

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  $\text{Na}^+$  és  $\text{Cl}^-$  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 transzepitheliális bikarbonát szekréció és  $\text{pH}_i$  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 luminális alkalmazása a  $pH_i$  kompenzációt szignifikánsan nem befolyásolta. Szekretin és VIP bazolaterális, valamint ATP és UTP luminális 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<sup>-</sup>-csatorna direkt sejt-közötti kapcsolatokon keresztül aktiválja az SLC26 család anion kicserélőit. Ez a megfigyelés fontos szerepet játszhat a sejtek HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> szekréciójában cisztikus fibrózisos betegeknél. A Calu-3 sejtvonal, amely emberi légutak submucosalis mirigyéből származik, egy jó modell a CFTR-függő HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 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 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> pufferezt oldattal perfundáltattuk és 37°C-on temperáltuk egy inverz fluoreszcens mikroszkóp munkaasztalán. Az intracelluláris pH-t (pH<sub>i</sub>) standard mikrofluorometriás technikával rögzítettük. A Cl<sup>-</sup> ionok glukonáttal való helyettesítése a bazolaterális oldalon a Calu-3 sejtek pH<sub>i</sub> 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<sup>-</sup> ionok elvétele az apikális oldalról nem eredményezett pH<sub>i</sub> változást a stimulálatlan sejtekben, ám 10 mM forskolin stimuláció esetén egy nagymértékű, gyors pH<sub>i</sub> 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<sup>-</sup> vagy formát ionokkal mimikálható volt, ám nem jött létre a Cl<sup>-</sup> ionok SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 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 Hg<sup>2+</sup>-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  $\text{Na}^+$  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  $\text{HCO}_3^-$  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  $\text{HCO}_3^-$  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 ( $\text{pH}_i$ ) 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.  $\text{HCO}_3^-$ -mentes környezetben a forskolin (cAMP-szint emelő ágens) kisebb mértékben képes volt fokozni a rövidzárlati áram értékét, mint  $\text{HCO}_3^-$  jelenlétében. A bazolaterálisan alkalmazott bumetanid (a  $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - 2\text{Cl}^-$  kontranzporter, NKCC gátlószere) a forskolin hatását csak  $\text{HCO}_3^-$ -mentes környezetben gátolta. Az ATP  $\text{HCO}_3^-$  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  $\text{HCO}_3^-$ -mentes, mind  $\text{HCO}_3^-$ -t tartalmazó közegben  $\text{Na}^+$ -függő módon megy végbe. A kompenzációt  $\text{HCO}_3^-$ -mentes oldatban az 5-(N-etil-N-izopropil)-amilorid (EIPA,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kicserélő, NHE gátlószere) gátolta,  $\text{HCO}_3^-$ -t tartalmazó oldatban EIPA és 4,4'-diizotiocianát-dihidrostilbén-2,2'-diszulfonát ( $\text{H}_2\text{DIDS}$ ,  $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$  kotranszporter, NBC gátlószere) együttes alkalmazása szükséges a savterhelés kompenzálásának gátlásához.

Anion-kicserélőket a sejtek mindkét oldalán sikerült kimutatnunk  $\text{Cl}^-$ -mentes, de  $\text{HCO}_3^-$ -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  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióját indirekt módon vizsgáltuk: az  $\text{H}_2\text{DIDS}$  és EIPA szimultán adásával meggátoltuk a sejtek  $\text{HCO}_3^-$  felvételét, illetve  $\text{H}^+$  kipumpálását. Eredményeink szerint a két gátlószer alkalmazása a  $\text{pH}_i$  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,  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kicserélő és  $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$  kotranszporter működik. A sejtek anion-, és ezen belül a  $\text{HCO}_3^-$ -szekréciója  $\text{Ca}^{2+}$ - és cAMP-útvonalon keresztül is serkenthető. A  $\text{HCO}_3^-$  ionokat a sejt bazolaterális oldalon veszi fel és apikális oldalon szekretálja, tehát a transzport vektoriális. 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  $\text{Ca}^{2+}$ -tól függő módon  $\text{Cl}^-$  iont képes szekretálni. A mi célunk az volt, hogy kimutassuk, hogy a  $\text{Cl}^-$  ionok mellett az HPAF sejtek képesek-e  $\text{HCO}_3^-$  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 ( $\text{pH}_i$ ) változását regisztráltuk.

Kimutattuk, hogy  $\text{HCO}_3^-$ -mentes környezetben az ATP, mint  $\text{Ca}^{2+}$ -szint emelő ágens, hatását a bazolaterálisan adott bumetanid (amely az NKCC gátlószer) gátolni képes, míg  $\text{HCO}_3^-$  iont is tartalmazó közegben ez a gátlás elmarad rövidzárlati árammérés során. Az intracelluláris pH mérés során kimutattuk, hogy  $\text{HCO}_3^-$ -mentes oldatban az acidózisból való visszatérés mind bazolaterális, mind apikális oldalon függ a  $\text{Na}^+$ -tól, és azt az EIPA, az NHE gátlószer (5-(N-etil-N-izopropil-amilorid) gátolja. Ugyancsak sikerült kimutatnunk, hogy  $\text{HCO}_3^-$  iont tartalmazó közegben az EIPA nem volt képes gátolni a sejtek acidózisból történő visszatérését, ám ha bazolaterális oldalon  $\text{H}_2\text{DIDS}$ -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  $\text{HCO}_3^-$  szekrécióját: a  $\text{H}_2\text{DIDS}$  és EIPA szimultán adásával meggátoltuk a sejtek  $\text{HCO}_3^-$  felvételét, illetve  $\text{H}^+$  kipumpálását. Eredményeink szerint a két gátlószer alkalmazása a  $\text{pH}_i$  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  $\text{Cl}^-$ -ion csatorna gátlószer) gátolta. Eredményeink azt mutatják, hogy  $\text{HCO}_3^-$ -mentes környezetben az ATP-kiváltotta anionszekrécióban a bazolaterális  $\text{Na}^+/\text{K}^+-2\text{Cl}^-$  kotranszporter, illetve a  $\text{pH}_i$  regulációban a bazolaterálisan és apikálisan is megtalálható  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  kicserélő fontos szerepet játszik.  $\text{HCO}_3^-$

ionokat tartalmazó közegben az ATP hatása megmarad az NKCC gátlása mellett, ami  $\text{HCO}_3^-$ -függő anionszekrécióra utal. A  $\text{pH}_i$  szabályozásban a  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$  kotranszporter is szerepet játszik. A sejtek vektoriális  $\text{HCO}_3^-$ -ion szekréciót végeznek, amely  $\text{Ca}^{2+}$ -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,<sup>1</sup> Orsolya Hegyesi, DMD.,<sup>1</sup> Ákos Károly Nagy, PhD,<sup>1</sup> R Maynard Case, PhD,<sup>2</sup> Martin C Steward, PhD,<sup>2</sup> Gábor Varga, DSc,<sup>1</sup> Beáta Burghardt, PhD,<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Biology, Semmelweis University, Budapest, Hungary

<sup>2</sup>Faculty 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  $\text{Cl}^-$  in response to  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing stimuli. Our aim was to assess the capacity of HPAF cells to transport and secrete  $\text{HCO}_3^-$ .

**Methods:** HPAF cells were grown as confluent monolayers on permeable supports. Short-circuit current was measured by voltage clamp. Intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) was measured by microfluorometry in cells loaded with BCECF.

**Results:** In  $\text{HCO}_3^-$ -free solutions, ATP-evoked changes in short-circuit current were inhibited by bumetanide and the recovery of  $\text{pH}_i$  from acid loading was abolished by 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride (EIPA). In the presence of  $\text{HCO}_3^-$ , 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 ( $\text{H}_2\text{DIDS}$ ). ATP, but not forskolin, stimulated  $\text{HCO}_3^-$  efflux from the cells.

**Conclusions:** In the absence of  $\text{HCO}_3^-$ , ATP-evoked  $\text{Cl}^-$  secretion is driven by a basolateral  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  cotransporter and  $\text{pH}_i$  is regulated by apical and basolateral  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers. In the presence of  $\text{HCO}_3^-$ , ATP-evoked secretion is sustained in the absence of NKCC1 activity and is probably driven by basolateral  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$  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.<sup>1</sup> For example, in the rat, the maximum  $\text{HCO}_3^-$  concentration in the juice is about 70 mM while in humans it is closer to 140 mM.<sup>2</sup> 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.<sup>3</sup> 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.<sup>4,5</sup> 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<sup>6,7</sup> but expresses a non-functional mutant of CFTR<sup>8,9</sup> and is therefore more useful as a model for CFTR-independent transport processes.<sup>10</sup>

The HPAF cell line also forms polarized and relatively well differentiated monolayers.<sup>11,12</sup> 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.<sup>13,14</sup> 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.<sup>14</sup> Despite this, HPAF cells achieve a significant amount of  $\text{Cl}^-$  secretion in response to  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing stimuli, and this is most probably mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels (CaCC). Rather less is known about the capacity of HPAF cells to transport  $\text{HCO}_3^-$ , the key anion in ductal secretion. The purpose of our study was therefore to determine the capacity of

HPAF cells to accumulate and secrete  $\text{HCO}_3^-$  ions using the short-circuit technique and microfluorometric measurements of intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ).

## **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 (H<sub>2</sub>DIDS) 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 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-glucose and 10 HEPES, and was equilibrated with 100% O<sub>2</sub>. The standard HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-buffered solution contained (in mM) 116 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 10 D-glucose and 5 HEPES, and was equilibrated with 5% CO<sub>2</sub>/95% O<sub>2</sub>. Na<sup>+</sup>-free solutions contained equimolar N-methyl-D-glucamine (NMDG<sup>+</sup>) in place of Na<sup>+</sup>. In acid-loading experiments, in which solutions contained 20 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, the concentration of Na<sup>+</sup> 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 cm<sup>2</sup>. 500k cells were plated onto each membrane. These were incubated at 37°C in air containing 5% CO<sub>2</sub> 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 cm<sup>2</sup>.

### **Measurement of pH<sub>i</sub>**

pH<sub>i</sub> was measured by microfluorometry as described in detail elsewhere.<sup>5,15</sup> 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 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-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 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-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 (F<sub>440</sub> and F<sub>490</sub> respectively) using a photomultiplier-based fluorometry system (Cairn Research, Faversham, Kent, UK). Values of pH<sub>i</sub> were calculated from the F<sub>440</sub>/F<sub>490</sub> ratio using calibration data obtained by the nigericin-K<sup>+</sup> method.<sup>16</sup> 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<sub>i</sub> 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.<sup>17</sup> Briefly, intrinsic buffering capacity was determined over a range of pH<sub>i</sub> values by exposing the cells to step changes in extracellular NH<sub>4</sub><sup>+</sup> concentration (0 – 20 mM) and recording the corresponding changes in pH<sub>i</sub> in the absence of extracellular Na<sup>+</sup>. Total buffering capacity was determined as a function of pH<sub>i</sub> by adding the predicted contribution of intracellular HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> and CO<sub>2</sub> buffering system. Apparent base fluxes (J<sub>B</sub>) were calculated by multiplying the rate of change of pH<sub>i</sub> by the total buffering capacity at the corresponding pH<sub>i</sub> value. Positive values of J<sub>B</sub> 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<sub>m</sub>) 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<sub>SC</sub>) 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  $\text{HCO}_3^-$ -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  $\mu\text{M}$  ATP to the apical surface of the cells led to biphasic increases in magnitude of both  $V_m$  and  $I_{\text{SC}}$ , most probably as a result of the stimulation of anion secretion. The peak increase in  $I_{\text{SC}}$  ( $\Delta I_{\text{SC}}$ ), attained within 1-2 min, was  $3.51 \pm 0.39 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  ( $n = 9$ ).  $I_{\text{SC}}$  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  $\text{Cl}^-$  secretion in these cells, we applied bumetanide, a selective inhibitor of NKCC1. Basolateral application of 100  $\mu\text{M}$  bumetanide, from 5 min before and during stimulation with apical ATP, reduced  $\Delta I_{\text{SC}}$  by approximately 60 % (Fig. 1C).

When monolayers were bathed in standard  $\text{HCO}_3^-$ -buffered solution, the increase in  $I_{\text{SC}}$  following stimulation with apical ATP was similar to that evoked in the absence of  $\text{HCO}_3^-$  (Fig. 1B). However, under these conditions, treatment with basolateral bumetanide had no significant effect on the response to ATP (Fig. 1D). Mean values for  $\Delta I_{\text{SC}}$  evoked by apical ATP in the presence and absence of  $\text{HCO}_3^-$ , with and without basolateral bumetanide, are summarized in Fig. 1E. These data suggest that a substantial fraction of the current generated in presence of  $\text{HCO}_3^-$  is mediated by a  $\text{HCO}_3^-$ -dependent process that does not involve NKCC1 activity.

### Recovery of $\text{pH}_i$ from acid loading

In attempting to identify the  $\text{HCO}_3^-$ -dependent mechanism that drives anion secretion in the absence of NKCC1 activity, we used perturbations of  $\text{pH}_i$  to explore the pathways for  $\text{HCO}_3^-$

transport in HPAF cells. The transporters responsible for  $\text{HCO}_3^-$  influx and  $\text{H}^+$  extrusion were examined by first acid-loading the cells using the  $\text{NH}_4^+$  pre-pulse technique.

As expected, bilateral application of 20 mM  $\text{NH}_4^+$  caused a transient intracellular alkalinization followed by a marked acidification (Fig. 2A). In the standard HEPES-buffered solution,  $\text{pH}_i$  recovered gradually from the acidification, most probably as a result of  $\text{H}^+$  extrusion. However, when the  $\text{NH}_4^+$  pulse was immediately followed by bilateral substitution of  $\text{Na}^+$  with the non-transported cation  $\text{NMDG}^+$ , the recovery of  $\text{pH}_i$  was completely abolished (Fig. 2B, segment *a*). Restoration of apical  $\text{Na}^+$  subsequently led to a modest recovery (segment *b*) which was further enhanced when  $\text{Na}^+$  was restored to the basolateral perfusate. When  $\text{Na}^+$  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  $\text{HCO}_3^-$ , the results indicate that  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{H}^+$ -extrusion mechanisms, most probably  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers, are present in both the basolateral and apical membranes of HPAF cells.

In  $\text{HCO}_3^-$ -buffered solutions the rate of  $\text{pH}_i$  recovery following acid loading (Fig. 3A) was approximately 3-fold greater than in the HEPES-buffered solution. The recovery of  $\text{pH}_i$  was again totally abolished by bilateral exposure to the  $\text{Na}^+$ -free solution (Fig. 3B, segment *a*) indicating that there was no significant contribution from any  $\text{Na}^+$ -independent transporter such as a  $\text{H}^+$ -ATPase in these cells. Restoration of  $\text{Na}^+$  on either the apical or the basolateral side resulted in a rapid recovery of  $\text{pH}_i$  (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  $\text{Na}^+$ -dependent  $\text{HCO}_3^-$  uptake plays a more important role in the regulation of  $\text{pH}_i$  in HPAF cells than  $\text{H}^+$  extrusion under physiological conditions.

### Effects of inhibitors

In the absence of  $\text{HCO}_3^-$ , the recovery of  $\text{pH}_i$  following an acid load was largely abolished by the amiloride analogue EIPA, which is a selective inhibitor of  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchangers (NHEs). This was observed both when  $\text{Na}^+$  was restored to the apical membrane in the presence of apical EIPA (Fig. 4A) and also when  $\text{Na}^+$  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  $\mu\text{M}$ ) was necessary for maximal (>85%) inhibition of the basolateral NHE than for a comparable inhibition of the apical NHE (3  $\mu\text{M}$ , Fig. 4C). In both cases the effect of EIPA was only slowly reversible following washout of the inhibitor.

In the presence of  $\text{HCO}_3^-$ , basolateral EIPA (30  $\mu\text{M}$ ) had little effect on the rapid recovery of  $\text{pH}_i$  from intracellular acidification (Fig. 5A). However, basolateral application of EIPA in combination with 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DIDS}$ , an inhibitor of  $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$  cotransport, was much more effective (Fig. 5B). Applied together, EIPA and  $\text{H}_2\text{DIDS}$  reduced the recovery rate by approximately 90% (Fig. 5C). This suggests that under physiological conditions (i.e. in the presence of  $\text{HCO}_3^-$ ), the recovery from intracellular acidification in HPAF cells is mediated largely by a  $\text{Na}^+$ - and  $\text{HCO}_3^-$ -dependent,  $\text{H}_2\text{DIDS}$ -sensitive mechanism, most probably a basolateral  $\text{Na}^+ - \text{HCO}_3^-$  cotransporter (NBC), rather than by  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange.

### **Evidence for transepithelial $\text{HCO}_3^-$ secretion**

Because there appears to be a powerful  $\text{HCO}_3^-$  uptake mechanism at the basolateral membrane of HPAF cells, we next investigated the capacity of these cells to achieve transepithelial  $\text{HCO}_3^-$  secretion. This was done by recording the changes in  $\text{pH}_i$  that occurred when EIPA (30  $\mu\text{M}$ ) and  $\text{H}_2\text{DIDS}$  (500  $\mu\text{M}$ ) were applied simultaneously to the basolateral membrane. This indirect method assumes that the initial rate of decrease in  $\text{pH}_i$ , which occurs when basolateral  $\text{HCO}_3^-$  uptake and  $\text{H}^+$  extrusion are blocked by  $\text{H}_2\text{DIDS}$  and EIPA respectively, is a measure of the secretory  $\text{HCO}_3^-$  flux across the apical membrane.<sup>17</sup> 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  $\mu\text{M}$ ) during these experiments.

Simultaneous application of 30  $\mu\text{M}$  EIPA and 500  $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{DIDS}$  to the basolateral membrane of unstimulated cells resulted in a slow decrease in  $\text{pH}_i$  (Fig. 6A). This could be due in part to a low level of transepithelial  $\text{HCO}_3^-$  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  $\mu\text{M}$  ATP caused a 2-fold acceleration of the acidification that occurred when EIPA and  $\text{H}_2\text{DIDS}$  were subsequently applied (Fig. 6B). In contrast, application of 10  $\mu\text{M}$  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  $\text{H}_2\text{DIDS}$  (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.<sup>11</sup> When grown on permeable supports they form relatively high-resistance monolayers with well-formed tight junctions.<sup>12</sup> HPAF monolayers mediate transepithelial  $\text{Cl}^-$  secretion in response to  $\text{Ca}^{2+}$ -elevating stimuli,<sup>14</sup> consistent with earlier reports that the cells express functional  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels.<sup>18</sup> 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  $\text{HCO}_3^-$  secretion,<sup>14</sup> 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  $\text{HCO}_3^-$ , which demanded that we first identify and localize the principal acid/base transporters that are involved in the regulation of  $\text{pH}_i$ . We report here the first measurements of  $\text{pH}_i$  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  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$  cotransporter activity which could provide the main driving force for transepithelial  $\text{HCO}_3^-$  secretion.

The baseline characteristics of our HPAF cell monolayers grown on permeable supports were consistent with previous reports.<sup>12,14,19</sup> Stimulation of the cells by apical application of the  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing agonist ATP evoked a significant increase in  $I_{\text{SC}}$  as reported previously.<sup>14</sup> This response, which is probably due mainly to an increase in net  $\text{Cl}^-$  secretion, was substantially reduced by pretreatment of the basolateral membrane with bumetanide, an inhibitor of  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ - $2\text{Cl}^-$  cotransport. We therefore conclude that the cotransporter, most probably NKCC1, is probably an important mechanism for  $\text{Cl}^-$  uptake across the basolateral membrane of HPAF cells, as it is in many other secretory epithelia including the pancreatic ductal cell line Capan-1.<sup>5</sup> The fact that the response to ATP was not totally inhibited by bumetanide may indicate the presence of alternative pathways for  $\text{Cl}^-$  uptake or it may be that the normally elevated intracellular  $\text{Cl}^-$  concentration takes some time to fall to its equilibrium value following inhibition of NKCC1.

Inclusion of  $\text{HCO}_3^-$  in the bathing medium has previously been reported not to affect either the baseline  $I_{\text{SC}}$  or the increase in  $I_{\text{SC}}$  evoked by apical ATP.<sup>14</sup> Our results confirmed this (Fig. 1), but pretreatment with bumetanide yielded an unexpected result. In the presence of  $\text{HCO}_3^-$ , 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  $\text{HCO}_3^-$  enabled another transport mechanism to provide the driving force for secretion while the main pathway for basolateral  $\text{Cl}^-$  uptake was disabled. However, we cannot predict from this observation whether  $\text{HCO}_3^-$  itself is secreted under these conditions or whether  $\text{HCO}_3^-$  supports an alternative pathway for  $\text{Cl}^-$  uptake across the basolateral membrane, perhaps via an anion exchanger.

To clarify the role of  $\text{HCO}_3^-$  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  $\text{NH}_4^+$  (Fig. 2) revealed that, in the absence of  $\text{HCO}_3^-$ , normal  $\text{pH}_i$  was restored by  $\text{H}^+$  extrusion across both apical and basolateral membranes. This process was  $\text{Na}^+$ -dependent and inhibited by EIPA (Fig. 4) and therefore attributed to  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange. Similar observations have been reported in the CFPAC-1 ductal cell line.<sup>8</sup> 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  $\text{HCO}_3^-$  'salvage' when ductal secretion ceases.<sup>20,21</sup> 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.<sup>22,23</sup>

In the presence of  $\text{HCO}_3^-$  the recovery of  $\text{pH}_i$  following acid loading was greatly enhanced by the involvement of an  $\text{H}_2\text{DIDS}$ -sensitive,  $\text{Na}^+$ - and  $\text{HCO}_3^-$ -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<sup>2,15,20</sup> and in the Capan-1 and CFPAC-1 cell lines.<sup>5,8</sup> 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  $\text{HCO}_3^-$  secretion. On the other hand,  $\text{HCO}_3^-$  uptake via NBC1 could also drive the basolateral uptake of  $\text{Cl}^-$  via a  $\text{Cl}^- / \text{HCO}_3^-$  exchanger thereby indirectly enhancing net  $\text{Cl}^-$  secretion.

To determine whether HPAF cell monolayers achieve net transepithelial  $\text{HCO}_3^-$  secretion, we applied a technique that estimates  $\text{HCO}_3^-$  efflux across the apical membrane from the initial rate of fall in  $\text{pH}_i$  when  $\text{HCO}_3^-$  uptake and  $\text{H}^+$  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-1<sup>5</sup> and CFPAC-1<sup>8</sup> cells but is consistent with a previous report,<sup>14</sup> 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  $\text{HCO}_3^-$  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  $\text{HCO}_3^-$  is added to the bathing medium, there may nonetheless be a significant contribution from  $\text{HCO}_3^-$  secretion under these more physiological conditions.

We therefore conclude that HPAF cells express the key basolateral transporters required for transepithelial  $\text{Cl}^-$  and  $\text{HCO}_3^-$  secretion (Fig. 7) - namely NKCC1 and NBC1 - and we have presented some evidence that HPAF cell monolayers may be capable of net  $\text{HCO}_3^-$  secretion (in addition to  $\text{Cl}^-$  secretion) in response to  $\text{Ca}^{2+}$ -mobilizing stimuli. Previous work suggests that  $\text{Cl}^-$  secretion across the apical membrane is probably mediated by  $\text{Ca}^{2+}$ -activated  $\text{Cl}^-$  channels<sup>14,18</sup> but it remains to be seen whether these, or other transporters, mediate the putative apical  $\text{HCO}_3^-$  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  $\text{HCO}_3^-$  and  $\text{Cl}^-$  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  $\text{H}^+$  and  $\text{HCO}_3^-$  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  $\text{Ca}^{2+}$ -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  $\text{HCO}_3^-$  by  $\text{Na}^+$ - $\text{HCO}_3^-$  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  $\text{H}^+$  and  $\text{HCO}_3^-$  transporters in the rat pancreatic duct. *J Gen Physiol.* 1994;104:57-85.
21. Lee MG, Ahn W, Choi JY, et al.  $\text{Na}^+$ -dependent transporters mediate  $\text{HCO}_3^-$  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  $\mu$ 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  $\mu$ 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<sup>+</sup> (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<sup>+</sup> (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<sup>+</sup> (0 Na<sup>+</sup>) and then restoration of: A, apical Na<sup>+</sup> in the presence of apical EIPA (10 μM); B, basolateral Na<sup>+</sup> in the presence of basolateral EIPA (30 μM). Panel C shows mean values (n = 4-7) of the apparent base influx (J<sub>B</sub>) responsible for the recovery of pH<sub>i</sub> 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<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport inhibitor H<sub>2</sub>DIDS on the recovery of pH<sub>i</sub> in HPAF cell monolayers following acid loading in the presence of HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Representative traces show the effects of 3 min bilateral exposure to 20 mM NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) followed by restoration of the normal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> solution: A, in the presence basolateral EIPA (30 μM); B, with the addition of basolateral H<sub>2</sub>DIDS (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<sub>B</sub>) responsible for the recovery of pH<sub>i</sub> in the presence of basolateral EIPA (*E*), EIPA and H<sub>2</sub>DIDS (*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 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake. Representative traces show the changes in pH<sub>i</sub> induced by simultaneous basolateral application of EIPA (30 μM) and H<sub>2</sub>DIDS (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 HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> uptake. Panel D shows mean values (n = 5-19) of the apparent base efflux (-J<sub>B</sub>) 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<sup>-</sup> and HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> transport by HPAF cells. The principal pathway for Cl<sup>-</sup> secretion in response to purinergic stimulation is via a basolateral Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-2Cl<sup>-</sup> cotransporter and apical Ca<sup>2+</sup>-activated Cl<sup>-</sup> channel. Intracellular HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> is accumulated by basolateral Na<sup>+</sup>-2HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransport and is also generated from CO<sub>2</sub> and water through the action of carbonic anhydrase and the basolateral extrusion of H<sup>+</sup> via a Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger. The apical efflux pathway for HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> is not yet known. In addition, we cannot exclude the possibility that a basolateral Cl<sup>-</sup>/HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> exchanger

contributes to the  $\text{HCO}_3^-$ -dependent secretion of  $\text{Cl}^-$ . Apical and basolateral  $\text{K}^+$  channels, which were well characterized by Fong et al.,<sup>14</sup> and the basolateral  $\text{Na}^+, \text{K}^+$ -ATPase are omitted for clarity.



Figure

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

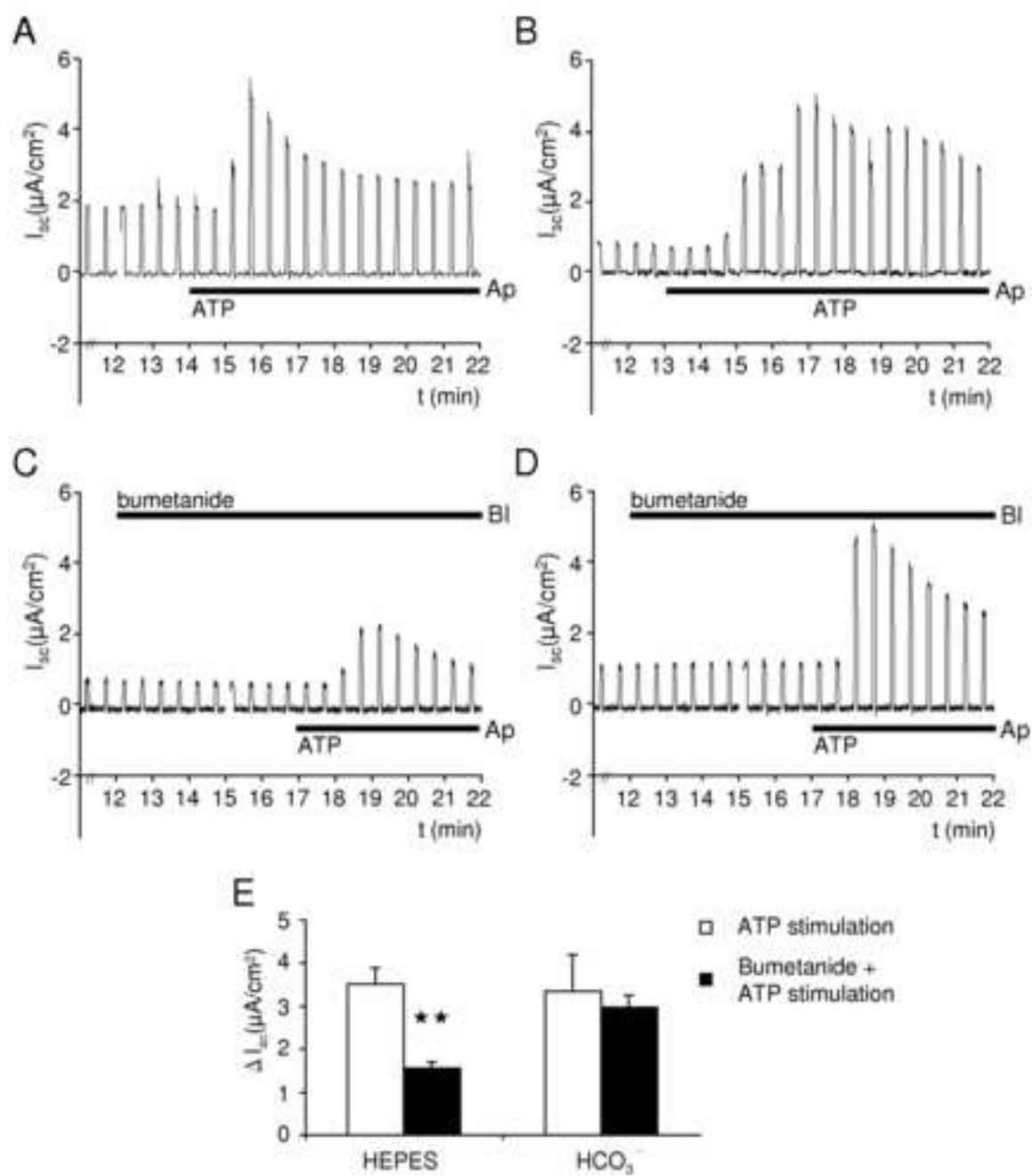
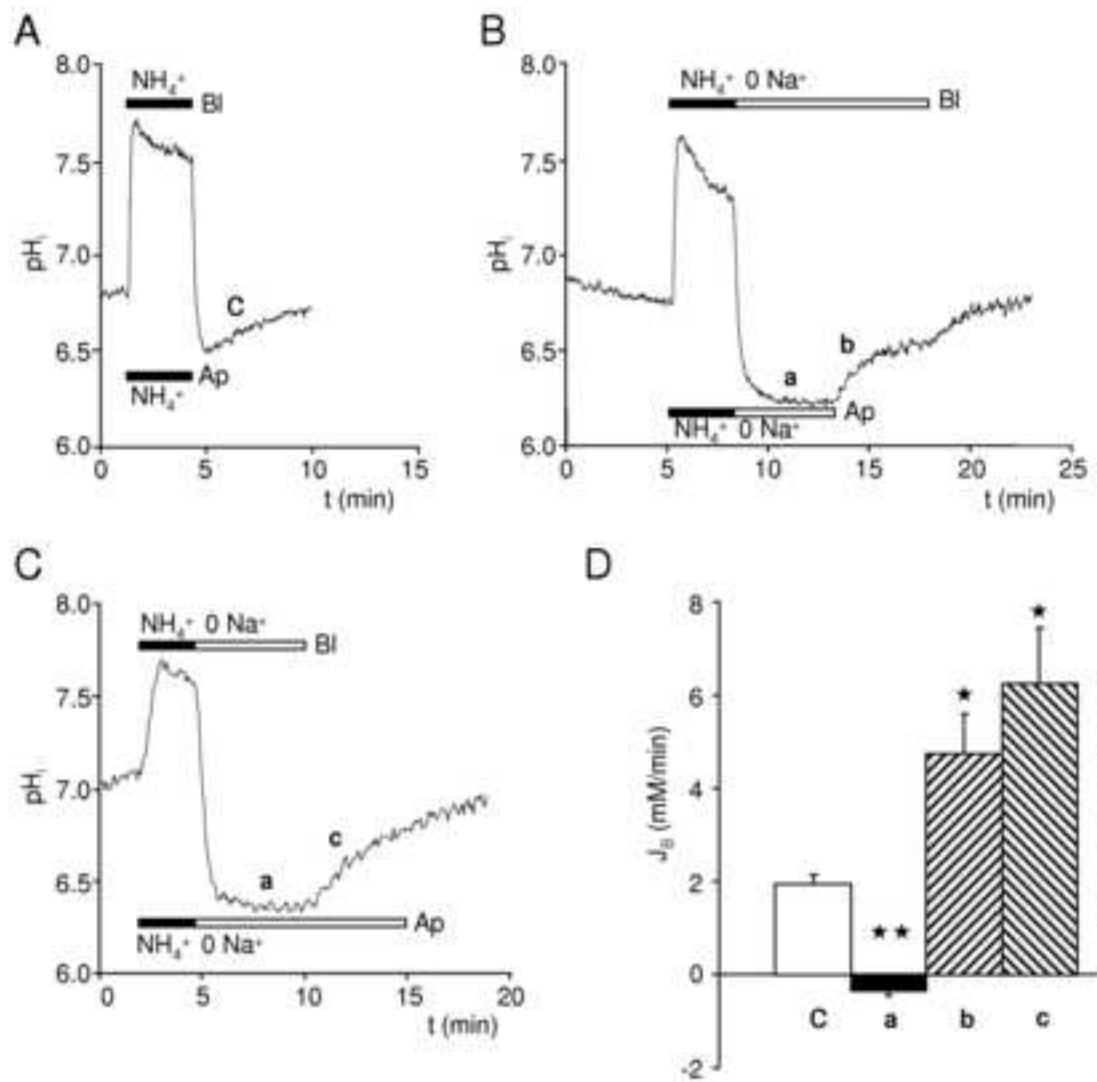


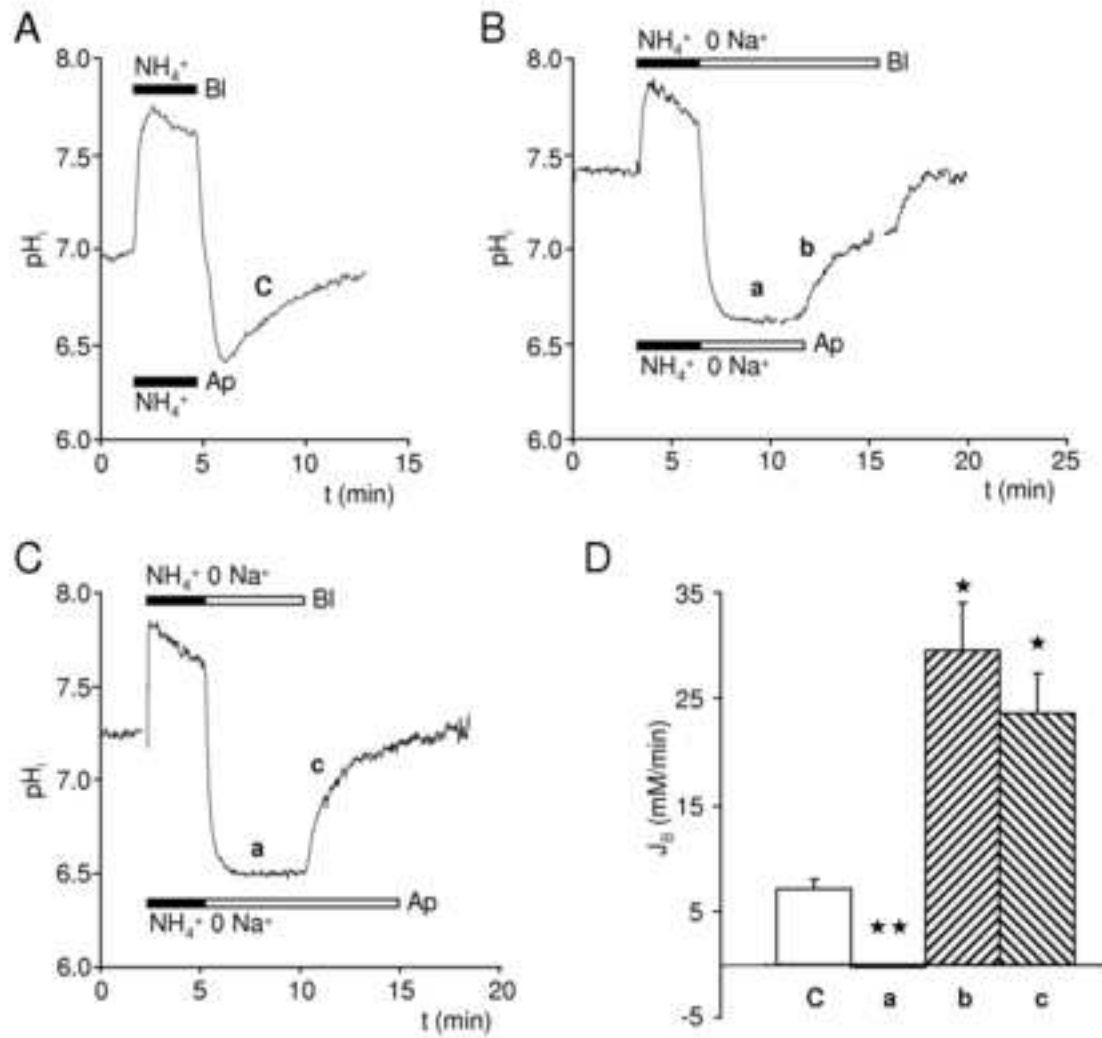
Figure  
[Click here to download high resolution image](#)



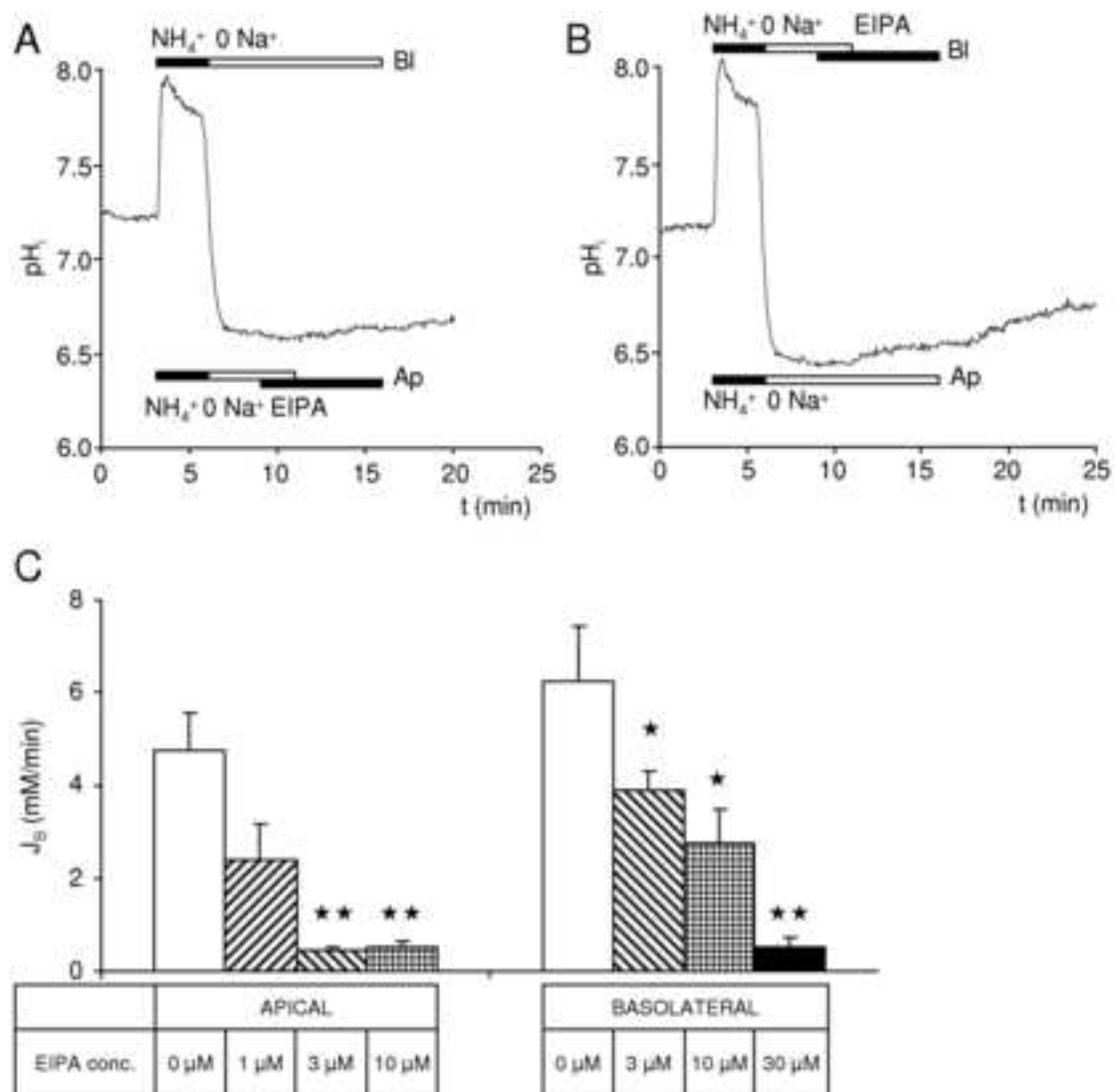
Demeter et al., Fig. 2

Figure

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



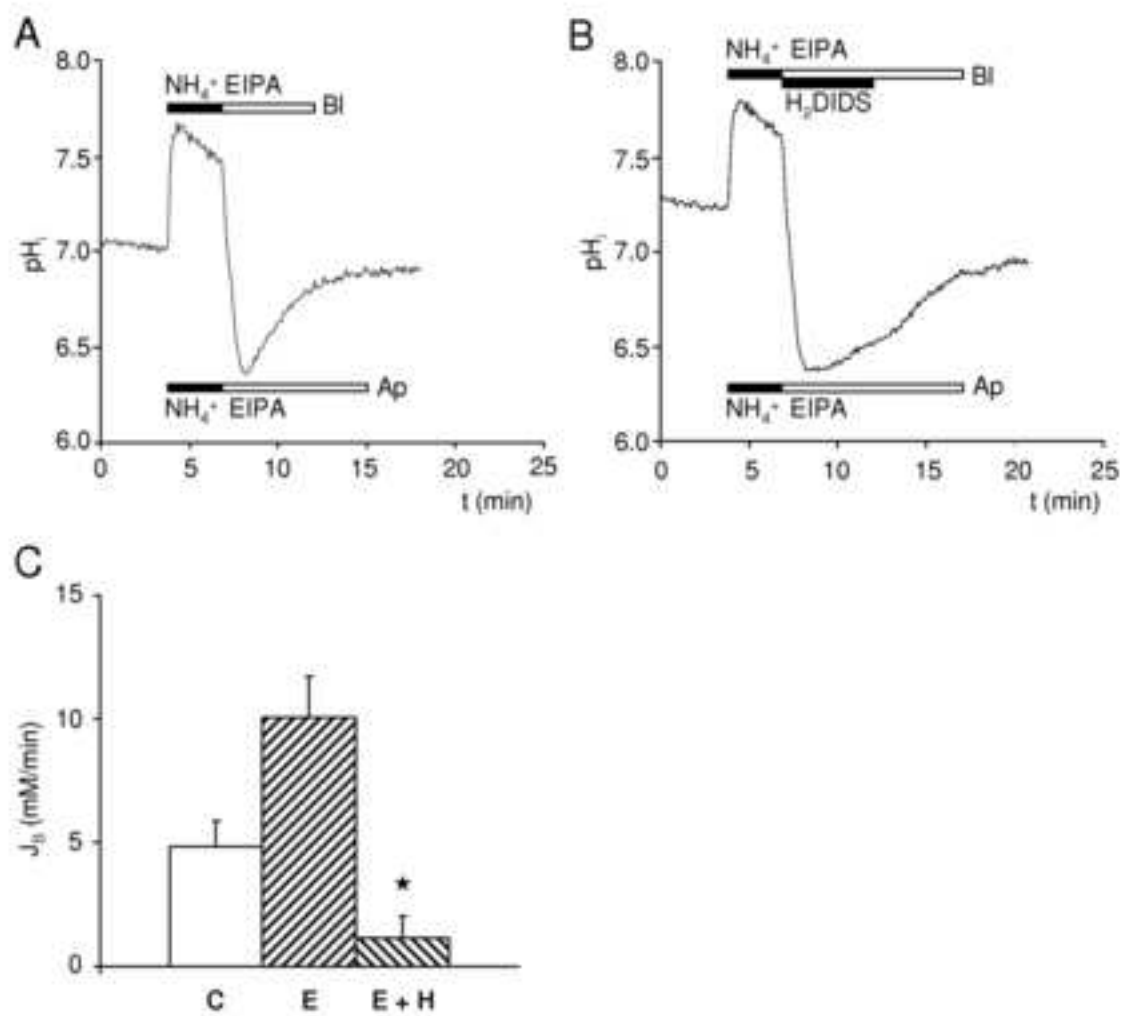
Demeter et al., Fig. 3



Demeter et al., Fig. 4

Figure

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



Demeter et al., Fig. 5

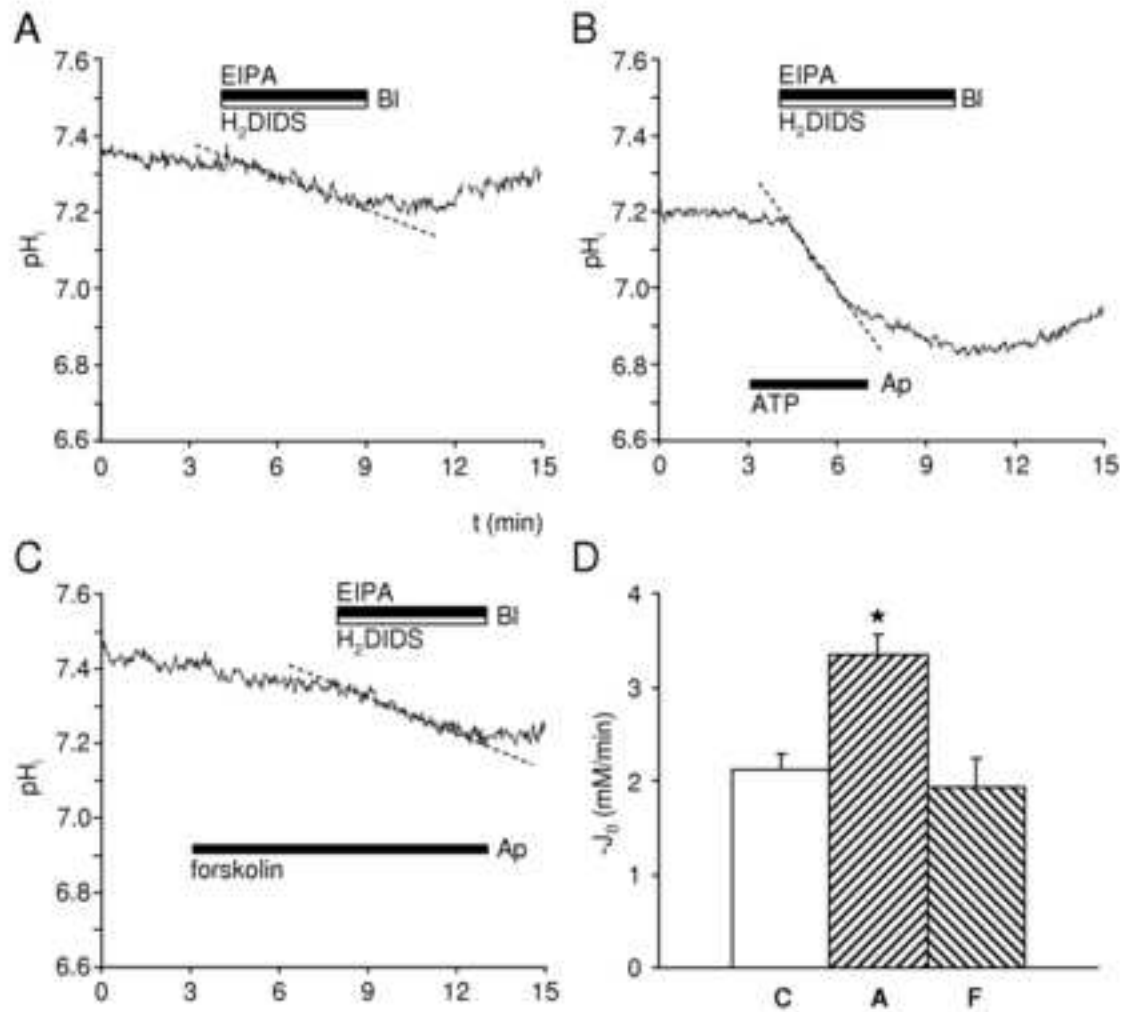
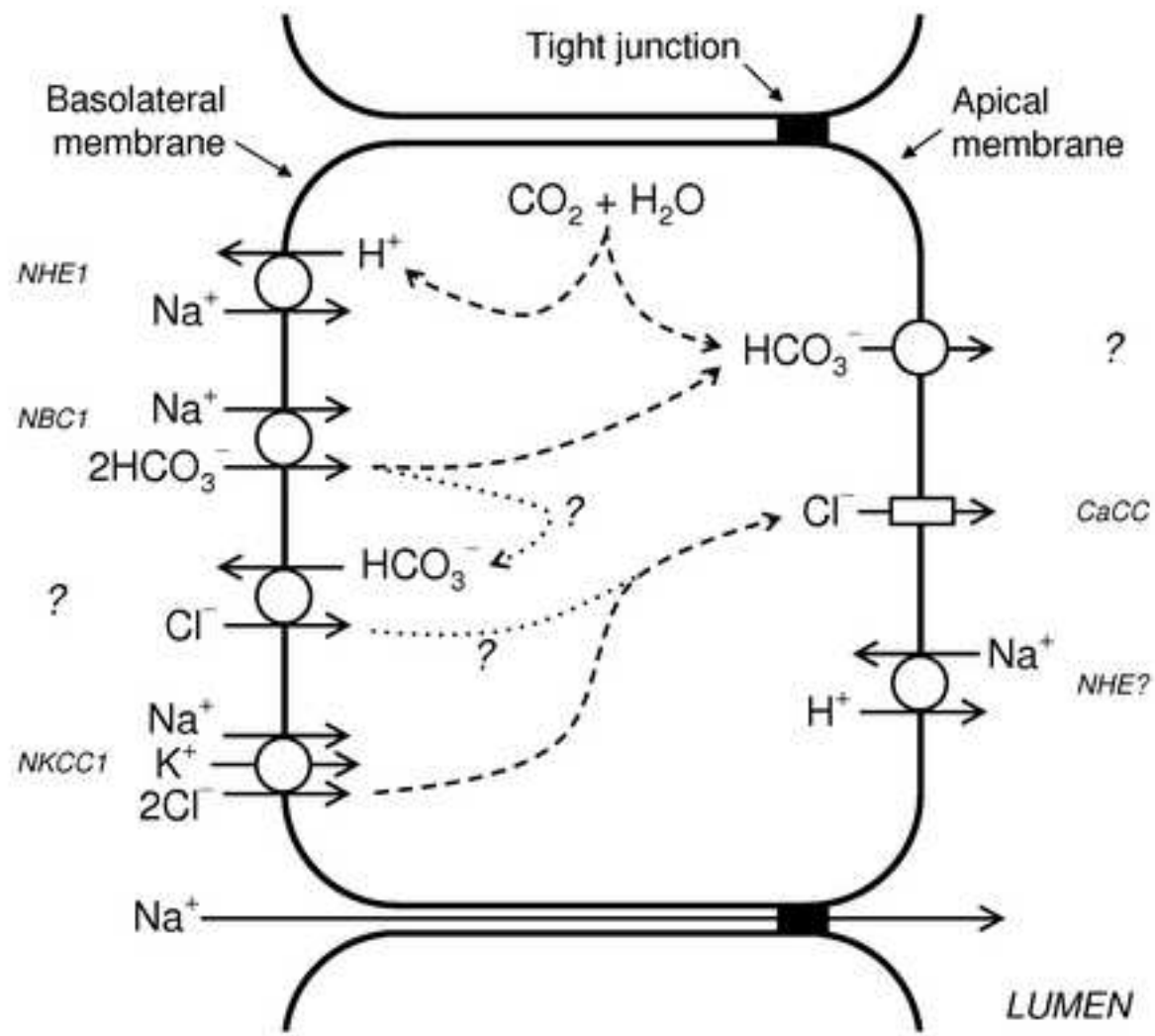


Figure  
[Click here to download high resolution image](#)



Demeter et al., Fig. 7