

## F. Zusammenfassung

Kurzkettige Fettsäuren (SCFA, short chain fatty acids) werden in erheblichem Umfang im Dickdarm resorbiert. Für den Transport von SCFA durch die Zellmembranen wird neben der Diffusion der protonierten, nichtionischen Form von SCFA auch ein Austausch gegen Bicarbonat sowohl für die apikale als auch für die basolaterale Epithelzellmembran beschrieben. Der SCFA-Transport über beide Transportwege sollte in einer Abnahme des intrazellulären pH resultieren. Die Enterozyten schützen sich jedoch gegen hohe Protonenbelastungen der Zellen durch eine effektive  $\text{pH}_i$ -Regulation über Austauscher, wie den  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher und den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher, in der basolateralen Membran.

Ziel dieser Arbeit war es, eine Methode zur Messung des pH an der basolateralen Membran ( $\text{pH}_b$ ) von Caecumepithelien des Meerschweinchens zu entwickeln und zu etablieren. Mit dieser Methode sollte der Einfluß des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers und des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers an der basolateralen Membran und der Einfluß von SCFA,  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  und  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  auf den  $\text{pH}_b$  untersucht werden. Durch die  $\text{pH}_b$ -Änderungen sollten Rückschlüsse auf die Aktivität der Austauscher und auf den SCFA-Transport möglich sein. Weiterhin sollte untersucht werden, ob an der basolateralen Membran ein konstantes pH-Mikroklima existiert, wie es für die apikale Membran von Dickdarmepithelien von mehreren Autoren beschrieben worden war.

Der  $\text{pH}_b$  wurde mit Hilfe fluorometrischer Methoden mit einem pH-sensitiven Fluorochrom ermittelt. Als geeignet für eine kontinuierliche  $\text{pH}_b$ -Messung erwiesen sich FITC-markierte Lektine der Gattung *lens culinaris*, da das Fluorochrom durch die Lektine an der basolateralen Membran der Enterozyten haftete ohne Einfluß auf elektrophysiologische Zellvorgänge zu haben.

Messungen des Basal- $\text{pH}_b$  ergaben, daß der  $\text{pH}_b$  unter physiologischen Bedingungen (in Anwesenheit von  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$ ) leicht alkalisch ist und über dem pH der Perfusionslösung liegt. An der basolateralen Membran von Caecumepithelien konnte kein vom pH der serosalen Lösung unabhängiges pH-Mikroklima nachgewiesen werden, da der  $\text{pH}_b$  Änderungen des pH in der Perfusionslösung folgte.

Änderungen des  $\text{pH}_b$  bei der Aktivierung und Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers und des  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers an der basolateralen Membran demonstrierten, daß beide Austauscher für die Regulation des  $\text{pH}_i$  von Bedeutung sind. Der basolaterale  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher bewirkt als sogenannter „acid loader“ eine  $\text{pH}_i$ -Abnahme bei zu hohen intrazellulären  $\text{pH}$ -Werten und ermöglicht unter physiologischen Bedingungen durch den Bicarbonatefflux nach serosal einen leicht alkalischen  $\text{pH}_b$  an der basolateralen Membran. Der  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauscher an der basolateralen Membran ist ein wichtiger „acid extruder“, der durch intrazelluläre Ansäuerungen aktiviert wird und dann mit MIA gehemmt werden kann.

Die Änderungen des  $\text{pH}_b$  bei transepithelialen  $\text{CO}_2$ - $\text{HCO}_3^-$ -Gradienten deuten auf eine geringere Permeabilität der apikalen Membran für  $\text{CO}_2$  im Vergleich zur basolateralen Membran der Caecumterozyten hin. Die Auswirkungen von transepithelialen  $\text{CO}_2$ -Gradienten auf den  $\text{pH}_b$  sind dabei von der Aktivität des Enzyms Carboanhydrase abhängig.

Die mucosale Perfusion mit  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -haltiger Lösung bewirkte eine Zunahme des  $\text{pH}_b$ , was auf eine Diffusion der nichtionischen Form, des  $\text{NH}_3$ , schließen läßt. Die Änderungen des  $\text{pH}_b$  bei serosaler Zugabe von  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  deuten darauf hin, daß über die basolaterale Membran sowohl  $\text{NH}_3$  als auch  $\text{NH}_4^+$  transportiert wird.

Sowohl die mucosale als auch die serosale Zugabe von SCFA bewirkten Änderungen des  $\text{pH}_b$ . Die mucosale Zugabe von SCFA verursachte unabhängig von der Anwesenheit von  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  eine Abnahme des  $\text{pH}_b$ , was zunächst auf eine Diffusion der protonierten Form von SCFA hinwies. Änderungen des  $\text{pH}_b$  bei mucosaler SCFA-Zugabe in Anwesenheit von transepithelialen  $\text{CO}_2$ - $\text{HCO}_3^-$ -Gradienten und bei einer Hemmung der Carboanhydrase führten zu der Vermutung, daß SCFA in der protonierten Form und in der anionischen Form über die apikale Membran transportiert werden. Die serosale Zugabe von SCFA führte zu einer  $\text{pH}_b$ -Zunahme. In Anwesenheit von  $\text{CO}_2$  und  $\text{HCO}_3^-$  war dieser Anstieg des  $\text{pH}_b$  jedoch nur kurzzeitig. Der  $\text{pH}_b$  kehrte noch während der Perfusion mit SCFA zum Ausgangs- $\text{pH}_b$  zurück. Die Entfernung von SCFA aus der Perfusionslösung rief einen „overshoot“ des  $\text{pH}_b$  hervor. Die Rückkehr des  $\text{pH}_b$  zum Ausgangs- $\text{pH}_b$  während der Perfusion mit SCFA konnte nicht durch Hemmung des  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers oder den  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauschers beeinflußt

werden. Allerdings weisen Untersuchungen darauf hin, daß der SCFA<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher an der basolateralen Membran an der Rückkehr zum Ausgangs-pH<sub>i</sub> beteiligt sein kann. Versuche mit CO<sub>2</sub>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Gradienten bei Hemmung der Carboanhydrase und bei serosaler SCFA-Zugabe geben Anhaltspunkte, daß über SCFA-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher an der apikalen und basolateralen Membran Konzentrationsgradienten für SCFA aufgebaut werden, die eine Diffusion der protonierten Form von SCFA zurück zur serosalen Seite und damit eine Abnahme des pH<sub>i</sub> begünstigen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß an der basolateralen Membran von Caecumepithelien kein konstantes pH-Mikroklima existiert. Der pH<sub>i</sub> in Anwesenheit von CO<sub>2</sub> und HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> ist alkalischer als der pH der Perfusionslösung. Eine Hemmung oder Aktivierung des Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup>-Austauschers oder des Cl<sup>-</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauschers an der basolateralen Membran spiegeln sich in Änderungen des pH<sub>i</sub> wider. Die Änderungen des pH<sub>i</sub> in Anwesenheit von SCFA deuten auf einen SCFA-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>-Austauscher in der basolateralen Membran hin.

## **G. Summary**

**S. Kirschberger:**

### **Surface pH of the basolateral membrane of the caecal mucosa of guinea pig and the effect of short chain fatty acids, bicarbonate and ammonia on the pH at the basolateral membrane**

Transport of short chain fatty acids (SCFA) implies a considerable displacement of protons across the cell membranes of hind-gut enterocytes. Since major mechanisms responsible for regulation of intracellular pH of enterocytes are located in the basolateral membrane, respective effects may be expected on the pH in the compartment near the basolateral membrane.

The aim of the present study was to develop and establish a method for estimating the pH at the basolateral membrane ( $\text{pH}_b$ ) of isolated caecal epithelia of guinea pig using pH-sensitive fluorescein attached to lectin (*lens culinaris*).

This fluorochrome was a suitable tool for measurements of the  $\text{pH}_b$ . The lectin attached to glycoproteines of the basolateral membrane of the enterocytes and remained there for more than two hours. The extracellular localization of the FITC-labelled lectins at the basolateral membrane was shown with confocal microscopy and by adding anti-fluorescein antibody. Ussing-chamber experiments proved that neither the short circuit current nor the transepithelial resistance of the caecal mucosa were affected by FITC-labelled lectins. As for calibration the high  $\text{K}^+$ /nigericin method was used.

Subsequent investigation should show the effect of SCFA,  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  and  $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$  on the  $\text{pH}_b$  and the effect of the mechanisms responsible for intracellular regulation on the  $\text{pH}_b$ . Furthermore the existence of a constant pH-microclimate at the basolateral membrane should be investigated.

The  $\text{pH}_b$  in the presence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$  was slightly more alkaline than the perfusion solution and was maintained by the efflux of bicarbonate across the basolateral membrane. However, the alkaline  $\text{pH}_b$  followed  $\text{pH}$ -changes in the perfusion solution. At the surface of the basolateral membrane of the caecal mucosa a constant  $\text{pH}$ -microclimate could not be found.

Changes of the  $\text{pH}_b$  due to activation and inhibition of both the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger and the  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger confirmed that these exchangers are important for  $\text{pH}_i$ -regulation. The basolateral  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchanger secretes bicarbonate as an "acid loader" and contributes to the alkaline  $\text{pH}_b$  under physiological conditions (in the presence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ ). The basolateral  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger seems to be activated by intracellular proton loads and transports protons out of the cell. In the absence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ , the  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchanger is an important "acid extruder".

Transepithelial gradients for  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$  caused smaller  $\text{pH}_b$ -changes, when  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$  was present only on the mucosal side than a  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ -gradient from the serosal to the mucosal side. The extent of the  $\text{pH}_b$ -changes refers to a different permeability of the apical and the basolateral membrane for  $\text{CO}_2$ . The effects of  $\text{CO}_2$ -fluxes on  $\text{pH}_b$  depend on the presence and activity of the enzyme carbonic anhydrase.

The  $\text{pH}_b$ -changes observed at mucosal addition of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  seems to be caused by the diffusion of  $\text{NH}_3$ . The serosal addition of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  led to  $\text{pH}_b$ -changes, that suggest a transport of  $\text{NH}_3$  as well as of  $\text{NH}_4^+$  across the basolateral membrane.

Addition of SCFA to the luminal side of the epithelium decreased  $\text{pH}_b$  only slightly.  $\text{pH}_b$  changes were similar in the presence and in the absence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$  and were first interpreted by a diffusion of SCFA in the protonated form. However, changes of the  $\text{pH}_b$  at mucosal addition of butyrate and transepithelial gradients for  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$  indicate that SCFA might also be transported by an SCFA- $\text{HCO}_3^-$  exchanger at least across the apical membrane.

For a better understanding of the transport and regulation processes at the basolateral membrane caused by SCFA, SCFA were added to the serosal side of the epithelium. In contrast to the  $\text{pH}_b$ -changes due to mucosal SCFA-addition the  $\text{pH}_b$ -changes caused by serosal addition of SCFA differed significantly in the presence and in the absence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ . SCFA caused an initial  $\text{pH}_b$ -increase in the presence and in the absence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ . This initial alkalization of  $\text{pH}_b$  was interpreted partly as a diffusion of SCFA in the protonated form across the basolateral membrane. But the  $\text{pH}_b$ -increase in the presence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$  was significant larger than the  $\text{pH}_b$ -increase in the absence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ . Thus in  $\text{CO}_2$ -and  $\text{HCO}_3^-$ -containing solution an additional transport of SCFA-anions by a SCFA- $\text{HCO}_3^-$  exchanger across the basolateral membrane into the cell was supposed. As the  $\text{pH}_b$  remained alkaline during the perfusion with SCFA in the absence of  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$  the  $\text{pH}_b$  returned to basic pH-values in the presence of SCFA,  $\text{CO}_2$  and  $\text{HCO}_3^-$ . First of all the transient  $\text{pH}_b$ -changes were assumed to be caused by exchange mechanisms in the basolateral membrane, the  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  exchanger and the  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger. It was therefore unexpected that after inhibition of the basolateral  $\text{Na}^+$ - $\text{H}^+$  exchanger and the  $\text{Cl}^-$ - $\text{HCO}_3^-$  exchanger separately or simultaneously the addition of SCFA to the serosal perfusion solution caused similar  $\text{pH}_b$  changes as compared to those observed in the experiments without an inhibition. These findings support the presence of an SCFA- $\text{HCO}_3^-$  exchanger in the basolateral membrane. The SCFA- $\text{HCO}_3^-$  exchanger might transport SCFA-anions in exchange with bicarbonate due to the concentration gradient into the epithelial cells. Because of this exchange the  $\text{pH}_b$  would further increase. However, the transport of SCFA-anions into the epithelial cells may result in an intracellular displacement of the equilibrium of SCFA-anions and SCFAH leading to an increased intracellular concentration of SCFAH. The diffusion of SCFAH out of the cell back to the basolateral side might cause the return to the basic  $\text{pH}_b$ .

It was concluded that no pH-microclimate exists at the basolateral side. The regulation of the intracellular pH of enterocytes reflects  $\text{pH}_b$ . The slightly alkaline  $\text{pH}_b$  is due to bicarbonate secretion. Data support the presence of an SCFA $^-$ - $\text{HCO}_3^-$  exchange.