionokkal mimikálható volt, ám nem jött létre a Cl⁻ ionok SO₄²⁻ vagy oxalát ionokkal való helyettesítésekor. RT-PCR segítségével kimutattuk számos SLC26 családtag mRNS expresszióját Calu-3 sejteken. Ezek közül is a pendrint (SLC26A4), amely a többi tagtól eltérően nem képes kétértékű anionok transzportjára, és viszonylag rezisztens DIDS-re. Ezért valószínűleg pendrin működik anion kicserélőként a Calu-3 sejtek apikális membránjában, és aktivitását a cAMP serkenti, feltehetően a CFTR-en keresztül.

3. A transzepitheliális víztranszportban kulcsszerepet játszó AQP vízcsatornák lokalizációját célzó vizsgálatok:

Az epitheliális mirigyekre jelentős folyadék elválasztás is jellemző. Az aktívan transzportálódó ionok gyors követésére egy speciális vízcsatorna rendszer, az aquaporinok (AQP) szolgálnak. Az AQP8 vízcsatorna, amit eredetileg egér pancreasból klónoztak, az acinusok apikális membránján expresszálódik, s elsősorban a sejtek ozmoregulációjában játszik szerepet. Az acinusok szerepe ugyanakkor a vízszekrécióban erősen korlátozott. A folyadék döntő többségét a pancreas tömegének csak igen kis részét adó ductusok választják el. Emberi hasnyálmirigyben ennek fő helye az interkaláris ductusok területe, ahol az epitheliális sejtek apikális AQP1-et és AQP5-öt, míg a bazolaterális oldalon csak AQP1-et expresszálnak. Eredményeink szerint, patkányban és egérben, ahol a folyadékszékreció elsődleges területe az intralobuláris ductusok AQP1 és AQP5 ugyancsak együtt fordul elő az apikális membránban, azonban relative alacsony expressziós szinten. Azonban a patkány transzepitheliális ozmotikus permeabilitása mégis elegendő a közel izoozmotikus folyadék-elválasztás eléréséhez. Kimutattuk továbbá, hogy az apikális oldalon Hg²⁺-t alkalmazva a patkány transzepitheliális ozmotikus permeabilitása szignifikánsan csökken. Ez arra utal, hogy az apikális AQP1 és AQP5 jelentős szerepet játszik a folyadéktranszport

bonyolításában. AQP1 génkiütött egerekben a normál vízelválasztás az apikálisan elhelyezkedő AQP5 fontos szerepét bizonyítja.

4. SMIE sejtek vizsgálata:

A SMIE patkány szubmandibuláris, nyálmirigy eredetű acináris sejtvonal. Megvizsgáltuk, hogy a SMIE sejtvonal alkalmas-e a vektoriális transzportfolyamatok modellezésére. Amíg ammónium pulzusos savterhelés után gátlószer nélkül a sejtek gyorsan kompenzálnak, vagyis az egyensúlyi pH elérésére törekednek, addig gátlószerek, mint pl. amilorid adása vagy Na^+ megvonás ezt a folyamatot jelentősen, de reverzibilisen gátolja. Ez a jelenség a sejtmembránban elhelyezkedő NHE aktivitásra utal, ugyanakkor a sejtek membránjában nem található DIDS érzékeny transzporter, ami az NBC hiányára utal. Sem alapkörülmények között, sem szekréciót fokozó szerek (ATP, forskolin) hatására nem észleltünk jelentős intracelluláris pH esést, ha bazolaterálisan megakadályoztuk a bikarbonát ionok utánpótlását, ezért következtetésünk, hogy a sejtvonal képtelen a transzcelluláris bikarbonát transzportra. A SMIE sejtvonal nehezen kezelhető és fenntartható, Transwell membránok közül csak a kollagénmentesen képes nőni. Emellett a sejtek nem alakítanak ki folyamatos, összefüggő monolayer, a transzepitheliális rezisztencia növekedése esetleges, ezért ezek a sejtek rövidzárlati áram mérésére és így a transzepitheliális elektrolittranszport modellezésére sem alkalmasak.

5. A transzepitheliális bikarbonát transzport bazolaterális komponenseinek vizsgálata ParC-10 sejteken: (Módosításokkal elfogadott kézirat mellékelve)

A nyálmirigyek fontos feladata egy puffer-oldat szekretálása, melyben a HCO_3^- koncentrációja kb. 60 mM. Ezt a koncentrációt főként a nyálmirigyek acinusai hozzák létre. Mivel alkalmas humán sejtvonal nem áll rendelkezésre, ezért a Par-C10 acináris eredetű, immortalizált patkány gl. parotis sejtvonalat vizsgáltuk, képes-e transzcelluláris anion-, illetve HCO_3^- szekrécióra, és ezáltal a nyálmirigyek szekréciójának modellezésére. A sejteket Transwell-Clear poliészter membránokra ültettük ki, ahol zárt, polarizált epitheliumot alkotnak. Ennek időbeli lefolyását a transzepitheliális ellenállás (TER) mérésével követtük nyomon. A fő transzporterek mRNS expresszióját RT-PCR segítségével, míg az anionszekréciót jellemző rövidzárlati áram (I_{sc}) mérését Ussing kamrában vizsgáltuk. A BCECF-AM fluoreszcens indikátorral előzetesen feltöltött sejtek intracelluláris pH (pH_i) változását mikrofluorometriás módszerrel mértük.

Kimutattuk, hogy a Par-C10 sejtvonalon kifejeződnek az NHE1, NHE2, NHE3 és NKCC transzporterek mRNS-ei, illetve az NBC1 és a CFTR csatorna mRNS-ei. Transwell membránon tenyésztve a sejtek magas TER értéket értek el, a kezdeti $130 \pm 12 \Omega\text{cm}^2$ értékekhez képest az 5. napon $2530 \pm 153 \Omega\text{cm}^2$ ellenállást regisztráltunk. HCO_3^- -mentes környezetben a forskolin (cAMP-szint emelő ágens) kisebb mértékben képes volt fokozni a rövidzárlati áram értékét, mint HCO_3^- jelenlétében. A bazolaterálisan alkalmazott bumetanid (a $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ kontranzporter, NKCC gátlószere) a forskolin hatását csak HCO_3^- -mentes környezetben gátolta. Az ATP HCO_3^- jelenlétében ugyancsak fokozta a Par-C10 sejtek anionszekrécióját. Mikrofluorometriás módszerrel kimutattuk, hogy az apikális oldalon nincs transzporter, amely az acidózist kompenzálná. Ezzel szemben a bazolaterális oldalon a kompenzáció mind HCO_3^- -mentes, mind HCO_3^- -t tartalmazó közegben Na^+ -függő módon megy végbe. A kompenzációt HCO_3^- -mentes oldatban az 5-(N-etil-N-izopropil)-amilorid (EIPA, Na^+/H^+ kicserélő, NHE gátlószere) gátolta, HCO_3^- -t tartalmazó oldatban EIPA és 4,4'-diizotiocianát-dihidrostilbén-2,2'-diszulfonát (H_2DIDS , $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ kotranszporter, NBC gátlószere) együttes alkalmazása szükséges a savterhelés kompenzálásának gátlásához.

Anion-kicserélőket a sejtek mindkét oldalán sikerült kimutatnunk Cl^- -mentes, de HCO_3^- -t tartalmazó oldat alkalmazásával. A bazolaterális oldalon a kicserélő stimulálatlan körülmények között is aktív; forskolin nem, de ATP serkenti a működését. Az apikális oldali anion-kicserélő csak serkentett körülmények között észlelhető, mely forskolin és ATP hatására is aktiválódik. A bazolaterális oldali anion kicserélő működését 1 mM DIDS vagy 3 mM DNDS gátolja. A HCO_3^- szekrécióját indirekt módon vizsgáltuk: az H_2DIDS és EIPA szimultán adásával meggátoltuk a sejtek HCO_3^- felvételét, illetve H^+ kipumpálását. Eredményeink szerint a két gátlószer alkalmazása a pH_i esését eredményezte. Ez a hatás ATP és forskolin előkezeléssel is serkenthető volt. A forskolin hatását apikálisan adott CFTR-inhibitor-172 (CFTR gátlószer) gátolta, míg a bazolaterálisan adott inhibitor nem volt rá hatással. Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a Par-C10 sejtvonal polarizált monolayert alkot Transwell-CLEAR membránon, és magas ellenállás értéket ér el. A sejtvonalban bazolaterális oldalon $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ kotranszporter, Na^+/H^+ kicserélő és $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ kotranszporter működik. A sejtek anion-, és ezen belül a HCO_3^- -szekréciója Ca^{2+} - és cAMP-útvonalon keresztül is serkenthető. A HCO_3^- ionokat a sejt bazolaterális oldalon veszi fel és apikális oldalon szekretálja, tehát a transzport vektorális. Anion kicserélők működnek a sejt mindkét oldalán. A bazolaterális, konstitutívan működő anion kicserélő DNDS-sel gátolható, ATP-vel serkenthető, míg az apikális oldalon egy stimulálatlan körülmények között nem, de forskolin vagy ATP hatására bekapcsoló anion kicserélő működik. A Par-C10 patkány eredetű parotisz sejtvonal jól differenciált, alkalmas modellnek bizonyult a nyálmirigyek anion szekréciójának vizsgálatához.

6. A transepitheliális bikarbonát transzport bazolaterális komponenseinek vizsgálata HPAF sejteken:

Korábban kimutatták, hogy az HPAF egy olyan duktális eredetű hasnyálmirigy adenokarcinóma sejtvonal, mely nem rendelkezik funkcionális CFTR csatornával és Ca^{2+} -tól függő módon Cl^- iont képes szekretálni. A mi célunk az volt, hogy kimutassuk, hogy a Cl^- ionok mellett az HPAF sejtek képesek-e HCO_3^- ionok szekréciójára is.

Az HPAF sejtek polarizált monolayert alkotnak Transwell-Clear membránokra kiültetve. Ussing-kamra segítségével mértük az anionszekréciót jellemző rövidzárlati áram (I_{sc}) értékét. Mikrofluorometriás módszerrel a BCECF-AM fluoreszcens indikátorral előzetesen feltöltött sejtek intracelluláris pH (pH_i) változását regisztráltuk.

Kimutattuk, hogy HCO_3^- -mentes környezetben az ATP, mint Ca^{2+} -szint emelő ágens, hatását a bazolaterálisan adott bumetanid (amely az NKCC gátlószer) gátolni képes, míg HCO_3^- iont is tartalmazó közegben ez a gátlás elmarad rövidzárlati árammérés során. Az intracelluláris pH mérés során kimutattuk, hogy HCO_3^- -mentes oldatban az acidózisból való visszatérés mind bazolaterális, mind apikális oldalon függ a Na^+ -tól, és azt az EIPA, az NHE gátlószer (5-(N-etil-N-izopropil-amilorid) gátolja. Ugyancsak sikerült kimutatnunk, hogy HCO_3^- iont tartalmazó közegben az EIPA nem volt képes gátolni a sejtek acidózisból történő visszatérését, ám ha bazolaterális oldalon H_2DIDS -et (4,4'-diizotiocianát-dihidrostilbén-2,2'-diszulfonátot), az NBC gátlószerét is adtuk a közeghez, a két gátlószer együtt már képes volt gátolni a pH visszatérését. Indirekt módon vizsgáltuk a HCO_3^- szekrécióját: a H_2DIDS és EIPA szimultán adásával meggátoltuk a sejtek HCO_3^- felvételét, illetve H^+ kipumpálását. Eredményeink szerint a két gátlószer alkalmazása a pH_i esését eredményezte. Ez a hatás ATP előkezeléssel igen, de forskolin (cAMP-szint emelő ágens) kezeléssel nem volt fokozható. Az ATP hatását apikálisan alkalmazott nifluminsav (Ca-aktiválta Cl^- -ion csatorna gátlószer) gátolta. Eredményeink azt mutatják, hogy HCO_3^- -mentes környezetben az ATP-kiváltotta anionszekrécióban a bazolaterális $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$ kotranszporter, illetve a pH_i regulációban a bazolaterálisan és apikálisan is megtalálható Na^+/H^+ kicserélő fontos szerepet játszik. HCO_3^-

ionokat tartalmazó közegben az ATP hatása megmarad az NKCC gátlása mellett, ami HCO_3^- -függő anionszekrécióra utal. A pH_i szabályozásban a Na^+ - HCO_3^- kotranszporter is szerepet játszik. A sejtek vektoriális HCO_3^- -ion szekréciót végeznek, amely Ca^{2+} -on keresztül igen, cAMP-útvonalon nem fokozható, igazolva, hogy CFTR nem működik a sejtvonalban. Az HPAF sejtvonal valószínűsíthetően nagyobb duktuszokból származik, amelyek szabályozzák a hasnyál pH-ját.

Revised for *Pancreas*, February 2009

Bicarbonate transport by the human pancreatic ductal cell line HPAF

Irma Demeter, MPharm,¹ Orsolya Hegyesi, DMD.,¹ Ákos Károly Nagy, PhD,¹ R Maynard Case, PhD,² Martin C Steward, PhD,² Gábor Varga, DSc,¹ Beáta Burghardt, PhD,¹

¹Department of Oral Biology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

²Faculty of Life Sciences, University of Manchester, Manchester, UK

Correspondence to: Dr Beata Burghardt,
Department of Oral Biology
Semmelweis University
Nagyvárad tér 4,
H-1089 Budapest
Hungary
Phone: +36-1-210-2930/56310
Telefax: +36-1-210-4421
E-mail: burghardt.beata@net.sote.hu

Running title: Bicarbonate transport by HPAF cells

This work was supported by grants F049058, NI69008, K61543, IN67250 and from the Hungarian National Scientific Research Fund (OTKA) and by the Royal Society (UK).

ABSTRACT

Objectives: The human pancreatic duct cell line, HPAF, has been shown previously to secrete Cl^- in response to Ca^{2+} -mobilizing stimuli. Our aim was to assess the capacity of HPAF cells to transport and secrete HCO_3^- .

Methods: HPAF cells were grown as confluent monolayers on permeable supports. Short-circuit current was measured by voltage clamp. Intracellular pH (pH_i) was measured by microfluorometry in cells loaded with BCECF.

Results: In HCO_3^- -free solutions, ATP-evoked changes in short-circuit current were inhibited by bumetanide and the recovery of pH_i from acid loading was abolished by 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA). In the presence of HCO_3^- , ATP-evoked secretion was no longer inhibited by bumetanide and there was a strong EIPA-insensitive recovery from acid loading which was inhibited by 4,4'-diisothiocyanatodihydrostilbene-2,2'-disulfonate (H_2DIDS). ATP, but not forskolin, stimulated HCO_3^- efflux from the cells.

Conclusions: In the absence of HCO_3^- , ATP-evoked Cl^- secretion is driven by a basolateral Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransporter and pH_i is regulated by apical and basolateral Na^+/H^+ exchangers. In the presence of HCO_3^- , ATP-evoked secretion is sustained in the absence of NKCC1 activity and is probably driven by basolateral Na^+ - HCO_3^- cotransport.

Keywords: intracellular pH, pancreatic duct, bicarbonate transport, CaCC, CFTR

INTRODUCTION

While the mechanism of enzyme secretion by the pancreas is well characterized, electrolyte and fluid secretion, and the signaling pathways that control them, are less clearly defined. Most available data are from experiments with animals, from which it is clear that there are major species differences in both the mechanism and regulation of pancreatic fluid secretion.¹ For example, in the rat, the maximum HCO_3^- concentration in the juice is about 70 mM while in humans it is closer to 140 mM.² At a molecular level, the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$ cotransporter actively participates in ductal fluid secretion in the rat and mouse but not in the guinea-pig.³ In view of these and other species differences, and in the absence of much relevant data from humans, systematic molecular and cellular studies on human tissue are required in order to better understand fluid secretion in the human pancreas in health and disease.

Inevitably it is difficult to obtain enough normal human tissue for functional studies of transepithelial electrolyte secretion, particularly the ductal epithelium which forms such a small fraction of the gland volume. Fortunately a number of cell lines derived from human pancreas offer functional characteristics of pancreatic ductal cells. Of those derived from human pancreatic adenocarcinomas, the well-differentiated Capan-1 cell line has the advantage that it expresses CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) chloride channels which are a vital component of the normal secretory machinery.^{4,5} Unfortunately, Capan-1 cells form rather leaky monolayers that are not optimal for studying transepithelial electrolyte movement by the short-circuit technique. On the other hand the CFPAC-1 cell line is amenable to short-circuit current measurements^{6,7} but expresses a non-functional mutant of CFTR^{8,9} and is therefore more useful as a model for CFTR-independent transport processes.¹⁰

The HPAF cell line also forms polarized and relatively well differentiated monolayers.^{11,12} It has the further advantage of showing high levels of expression of functional G-protein coupled receptors such as purinergic (P2Y) and bombesin (GRP) receptors.^{13,14} Although CFTR mRNA can be detected in HPAF cells, the protein is expressed at low levels and is thought not to contribute significantly to secretion.¹⁴ Despite this, HPAF cells achieve a significant amount of Cl^- secretion in response to Ca^{2+} -mobilizing stimuli, and this is most probably mediated by Ca^{2+} -activated Cl^- channels (CaCC). Rather less is known about the capacity of HPAF cells to transport HCO_3^- , the key anion in ductal secretion. The purpose of our study was therefore to determine the capacity of

HPAF cells to accumulate and secrete HCO_3^- ions using the short-circuit technique and microfluorometric measurements of intracellular pH (pH_i).

MATERIALS AND METHODS

Materials

Minimal Essential Medium (MEM), penicillin, streptomycin, 5-(N-ethyl-N-isopropyl) amiloride (EIPA), nigericin, bumetanide, forskolin, ATP, Na-pyruvate, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), and Na-HEPES were purchased from Sigma. Dulbecco's phosphate buffered saline, trypsin-EDTA, non-essential amino acids and fetal bovine serum were from GIBCO. 2',7'-bis(2-carboxyethyl)-5(6)-carboxyfluorescein acetoxymethyl ester (BCECF-AM) and 4,4'-diisothiocyanatodihydrostilbene-2,2'-disulfonate (H₂DIDS) were from Molecular Probes. Other salts for experimental solutions were obtained from Reanal, Budapest, Hungary.

Solutions

The standard HEPES-buffered solution contained (in mM) 137 NaCl, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 D-glucose and 10 HEPES, and was equilibrated with 100% O₂. The standard HCO₃⁻-buffered solution contained (in mM) 116 NaCl, 25 NaHCO₃, 5 KCl, 1 CaCl₂, 1 MgCl₂, 10 D-glucose and 5 HEPES, and was equilibrated with 5% CO₂/95% O₂. Na⁺-free solutions contained equimolar N-methyl-D-glucamine (NMDG⁺) in place of Na⁺. In acid-loading experiments, in which solutions contained 20 mM NH₄⁺, the concentration of Na⁺ was reduced to maintain the osmolarity. All solutions were adjusted to pH 7.4 at 37°C.

Cell culture

The human ductal adenocarcinoma cell line HPAF-II was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). Cells were grown under standard conditions in MEM supplemented with non-essential amino acids, Na-pyruvate, 10% fetal bovine serum, 50 U/ml penicillin and 50 µg/ml streptomycin. Experiments were performed on cells of passages 12-23 plated onto permeable polyester membranes (Transwell-Clear, Corning Costar) with a surface area of 1.0 cm². 500k cells were plated onto each membrane. These were incubated at 37°C in air containing 5% CO₂ for 10-15 days by which time the monolayers had reached confluence as judged by measurements of transepithelial electrical resistance (TER) made with an EVOM epithelial voltohmmeter (World Precision Instruments, Hamden, CT, USA). Experiments were performed on monolayers whose TER had increased to at least 500 Ω cm².

Measurement of pH_i

pH_i was measured by microfluorometry as described in detail elsewhere.^{5,15} Briefly, HPAF cell monolayers were mounted in a temperature-controlled perfusion chamber on the stage of a Nikon Eclipse TE200 inverted microscope. The cells were loaded with the pH-sensitive fluoroprobe BCECF by incubation in HCO₃⁻-buffered solution containing the acetoxymethyl ester (BCECF-AM, 2 μM) for 30 min at 37°C. Following loading, the apical and basolateral surfaces of the monolayer were superfused independently at 2 ml/min with either the HEPES- or HCO₃⁻-buffered solution pre-warmed to 37°C. A small region of epithelium, of fixed size and containing a few hundred cells, was illuminated alternately at 440 and 490 nm and the fluorescence intensities measured at 530 nm (F₄₄₀ and F₄₉₀ respectively) using a photomultiplier-based fluorometry system (Cairn Research, Faversham, Kent, UK). Values of pH_i were calculated from the F₄₄₀/F₄₉₀ ratio using calibration data obtained by the nigericin-K⁺ method.¹⁶ BCECF fluorescence was generally an order of magnitude greater than autofluorescence and care was taken to offset the background light signal.

Calculation of apparent base flux

Rates of change of pH_i were determined either by linear regression or, in the acid-loading experiments, by fitting a quadratic function to the data and calculating the derivative at the initial point. In order to convert these values to equivalent base fluxes, intracellular buffering capacity measurements were performed as described previously.¹⁷ Briefly, intrinsic buffering capacity was determined over a range of pH_i values by exposing the cells to step changes in extracellular NH₄⁺ concentration (0 – 20 mM) and recording the corresponding changes in pH_i in the absence of extracellular Na⁺. Total buffering capacity was determined as a function of pH_i by adding the predicted contribution of intracellular HCO₃⁻ and CO₂ buffering system. Apparent base fluxes (J_B) were calculated by multiplying the rate of change of pH_i by the total buffering capacity at the corresponding pH_i value. Positive values of J_B indicate base influx (or acid efflux).

Measurement of short-circuit current

Confluent HPAF cell monolayers grown on Transwell culture inserts were mounted in a Warner dual-channel Ussing chamber (U-2500, Warner Instrument Co., Hamden, CT, USA). The transepithelial potential difference (V_m) was measured continuously via agarose-KCl bridges and Ag-AgCl electrodes connected to an epithelial voltage-clamp amplifier (EC-825, Warner Instrument Co., Hamden, CT, USA). Values are presented as the electrical potential in the apical bath relative to the basolateral bath. The short-circuit current (I_{SC}) resulting from active transepithelial electrolyte transport was measured at 30 s intervals by voltage clamp to 0 mV for 5 s

using Ag-AgCl current electrodes mounted directly in the bath fluid. Agonist-evoked changes in I_{SC} ($\mu A/cm^2$) were determined by subtracting the preceding unstimulated I_{SC} value from the peak value following stimulation. A positive current represents either negative charge transfer from basolateral to apical, or positive charge transfer from apical to basolateral.

Statistics

All values are presented as the mean \pm SEM. Statistical comparisons were performed using Student's t-test, or ANOVA followed by Dunnett's test, as appropriate.

RESULTS

To ascertain when the HPAF cells had grown to confluence as a polarized monolayer, TER was measured regularly during the culture period. Experiments were performed between days 10 and 15 when the mean TER was $590 \pm 48 \Omega \text{ cm}^2$ ($n = 111$).

ATP-evoked secretion

HPAF cell monolayers bathed with the standard HEPES-buffered (i.e. nominally HCO_3^- -free) solution generated a small apical-negative transepithelial potential difference ($-0.62 \pm 0.14 \text{ mV}$, $n = 18$) in the absence of stimulation (data not shown). When voltage-clamped to 0 mV, the corresponding short-circuit current was $1.60 \pm 0.22 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n = 18$; Fig. 1A). Application of 50 μM ATP to the apical surface of the cells led to biphasic increases in magnitude of both V_m and I_{SC} , most probably as a result of the stimulation of anion secretion. The peak increase in I_{SC} (ΔI_{SC}), attained within 1-2 min, was $3.51 \pm 0.39 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ ($n = 9$). I_{SC} then declined slowly towards the pre-stimulation value.

To evaluate the contribution of the basolateral $\text{Na}^+ \text{-K}^+ \text{-2Cl}^-$ -cotransporter (NKCC1), which is thought to drive Cl^- secretion in these cells, we applied bumetanide, a selective inhibitor of NKCC1. Basolateral application of 100 μM bumetanide, from 5 min before and during stimulation with apical ATP, reduced ΔI_{SC} by approximately 60 % (Fig. 1C).

When monolayers were bathed in standard HCO_3^- -buffered solution, the increase in I_{SC} following stimulation with apical ATP was similar to that evoked in the absence of HCO_3^- (Fig. 1B). However, under these conditions, treatment with basolateral bumetanide had no significant effect on the response to ATP (Fig. 1D). Mean values for ΔI_{SC} evoked by apical ATP in the presence and absence of HCO_3^- , with and without basolateral bumetanide, are summarized in Fig. 1E. These data suggest that a substantial fraction of the current generated in presence of HCO_3^- is mediated by a HCO_3^- -dependent process that does not involve NKCC1 activity.

Recovery of pH_i from acid loading

In attempting to identify the HCO_3^- -dependent mechanism that drives anion secretion in the absence of NKCC1 activity, we used perturbations of pH_i to explore the pathways for HCO_3^-

transport in HPAF cells. The transporters responsible for HCO_3^- influx and H^+ extrusion were examined by first acid-loading the cells using the NH_4^+ pre-pulse technique.

As expected, bilateral application of 20 mM NH_4^+ caused a transient intracellular alkalinization followed by a marked acidification (Fig. 2A). In the standard HEPES-buffered solution, pH_i recovered gradually from the acidification, most probably as a result of H^+ extrusion. However, when the NH_4^+ pulse was immediately followed by bilateral substitution of Na^+ with the non-transported cation NMDG^+ , the recovery of pH_i was completely abolished (Fig. 2B, segment *a*). Restoration of apical Na^+ subsequently led to a modest recovery (segment *b*) which was further enhanced when Na^+ was restored to the basolateral perfusate. When Na^+ was restored first to the basolateral perfusate and then to the apical perfusate, the pattern was very similar (Fig. 2C). Mean recovery rates, expressed as apparent base fluxes (J_B), are shown in Fig. 2D. Since these experiments were performed in the absence of HCO_3^- , the results indicate that Na^+ -dependent H^+ -extrusion mechanisms, most probably Na^+/H^+ exchangers, are present in both the basolateral and apical membranes of HPAF cells.

In HCO_3^- -buffered solutions the rate of pH_i recovery following acid loading (Fig. 3A) was approximately 3-fold greater than in the HEPES-buffered solution. The recovery of pH_i was again totally abolished by bilateral exposure to the Na^+ -free solution (Fig. 3B, segment *a*) indicating that there was no significant contribution from any Na^+ -independent transporter such as a H^+ -ATPase in these cells. Restoration of Na^+ on either the apical or the basolateral side resulted in a rapid recovery of pH_i (Figs. 3B and 3C). The fact that the recovery rates shown in Fig. 3D are so much greater than those in Fig. 2D suggests that Na^+ -dependent HCO_3^- uptake plays a more important role in the regulation of pH_i in HPAF cells than H^+ extrusion under physiological conditions.

Effects of inhibitors

In the absence of HCO_3^- , the recovery of pH_i following an acid load was largely abolished by the amiloride analogue EIPA, which is a selective inhibitor of Na^+/H^+ exchangers (NHEs). This was observed both when Na^+ was restored to the apical membrane in the presence of apical EIPA (Fig. 4A) and also when Na^+ was restored to the basolateral membrane in the presence of basolateral EIPA (Fig. 4B). These results suggest that NHEs are present in both membrane domains.

Surprisingly, a higher concentration of EIPA (30 μM) was necessary for maximal (>85%) inhibition of the basolateral NHE than for a comparable inhibition of the apical NHE (3 μM , Fig. 4C). In both cases the effect of EIPA was only slowly reversible following washout of the inhibitor.

In the presence of HCO_3^- , basolateral EIPA (30 μM) had little effect on the rapid recovery of pH_i from intracellular acidification (Fig. 5A). However, basolateral application of EIPA in combination with 500 μM H_2DIDS , an inhibitor of $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ cotransport, was much more effective (Fig. 5B). Applied together, EIPA and H_2DIDS reduced the recovery rate by approximately 90% (Fig. 5C). This suggests that under physiological conditions (i.e. in the presence of HCO_3^-), the recovery from intracellular acidification in HPAF cells is mediated largely by a Na^+ - and HCO_3^- -dependent, H_2DIDS -sensitive mechanism, most probably a basolateral $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBC), rather than by Na^+/H^+ exchange.

Evidence for transepithelial HCO_3^- secretion

Because there appears to be a powerful HCO_3^- uptake mechanism at the basolateral membrane of HPAF cells, we next investigated the capacity of these cells to achieve transepithelial HCO_3^- secretion. This was done by recording the changes in pH_i that occurred when EIPA (30 μM) and H_2DIDS (500 μM) were applied simultaneously to the basolateral membrane. This indirect method assumes that the initial rate of decrease in pH_i , which occurs when basolateral HCO_3^- uptake and H^+ extrusion are blocked by H_2DIDS and EIPA respectively, is a measure of the secretory HCO_3^- flux across the apical membrane.¹⁷ Because in HPAF cells the apical NHE activity could mask the effects of blocking the basolateral transporters, it was also necessary to block the apical NHE with EIPA (10 μM) during these experiments.

Simultaneous application of 30 μM EIPA and 500 μM H_2DIDS to the basolateral membrane of unstimulated cells resulted in a slow decrease in pH_i (Fig. 6A). This could be due in part to a low level of transepithelial HCO_3^- secretion in the unstimulated cells but it could also include contributions from other acidifying pathways that are constitutively active in these cells. However, apical stimulation with 50 μM ATP caused a 2-fold acceleration of the acidification that occurred when EIPA and H_2DIDS were subsequently applied (Fig. 6B). In contrast, application of 10 μM forskolin to the apical membrane, in order to elevate intracellular cAMP and thereby activate any CFTR channels that were expressed in the cells, had no significant effect on the rate of the acidification induced by EIPA and H_2DIDS (Fig. 6C). Mean acidification rates, expressed as the equivalent efflux of base ($-\text{J}_\text{B}$), both in unstimulated cells and following stimulation with ATP and forskolin, are shown in Fig. 6D.

DISCUSSION

The HPAF cell line is one of several derived from human pancreatic adenocarcinomas that have been identified as potential *in vitro* models for investigating electrolyte secretion by the human pancreatic duct. All of these cell lines retain some of the functional characteristics of ductal epithelial cells but each one also has particular defects and none has yet emerged as a completely satisfactory choice.

It is already established that HPAF cells form confluent, polarized monolayers in tissue culture and express a number of ductal markers.¹¹ When grown on permeable supports they form relatively high-resistance monolayers with well-formed tight junctions.¹² HPAF monolayers mediate transepithelial Cl^- secretion in response to Ca^{2+} -elevating stimuli,¹⁴ consistent with earlier reports that the cells express functional Ca^{2+} -activated Cl^- channels.¹⁸ However, they only express low levels of CFTR, which is a key component of the normal ductal secretory mechanism and, furthermore, it has been suggested that they have little capacity for HCO_3^- secretion,¹⁴ which is probably the single most important function of the ductal epithelium *in vivo*.

The aim of this study was to examine further the capacity of HPAF cells to secrete HCO_3^- , which demanded that we first identify and localize the principal acid/base transporters that are involved in the regulation of pH_i . We report here the first measurements of pH_i in polarized HPAF cell monolayers bathed independently at their apical and basolateral surfaces. These measurements allow us to conclude that HPAF cells have a high level of basolateral Na^+ - HCO_3^- cotransporter activity which could provide the main driving force for transepithelial HCO_3^- secretion.

The baseline characteristics of our HPAF cell monolayers grown on permeable supports were consistent with previous reports.^{12,14,19} Stimulation of the cells by apical application of the Ca^{2+} -mobilizing agonist ATP evoked a significant increase in I_{SC} as reported previously.¹⁴ This response, which is probably due mainly to an increase in net Cl^- secretion, was substantially reduced by pretreatment of the basolateral membrane with bumetanide, an inhibitor of Na^+ - K^+ - 2Cl^- cotransport. We therefore conclude that the cotransporter, most probably NKCC1, is probably an important mechanism for Cl^- uptake across the basolateral membrane of HPAF cells, as it is in many other secretory epithelia including the pancreatic ductal cell line Capan-1.⁵ The fact that the response to ATP was not totally inhibited by bumetanide may indicate the presence of alternative pathways for Cl^- uptake or it may be that the normally elevated intracellular Cl^- concentration takes some time to fall to its equilibrium value following inhibition of NKCC1.

Inclusion of HCO_3^- in the bathing medium has previously been reported not to affect either the baseline I_{SC} or the increase in I_{SC} evoked by apical ATP.¹⁴ Our results confirmed this (Fig. 1), but pretreatment with bumetanide yielded an unexpected result. In the presence of HCO_3^- , bumetanide no longer had any significant inhibitory effect on the secretory response to ATP. Assuming that bumetanide was still effective in blocking NKCC1 under these conditions, we conclude that the presence of HCO_3^- enabled another transport mechanism to provide the driving force for secretion while the main pathway for basolateral Cl^- uptake was disabled. However, we cannot predict from this observation whether HCO_3^- itself is secreted under these conditions or whether HCO_3^- supports an alternative pathway for Cl^- uptake across the basolateral membrane, perhaps via an anion exchanger.

To clarify the role of HCO_3^- it was first necessary to identify the acid/base transporters that are present in HPAF cells. Experiments in which the cells were acid loaded by exposure to NH_4^+ (Fig. 2) revealed that, in the absence of HCO_3^- , normal pH_i was restored by H^+ extrusion across both apical and basolateral membranes. This process was Na^+ -dependent and inhibited by EIPA (Fig. 4) and therefore attributed to Na^+/H^+ exchange. Similar observations have been reported in the CFPAC-1 ductal cell line.⁸ Exchangers of the NHE (SLC9) family, usually NHE1, are widely expressed at the basolateral membrane of epithelial cells. However it is interesting to note that NHE2 and/or NHE3 are also present at the apical membrane of the larger ducts of the rat and mouse pancreas where they are thought to play a role in HCO_3^- 'salvage' when ductal secretion ceases.^{20,21} The differential sensitivity of the apical and basolateral exchangers to EIPA that we have observed in HPAF cells is not consistent with this distribution of NHE isoforms and requires further investigation. However, the presence of an apical NHE is consistent with the possibility that the HPAF cell line originated from cells in the larger ducts of the human pancreas.^{22,23}

In the presence of HCO_3^- the recovery of pH_i following acid loading was greatly enhanced by the involvement of an H_2DIDS -sensitive, Na^+ - and HCO_3^- -dependent transporter at the basolateral membrane (Figs. 3 & 5). This is most likely a $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$ cotransporter of the SLC4 family, probably the NBC1 previously described in ductal epithelial cells isolated from rodents^{2,15,20} and in the Capan-1 and CFPAC-1 cell lines.^{5,8} The presence of such a high level of NBC1 activity in the basolateral membrane of HPAF cells is undoubtedly consistent with the possibility that these cells are capable of mediating net HCO_3^- secretion. On the other hand, HCO_3^- uptake via NBC1 could also drive the basolateral uptake of Cl^- via a $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$ exchanger thereby indirectly enhancing net Cl^- secretion.

To determine whether HPAF cell monolayers achieve net transepithelial HCO_3^- secretion, we applied a technique that estimates HCO_3^- efflux across the apical membrane from the initial rate of fall in pH_i when HCO_3^- uptake and H^+ extrusion across the basolateral membrane are suddenly halted by inhibitors. Our data show that while ATP stimulation caused a significant increase in the acidification rate that followed application of the inhibitors, stimulation with forskolin, to elevate intracellular cAMP, did not (Fig. 6). This is in contrast to previous data from Capan-1⁵ and CFPAC-1⁸ cells but is consistent with a previous report,¹⁴ and with our own observations, that HPAF cells do not respond to cAMP-mediated stimuli. However, it does suggest that purinergic stimulation can evoke net HCO_3^- efflux from HPAF cells, most probably across the apical membrane. Even though the overall secretory rate, as judged by the short-circuit current, does not increase when HCO_3^- is added to the bathing medium, there may nonetheless be a significant contribution from HCO_3^- secretion under these more physiological conditions.

We therefore conclude that HPAF cells express the key basolateral transporters required for transepithelial Cl^- and HCO_3^- secretion (Fig. 7) - namely NKCC1 and NBC1 - and we have presented some evidence that HPAF cell monolayers may be capable of net HCO_3^- secretion (in addition to Cl^- secretion) in response to Ca^{2+} -mobilizing stimuli. Previous work suggests that Cl^- secretion across the apical membrane is probably mediated by Ca^{2+} -activated Cl^- channels^{14,18} but it remains to be seen whether these, or other transporters, mediate the putative apical HCO_3^- secretion.

REFERENCES

1. Case RM. Is the rat pancreas an appropriate model of the human pancreas? *Pancreatology*. 2006;6:180-190.
2. Steward MC, Ishiguro H, Case RM. Mechanisms of bicarbonate secretion in the pancreatic duct. *Annu Rev Physiol*. 2005;67:377-409.
3. Fernández-Salazar MP, Pascua P, Calvo JJ, et al. Basolateral anion transport mechanisms underlying fluid secretion by mouse, rat and guinea-pig pancreatic ducts. *J Physiol*. 2004;556:415-428.
4. Cheng HS, Leung PY, Chew SBC, et al. Concurrent and independent HCO_3^- and Cl^- secretion in a human pancreatic duct cell line (CAPAN-1). *J Membr Biol*. 1998;164:155-167.
5. Szűcs A, Demeter I, Burghardt B, et al. Vectorial bicarbonate transport by capan-1 cells: A model for human pancreatic ductal secretion. *Cellular Physiol Biochem*. 2006;18:253-264.
6. Cheng HS, So SC, Law SH, et al. Angiotensin II-mediated signal transduction events in cystic fibrosis pancreatic duct cells. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1449:254-260.
7. Zhu JX, Lo PS, Zhao WC, et al. Bak Foong Pills stimulate anion secretion across normal and cystic fibrous pancreatic duct epithelia. *Cell Biol Int*. 2002;26:1011-1018.
8. Rakonczay Z, Fearn A, Hegyi P, et al. Characterization of H^+ and HCO_3^- transporters in CFPAC-1 human pancreatic duct cells. *World J Gastroenterol*. 2006;12:885-895.
9. Rakonczay Z, Hegyi P, Hasegawa M, et al. CFTR gene transfer to human cystic fibrosis pancreatic duct cells using a sendai virus vector. *J Cellular Physiol*. 2008;214:442-455.
10. Zhu JX, Yang N, Zhu H, et al. Effect of NYD-SP27 down-regulation on ATP-induced Ca^{2+} -dependent pancreatic duct anion secretion in cystic fibrosis cells. *Cell Biol Int*. 2007;31:521-525.
11. Kim YW, Kern HF, Mullins TD, et al. Characterization of clones of a human pancreatic adenocarcinoma cell line representing different stages of differentiation. *Pancreas*. 1989;4:353-362.
12. Rajasekaran SA, Gopal J, Espineda C, et al. HPAF-II, a cell culture model to study pancreatic epithelial cell structure and function. *Pancreas*. 2004;29:e77-e84.
13. Burghardt B, Wenger C, Barabás K, et al. GRP-receptor-mediated signal transduction, gene expression and DNA synthesis in the human pancreatic adenocarcinoma cell line HPAF. *Peptides*. 2001;22:1119-1128.

14. Fong P, Argent BE, Guggino WB, et al. Characterization of vectorial chloride transport pathways in the human pancreatic duct adenocarcinoma cell line HPAF. *Amer J Physiol.* 2003;285:C433-C445.
15. Ishiguro H, Steward MC, Lindsay ARG, et al. Accumulation of intracellular HCO_3^- by Na^+ - HCO_3^- cotransport in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J Physiol.* 1996;495:169-178.
16. Thomas JA, Buchsbaum RN, Zimniak A, et al. Intracellular pH measurements in Ehrlich ascites tumor cells utilizing spectroscopic probes generated in situ. *Biochemistry.* 1979;18:2210-2218.
17. Szalmay G, Varga G, Kajiyama F, et al. Bicarbonate and fluid secretion evoked by cholecystokinin, bombesin and acetylcholine in isolated guinea-pig pancreatic ducts. *J Physiol.* 2001;535:795-807.
18. Winpenny JP, Harris A, Hollingsworth MA, et al. Calcium-activated chloride conductance in a pancreatic adenocarcinoma cell line of ductal origin (HPAF) and in freshly isolated human pancreatic duct cells. *Pflugers Arch.* 1998;435:796-803.
19. Rajasekaran SA, Barwe SP, Gopal J, et al. Na-K-ATPase regulates tight junction permeability through occludin phosphorylation in pancreatic epithelial cells. *Amer J Physiol.* 2007;292:G124-G133.
20. Zhao H, Star RA, Muallem S. Membrane localization of H^+ and HCO_3^- transporters in the rat pancreatic duct. *J Gen Physiol.* 1994;104:57-85.
21. Lee MG, Ahn W, Choi JY, et al. Na^+ -dependent transporters mediate HCO_3^- salvage across the luminal membrane of the main pancreatic duct. *J Clin Invest.* 2000;105:1651-1658.
22. Adler G, Kern HF. The human exocrine pancreas in health and disease. In: Riva A, Motta PM, eds. *Ultrastructure of the Extraparietal Glands of the Digestive Tract.* Vol 6. Boston: Kluwer; 1990:115-146.
23. Burghardt B, Elkjær ML, Kwon TH, et al. Distribution of aquaporin water channels AQP1 and AQP5 in the ductal system of human pancreas. *Gut.* 2003;52:1008-1016.

FIGURE LEGENDS

Figure 1

Effects of bumetanide on the response of HPAF cell short-circuit current to ATP. In panels A-D, the deflections show the corresponding I_{SC} values recorded during 5 s of zero-voltage clamp at 30 s intervals. Representative traces show the effect of apical ATP (50 μ M) on I_{SC} in the absence of HCO_3^- (A, C) and in the presence of HCO_3^- (B, D). In panels C and D, the cells were pretreated for 5 min with basolateral bumetanide (100 μ M). Panel E shows mean values ($n = 4-9$) of the peak increase in I_{SC} evoked by ATP in the presence and absence of HCO_3^- and bumetanide. Ap, apical; Bl, basolateral. ** $P < 0.001$.

Figure 2

Recovery of pH_i in HPAF cell monolayers following acid loading in the absence of HCO_3^- . Representative traces show the effects of 3 min bilateral exposure to 20 mM NH_4^+ followed by: A, restoration of the normal HEPES solution; B, bilateral substitution of extracellular Na^+ with NMDG⁺ (0 Na^+) and then restoration of apical Na^+ ; C, bilateral substitution of extracellular Na^+ and then restoration of basolateral Na^+ . Panel D shows mean values ($n = 16-23$) of the apparent base influx (j_b) responsible for the recovery of pH_i during the segments labeled *a-c* in the individual traces. Ap, apical; Bl, basolateral. ** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ compared with control (C).

Figure 3

Recovery of pH_i in HPAF cell monolayers following acid loading in the presence of HCO_3^- . Representative traces show the effects of 3 min bilateral exposure to 20 mM NH_4^+ followed by: A, restoration of the normal HCO_3^- solution; B, bilateral substitution of extracellular Na^+ with NMDG⁺ (0 Na^+) and then restoration of apical Na^+ ; C, bilateral substitution of extracellular Na^+ and then restoration of basolateral Na^+ . Panel D shows mean values ($n = 3-11$) of the apparent base influx (J_B) responsible for the recovery of pH_i during the segments labeled *a-c* in the individual traces. Ap, apical; Bl, basolateral. ** $P < 0.001$ and * $P < 0.05$ compared with control (C).

Figure 4

Effects of the Na^+/H^+ exchange inhibitor EIPA on the recovery of pH_i in HPAF cell monolayers following acid loading in the absence of HCO_3^- . Representative traces show the effects of 3 min bilateral exposure to 20 mM NH_4^+ (NH_4^+) followed by bilateral substitution of extracellular Na^+

with NMDG⁺ (0 Na⁺) and then restoration of: A, apical Na⁺ in the presence of apical EIPA (10 μM); B, basolateral Na⁺ in the presence of basolateral EIPA (30 μM). Panel C shows mean values (n = 4-7) of the apparent base influx (J_B) responsible for the recovery of pH_i in the presence of different concentrations of EIPA (1-30 μM), or no EIPA, at the apical and basolateral membranes. Ap, apical; Bl, basolateral. ** P<0.001 and * P<0.05 compared with control.

Figure 5

Effects of EIPA and the Na⁺-HCO₃⁻ cotransport inhibitor H₂DIDS on the recovery of pH_i in HPAF cell monolayers following acid loading in the presence of HCO₃⁻. Representative traces show the effects of 3 min bilateral exposure to 20 mM NH₄⁺ (NH₄⁺) followed by restoration of the normal HCO₃⁻ solution: A, in the presence basolateral EIPA (30 μM); B, with the addition of basolateral H₂DIDS (500 μM). In both cases 10 μM EIPA was also applied to the apical side to block the apical NHE. Panel C shows mean values (n = 5-11) of the apparent base influx (J_B) responsible for the recovery of pH_i in the presence of basolateral EIPA (E), EIPA and H₂DIDS (E+H), and in the absence of inhibitors (C). Ap, apical; Bl, basolateral. * P<0.05 compared with control.

Figure 6

Intracellular acidification rates in HPAF cell monolayers following blockade of basolateral HCO₃⁻ uptake. Representative traces show the changes in pH_i induced by simultaneous basolateral application of EIPA (30 μM) and H₂DIDS (500 μM): A, in unstimulated cells; B, following apical stimulation with ATP (50 μM); C, following apical stimulation with forskolin (10 μM). The dashed lines show the gradient that was used to calculate base efflux following blockade of basolateral HCO₃⁻ uptake. Panel D shows mean values (n = 5-19) of the apparent base efflux (-J_B) in unstimulated (C), ATP- (A) and forskolin-stimulated cells (F). Ap, apical; Bl, basolateral. * P<0.05 compared with unstimulated control.

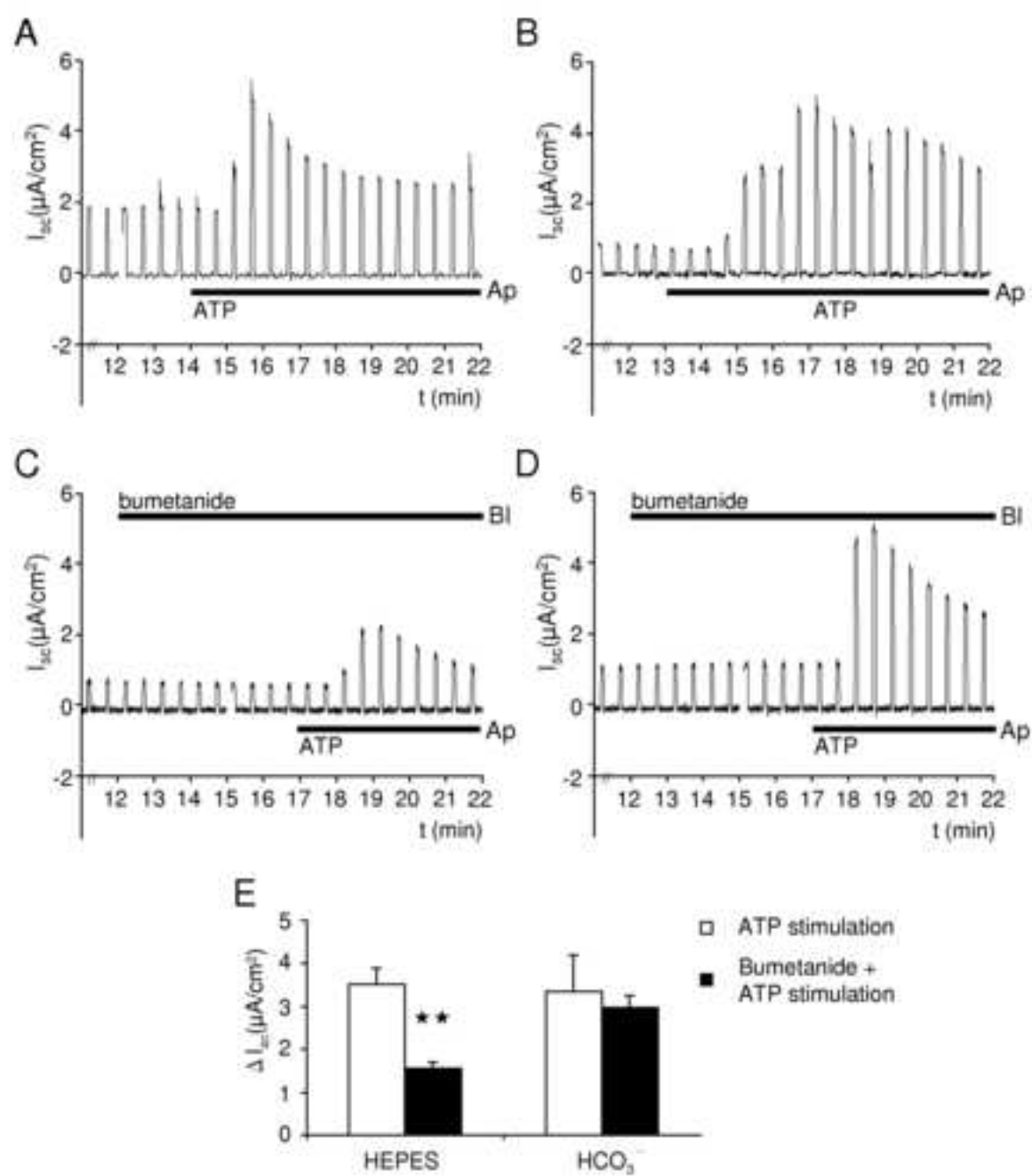
Figure 7

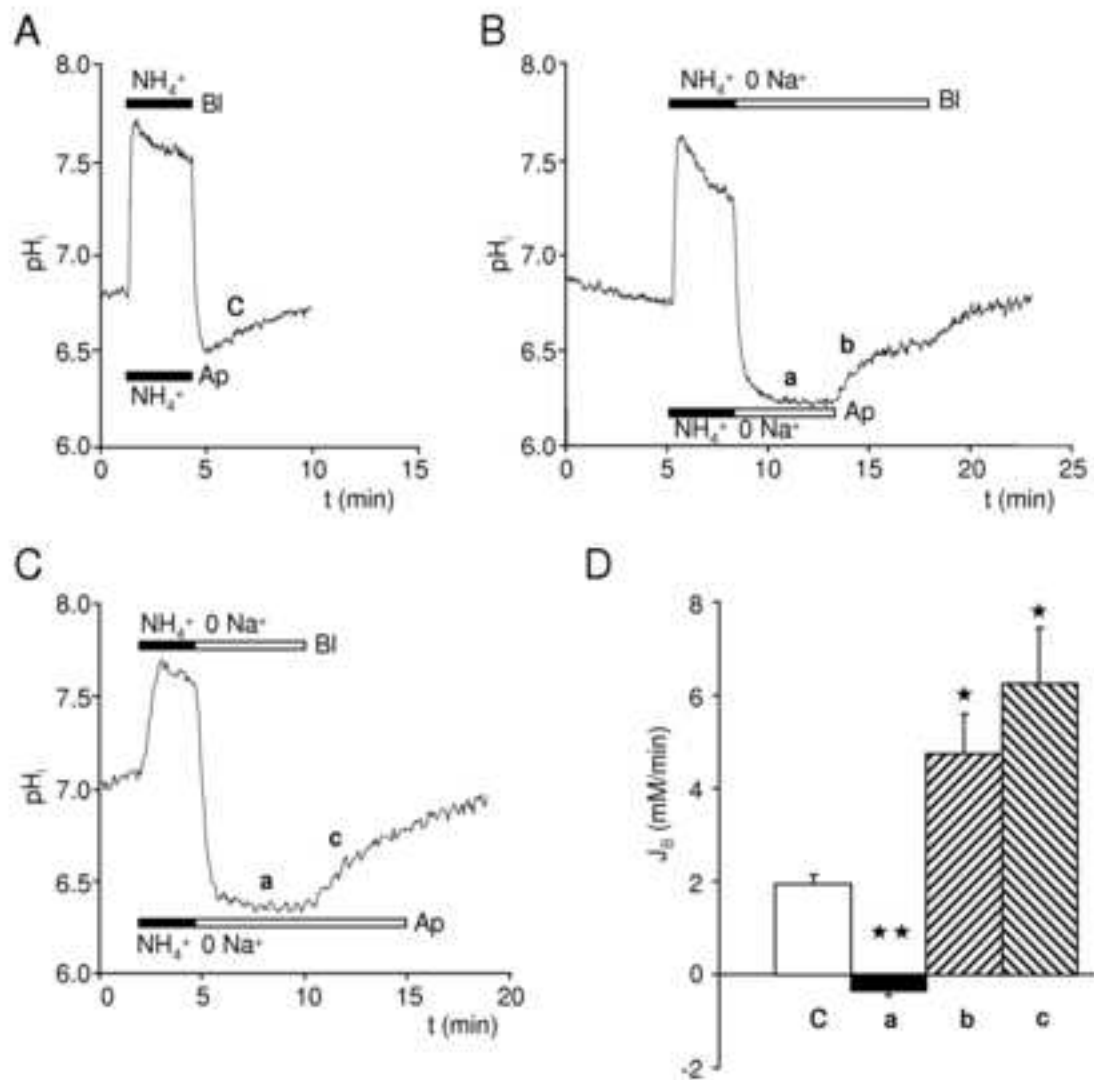
Pathways for Cl⁻ and HCO₃⁻ transport by HPAF cells. The principal pathway for Cl⁻ secretion in response to purinergic stimulation is via a basolateral Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter and apical Ca²⁺-activated Cl⁻ channel. Intracellular HCO₃⁻ is accumulated by basolateral Na⁺-2HCO₃⁻ cotransport and is also generated from CO₂ and water through the action of carbonic anhydrase and the basolateral extrusion of H⁺ via a Na⁺/H⁺ exchanger. The apical efflux pathway for HCO₃⁻ is not yet known. In addition, we cannot exclude the possibility that a basolateral Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger

contributes to the HCO_3^- -dependent secretion of Cl^- . Apical and basolateral K^+ channels, which were well characterized by Fong et al.,¹⁴ and the basolateral Na^+, K^+ -ATPase are omitted for clarity.

Figure

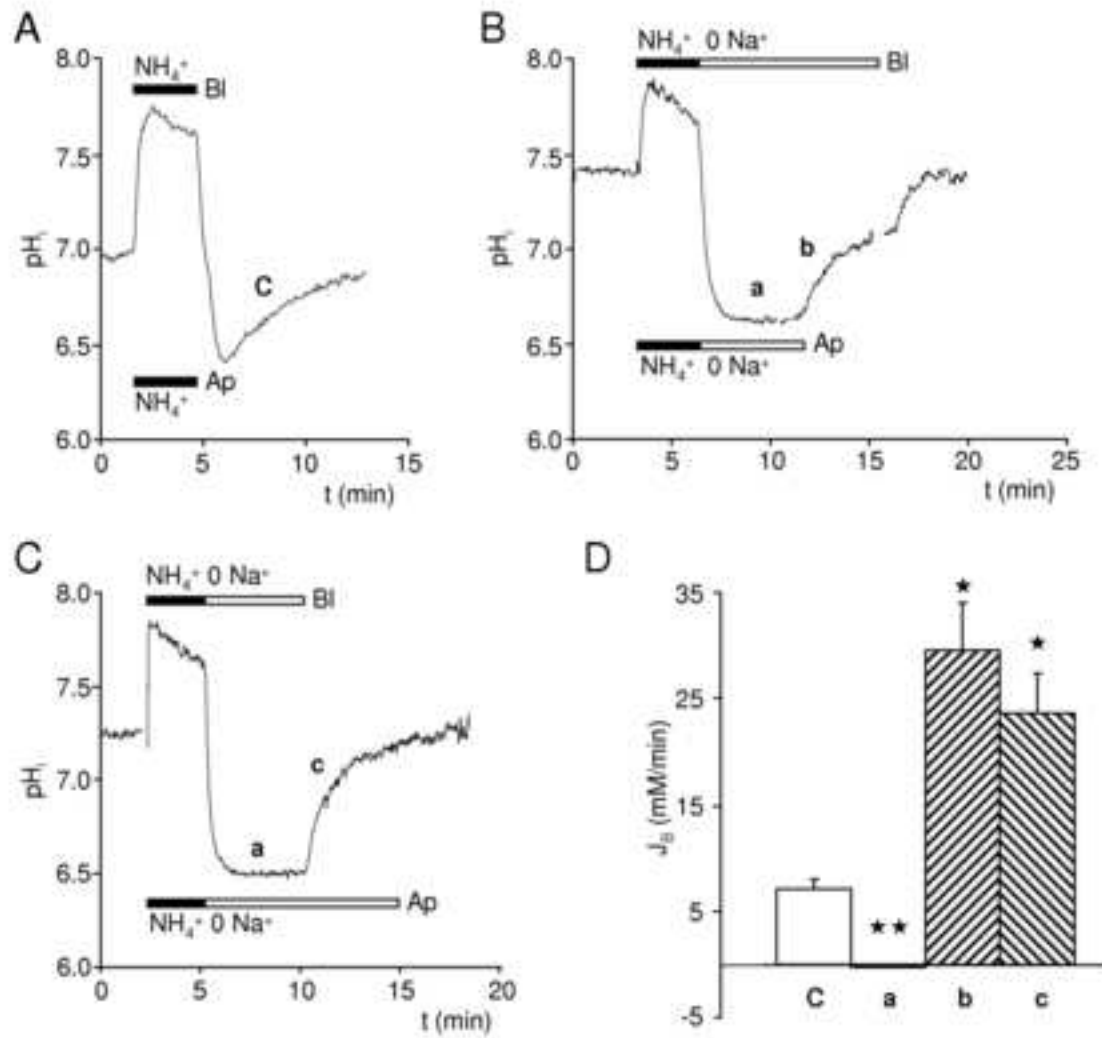
[Click here to download high resolution image](#)





Figure

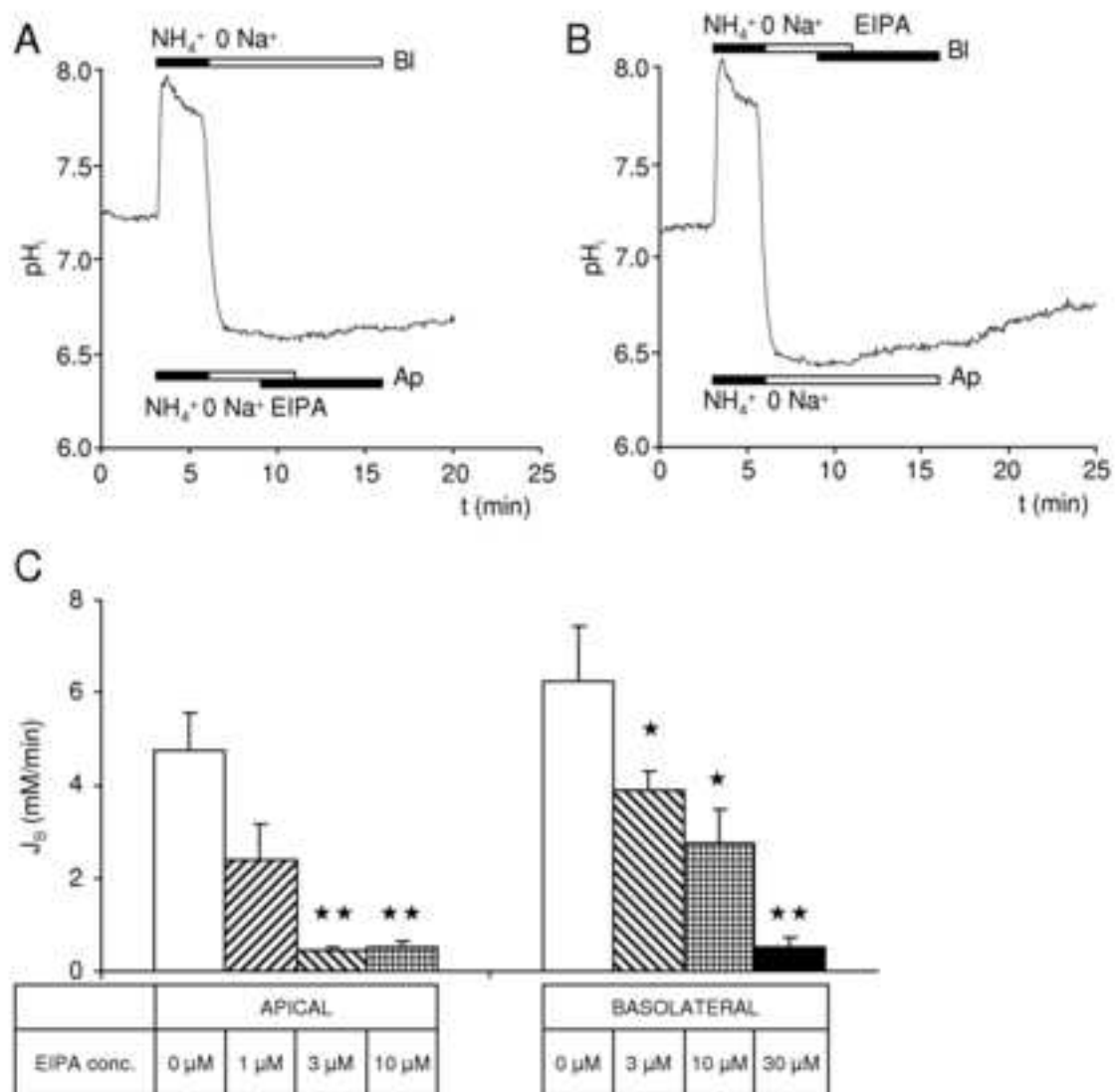
[Click here to download high resolution image](#)



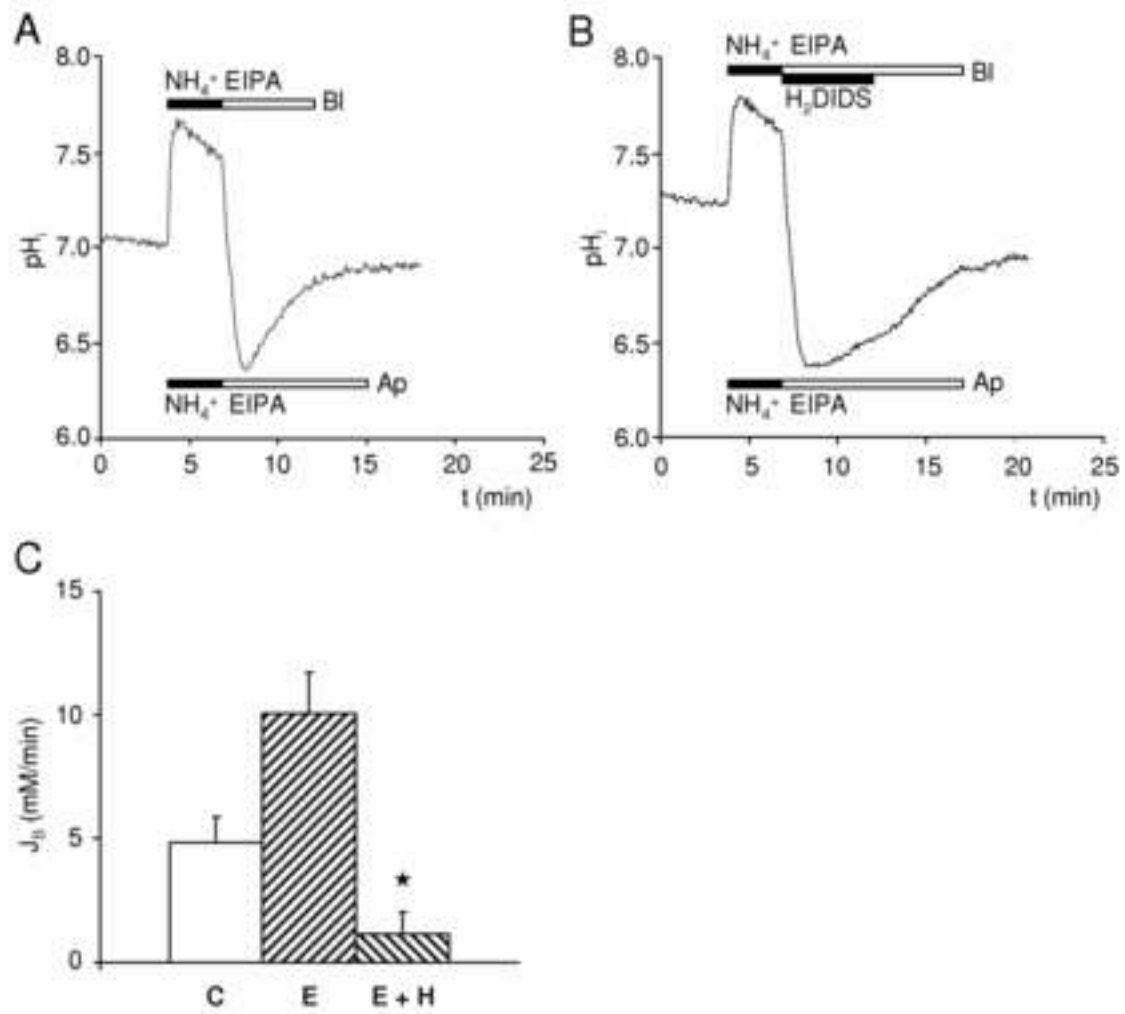
Demeter et al., Fig. 3

Figure

[Click here to download high resolution image](#)



Demeter et al., Fig. 4



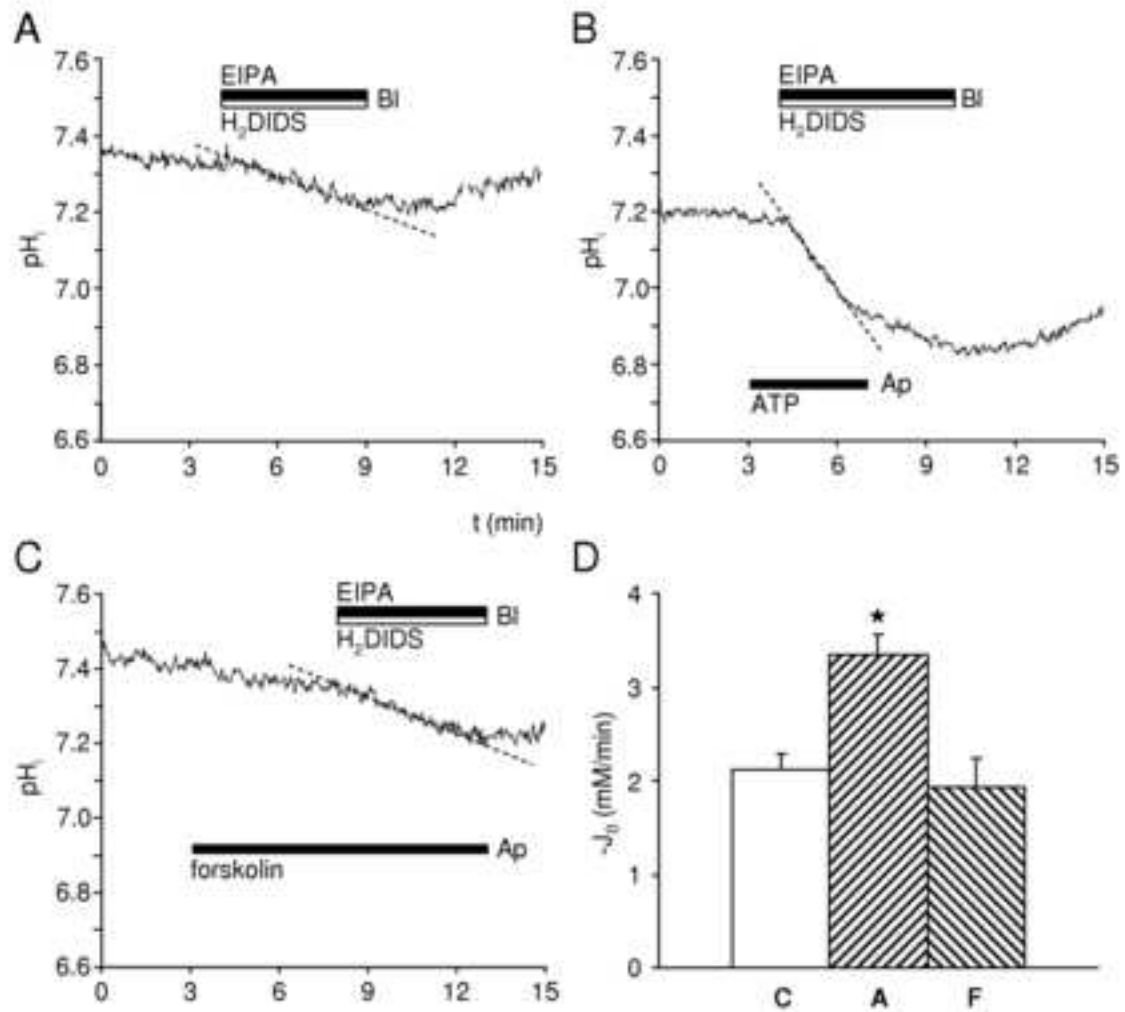
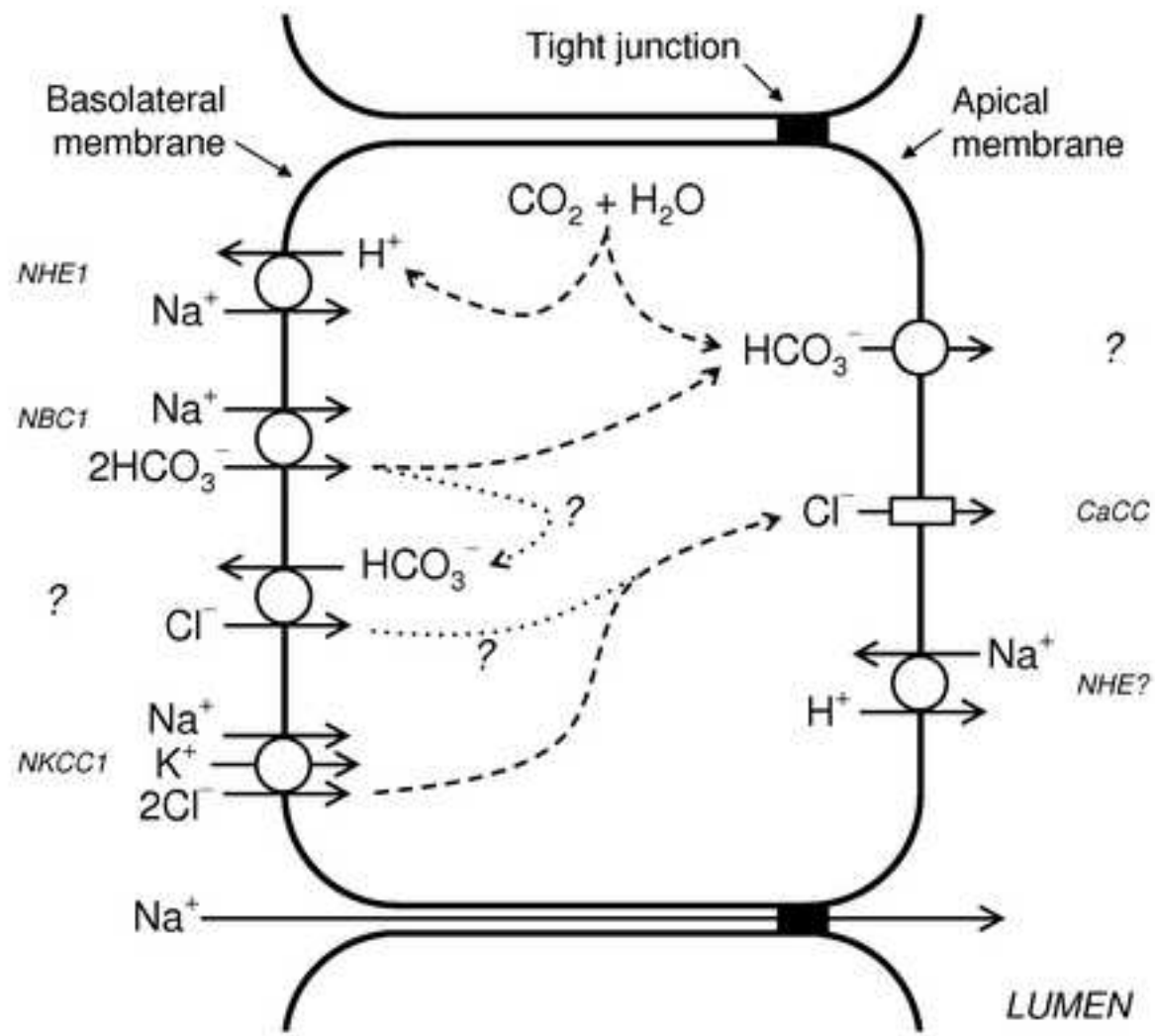


Figure
[Click here to download high resolution image](#)



Demeter et al., Fig. 7