

Regulation des elektrogenen Natrium Bikarbonat Kotransporters NBCe1 und der pH-Homöostase im Kolon der Maus

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover

Zur Erlangung des Grades
Doktor der Naturwissenschaften, Dr. rer. nat.,

genehmigte Dissertation
von

Dipl.-Biol. Oliver May

geboren am 17.09.1980 in Oldenburg

Diese Arbeit wurde in der Abteilung für Gastroenterologie, Hepatologie und Endokrinologie der Medizinischen Hochschule Hannover im Labor von PD Dr. med. Oliver Bachmann in Kollaboration mit Prof. Dr. med. Ursula Seidler angefertigt.

Referent: PD Dr. med. Oliver Bachmann

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Christian Stock

Vorsitzender: Prof. Dr. rer. nat. Anaclet Ngezahayo

Tag der Promotion: 22.10.2015

Zusammenfassung

Der transepitheliale Transport von Bikarbonat (HCO_3^-) innerhalb des intestinalen Epitheliums beeinflusst die pH-Homöostase und ist bei entzündlichen Darmerkrankungen dysreguliert. In einer Kooperation wurde deshalb die HCO_3^- -Homöostase bei chronischer Entzündung innerhalb des murinen Kolon untersucht. Der Na^+/H^+ -Austauscher 3 (NHE3) hatte keinen Einfluss auf die beobachtete erhöhte luminale Alkalisierung des entzündeten proximalen Kolon. Diese ist nicht mit einer Transporter-vermittelten erhöhten HCO_3^- -Sekretion, sondern durch eine verstärkte parazelluläre HCO_3^- -Durchlässigkeit der Schlussleisten erklärbar. Ein basolateraler HCO_3^- -Importweg in murinen Kolonkrypten erfolgt durch die überwiegend exprimierte $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransporter Isoform NBCe1-B. Die Protein Kinase C (PKC) spielt bei der Regulation des Ionentransportes eine Schlüsselrolle. Ziel der Untersuchungen war es daher, den Einfluss der PKC auf den NBCe1-B mediierten HCO_3^- -Transport auf zellulärer Ebene während der Stimulation muriner Kolonkrypten zu untersuchen. Die PKC α , δ und γ Isoformen wurden in unmittelbarer Nähe des NBCe1-B lokalisiert und deren Phosphorylierung und Translokation wurde nach Stimulation mit Carbachol, Forskolin und Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) gemessen. Eine Inhibition der PKC hat weder die Funktion, noch die Oberflächenexpression des NBCe1-B verändert, bewirkte jedoch bei paralleler Stimulation mit Forskolin oder Carbachol eine verringerte NBCe1-B Membranexpression. Der NBCe1-B mediierte Protonenfluss war PKC abhängig, an der Wiederherstellung der pH-Homöostase nach Azidifikation beteiligt und wurde durch Forskolin stark erhöht. Zusammengefasst erfolgt eine Translokation und Phosphorylierung von PKC Isoformen nach cholinergem und cAMP-vermittelter Stimulation in murinen Kolonkrypten und die PKC ist für eine erhöhte NBCe1-B Transportrate und Oberflächenhäufigkeit notwendig.

Schlagerworte: HCO_3^- , PKC, NBCe1-B

Abstract

It is generally known that transepithelial transport of bicarbonate (HCO_3^-) within the intestinal epithelium affects pH homeostasis and is dysregulated during chronic inflammation of the gut. We therefore examined the HCO_3^- homeostasis of the inflamed murine colon. The Na^+/H^+ exchanger 3 (NHE3) did not affect the increased luminal alkalization rates, which were observed for the inflamed proximal colon. Within the colon, the enhanced leakage of HCO_3^- did not lead to an increased HCO_3^- secretion, but resulted in an increased paracellular tight junctional permeability. One important basolateral HCO_3^- import pathway in murine colonic crypts is maintained by the predominantly expressed $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter isoform NBCe1-B. The Protein kinase C (PKC) plays a key role in the regulation of ion transport but however, the regulatory mechanisms, regarding NBCe1-B modulation are unknown. Therefore, this thesis is trying to clarify the contribution of the PKC in affecting the regulatory mechanisms involved in NBCe1-B mediated HCO_3^- transport in murine colonic crypts. First, the location of PKC α , δ , and γ isoforms was investigated in close proximity to the NBCe1-B and stimulation with forskolin, carbachol, and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) lead to PKC phosphorylation and translocation. Then, PKC inhibition alone neither altered NBCe1-B function, nor changed its surface expression, but concurrent stimulation with forskolin or carbachol decreased NBCe1-B membrane abundance. NBCe1-B mediated proton flux was PKC dependent and contributed to pH homeostasis after acidification of murine colonic crypts. In addition, the NBCe1-B dependent proton flux was strongly increased by forskolin, and became minimized after inhibition of PKC. In summary, we found that the translocation and phosphorylation of PKC isoforms occurred after cholinergic and cAMP mediated stimulation of murine colonic crypts. Furthermore, the experimental results show that both the enhanced NBCe1-B transport rate and surface abundance is PKC dependent.

Keywords: HCO_3^- , PKC, NBCe1-B

Abkürzungsverzeichnis

μl	mikroliter
μM	mikroMol
AC	Adenylylcyclase
AE1	Anion Exchanger 1/SLC4A1
AE2	Anion Exchanger 2/SLC4A2
AK	Antikörper
ANGII	Angiotensin II
ANOVA	Analysis of variance
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintri-phosphat
BSA	Bovine serum albumin
CA	Karboanhydrase
Ca^{2+}	Calcium
CaM	Calmodulin
CaMKII	Ca^{2+} /Calmodulin-aktivierte Kinase II
cAMP	cyclic adenosine monophosphate
CED	Chronisch entzündliche Darmerkrankungen
CFTR	Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
Cl^-	Chlorid
CO_2	Kohlenstoffdioxid

CU	Colitis ulcerosa
DAG	1,2-Diacylglycerin
DIDS	4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid
DMA	5-(N, N-DiMethyl)amilorid
DRA	Down regulated in adenoma / SLC26A3
DTT	Dithiothreitol
ENaC	Epithelialer Na ⁺ -Kanal
Epac	exchange protein directly activated by cAMP
ER	Endoplasmatisches Retikulum
Gö6850	bisindolylmaleimide 3-[1-[-3-(dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-4-(1H-indol-3-yl)-1H-pyrrole-2,5-dione monohydrochloride
Gö6976	12-(2-Cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo[2,3-a]pyrrolo[3,4-c]carbazole
H ⁺	Proton
H ₂ CO ₃	Kohlensäure
HCO ₃ ⁻	Bikarbonat, Hydrogenkarbonat
HEPES	4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid
HSD	Honestly significant difference test
IgG	Immunoglobulin G
IP ₃	Inositol 1,4,5-triphosphat
IP ₃ R	Inositol 1,4,5-triphosphat (IP ₃) Rezeptor

IRBIT	Inositol-1,4,5-triphosphate (IP ₃) receptor binding protein released with IP ₃
I _{sc}	Kurzschlussstrom
KCl	Kaliumchlorid
mA	milliAmpere
MARCKS	Myristoylated alanine-rich C kinase substrate
MC	Morbus Crohn
mM	milliMol
mTOR	mammalian target of rapamicin
mTORC1/2	mammalian target of rapamicin complex 1/2
mV	milliVolt
Na ⁺	Natrium
Na ⁺ Cl ⁻	Natriumchlorid
NBC	Natrium-Bikarbonat Kotransport
NBCe1	elektrogener Natrium-Bikarbonat Kotransporter 1 / SLC4A4 / NBCe1-B / pankreatischer NBCe1
NBCe2	elektrogener Natrium-Bikarbonat Kotransporter 2 / SLC4A5 / NBCe1-A / renaler NBCe1
NBCn1	elektroneutraler Natrium-Bikarbonat Kotransporter 1 / SLC4A7
NH ₄ ⁺	Ammoniumchlorid
NHE1	Na ⁺ /H ⁺ exchanger 1 / SLC9A1

NHE3	Na ⁺ /H ⁺ exchanger 3 / SLC9A3
NKCC1	Natrium-Kalium-2Chlorid Kotransporter 1 / SLC12A2
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
OH ⁻	Hydroxidion
OSD	Optical density integrated
PAT1	putative anion transporter 1 / SLC26A6
PBS	Phosphat buffered saline
PBST	Phosphat buffered saline + 20% Tween 20
PD	Potentialdifferenz
PK1	3-Phosphoinositide-dependent kinase 1
PDZ	Post synaptic density protein (PSD95), Drosophila disc large tumor suppressor (Dlg1), Zonula occludens-1 protein (zo-1)
PH	Pleckstrin homology
pH _i	intrazellulärer pH
PI3K	Phosphoinositid 3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphat
PIP ₃	Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat
PKA	Protein Kinase A
PKB	Protein Kinase B / Akt
PKC	Protein Kinase C
PLC	Phospholipase C

PMA	Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PRAS40	proline-rich Akt/PKB substrate 40kDa
R_t	transepithelialer Gewebewiderstand
SCFA	Short chain fatty acids; kurzkettige Fettsäuren
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SERCA2	sarkoplasmatische Retikulum Ca^{2+} -ATPase
SOCs	store-operated Ca^{2+} channels
SPAK	4-Ste20-related proline-alanine-rich kinase
SR	sarkoplasmatisches Retikulum
STAS	Sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist
TMA	Tetramethylammonium
TNF α	Tumor necrosis factor- α
TRIS	Tris (hydroxymethyl)-aminomethane
V	Volt
V_t	transepitheliales Spannungspotential
WNK	With no lysine protein kinase

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Beteiligte Ionentransporter bei der elektroneutralen Na^+Cl^- -Absorption	5
Abbildung 2: Beteiligte Ionentransporter bei der elektrogenen Na^+Cl^- -Absorption	7
Abbildung 3: Beteiligte Transporter bei der Anionensekretion	9

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete Puffer für die Fluorometrie	95
Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie.....	96
Tabelle 3: Verwendete Puffer für die Oberflächenbiotinylierung.....	97

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	I
Abstract	II
Abkürzungsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VIII
Tabellenverzeichnis	VIII
1 Einleitung	1
1.1 Elektrolyttransport im Kolon	3
1.1.1 Elektroneutrale Na ⁺ Cl ⁻ Absorption.....	4
1.1.2 Elektrogene Na ⁺ Cl ⁻ -Absorption.....	5
1.2 Anionentransport und Transporterexpression des Kolon.....	7
1.2.1 Stimulation der Anionensekretion.....	11
1.3 Regulation der pH-Homöostase	12
1.4 Natrium Bikarbonat Kotransporter	13
1.4.1 Lokalisation des NBC.....	14
1.5 Protein Kinase C	16
2 Ergebnisse	19
2.1 Publikation „Short Term Regulation of Murine Colonic NBCe1-B (Elektrogenic Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ Cotransporter) Membrane Expression and Activity by Protein Kinase C“.....	19
2.2 Publikation „Increased Epithelial Permeability Is the Primary Cause for Bicarbonate Loss in Inflamed Murine Colon“	28
3 Diskussion	37
3.1 HCO ₃ ⁻ -Transport und epitheliale Integrität des entzündeten Kolon	37
3.2 Aktivierung der PKC durch Forskolin, Carbachol und PMA	39
3.2.1 Phosphorylierung und Aktivierung der PKC durch mTOR	41
3.2.2 Degradation von PKC Isoformen	42
3.3 Regulation des NBCe1-B durch Sekretagoga und PKC	45
3.3.1 Autoinhibition des elektrogenen Na ⁺ /HCO ₃ ⁻ Kotransporter.....	49
3.3.2 Aktivierung des NBCe1 durch IRBIT und Freisetzung von Ca ²⁺	50
3.3.3 Regulation des Anionentransports durch IRBIT	51
3.3.4 Regulation der Ca ²⁺ -Freisetzung und von IRBIT durch PKC	51
3.3.5 Regulation der Anionensekretion durch intrazellulärs Chlorid.....	53
4 Fazit.....	55
5 Therapeutische Anwendung	55
5.1 Ausblick	57

6	Literaturverzeichnis.....	59
Anhang A	Material	89
	Geräte	89
	Verbrauchsmaterial	91
	Chemikalien.....	93
Anhang B	Puffer und Lösungen	95
	Lösungen für die Fluorometrie.....	95
	Lösungen für die Immunhistochemie.....	96
	Lösungen für die Oberflächenbiotinylierung	97
Anhang C	Methoden.....	98
	Präparation muriner Kolonkrypten.....	98
	Oberflächenbiotinylierung.....	98
	Vorbereitung des Sammel- und Tennegels	99
	Immunoblotting	100
	Immunhistochemie	102
	Fluorometrie	103
	Ussing Kammer.....	104
Anhang D	Regulation der PKC.....	108
Anhang D. 1.	Enzymatische Aktivierung der PKC Isoformen	108
Anhang D. 2.	Phosphorylierung der PKC durch mTOR.....	110
Anhang D. 3.	Regulation und Interaktion der mTOR Komplexe	111
Anhang D. 4.	Interaktion der PKC mit Karboanhydrasen	112
Anhang D. 5.	Einfluss der PKC auf Ca ²⁺ - und cAMP-Signalwege	113
Anhang D. 6.	Regulation der PKC durch PMA.....	115
Anhang D. 7.	Negative Rückkopplung der PKC	116
Anhang E	Regulation der Anionensekretion durch PKC	117
Anhang F	PKC-abhängige Interaktion von CFTR, DRA und NHE3	119
Anhang G	Regulation der Elektrolytaborption durch die PKC.....	121
Anhang H	Regulation der Transportstöchiometrie des NBC.....	121
	Danksagung.....	123
	Curriculum Vitae.....	124

1 Einleitung

Die verschiedenen Segmente des Gastrointestinaltraktes erfüllen unterschiedliche Aufgaben, damit über Absorption und Sekretion der Nährstoff-, Elektrolyt- und Wassertransport erfolgen kann (193). Darüber hinaus wird über den Transport von Protonen (H^+) und HCO_3^- der lumenale und intrazelluläre pH (pH_i) reguliert (5, 316). Durch das Neutralisieren luminaler Säuren und die Bildung einer protektiven Mukusschicht werden die Integrität des intestinalen Epitheliums und ein optimales lumenales Milieu für den Transport von Elektrolyten und Nährstoffen gewährleistet (317, 348, 394). Ist allerdings der Transport von Ionen dysreguliert, trägt dies neben einer veränderten Darmflora (181), Umweltfaktoren und genetischem Polymorphismus (113) und der Dysregulation des Immunsystems (31) zur Pathogenese von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) bei. In Deutschland leiden momentan mehr als 300.000 Menschen an Morbus Crohn (MC) und Colitis ulcerosa (CU). MC ist eine chronische Entzündung des Magen-Darm-Trakts, bei der schubweise segmentale Entzündungen im gesamten Darmbereich, jedoch hauptsächlich im Ileum und im Kolon auftreten können und sämtliche Schichten der Darmwand betroffen sind. Bei CU ist die Entzündung auf die Darmschleimhaut (Mukosa und Submukosa) des Kolon beschränkt. Die genauen Ursachen von MC und CU sind unbekannt und die Krankheiten sind nicht heilbar. Neben der kolonischen Absorption von Natriumchlorid (Na^+Cl^-) und Kaliumchlorid (K^+Cl^-) erfolgt die Cl^- -Resorption und Cl^-/HCO_3^- -Sekretion, die bei sekretorischer Diarrhö die Absorptionsraten übersteigt, wodurch eine dysregulierte Sekretion auftritt (19, 120, 193). Im Vergleich zu anderen intestinalen Segmenten weist das Kolon relativ hohe HCO_3^- -Transportraten auf (394) und bei CED kommt es zu einem veränderten Bikarbonattransport und einer dysregulierten luminalen HCO_3^- -Sekretion (104, 222, 394). Durch das gestörte Verhältnis von Säure-Basen-Äquivalenten wird wiederum die

Absorptionsfähigkeit des Kolon beeinflusst (127, 128) und die kolonische Funktion der Wiederaufnahme von Elektrolyten gestört. Eine physiologische Cl^- -Resorption und HCO_3^- -Sekretion ist jedoch Voraussetzung für den parazellulären, passiven Wassertransport entlang des osmotischen bzw. elektrochemischen Gradienten (177, 393). Als Ursache für den dysregulierten Ionentransport wird häufig sowohl eine veränderte Expression der Untereinheiten beteiligter Transporter (57, 133, 407), als auch eine veränderte Expression der Transporter beschrieben (19, 26, 344), wodurch dessen Funktionalität und/oder Regulation beeinträchtigt werden kann. Die Modulation der HCO_3^- -Sekretion durch die Protein Kinase C wurde innerhalb des murinen Duodenum (358), Jejunum (264) und des Pankreas von Meerschweinchen (151) beschrieben. Für den Dünndarm konnte die Beteiligung von Natrium Bikarbonat Kotransportern (NBCs) als wichtige Mediatoren des basolateralen HCO_3^- -Transports nachgewiesen werden (67, 281, 327), die in der Niere ebenfalls für die Säure-Basen- und Elektrolythomöostase wichtig sind (332). Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten zudem, dass die Sekretagoga Forskolin und Carbachol innerhalb des murinen Kolon den elektrogenen Natrium Bikarbonat Kotransporter NBCe1-B stimulieren, woran vermutlich PKC-abhängige Signalwege beteiligt sind (17, 18, 404). Obwohl die basolaterale Aufnahme von HCO_3^- in intestinale Epithelzellen den intrazellulären pH reguliert und als der limitierende Faktor der transepithelialen HCO_3^- -Sekretion angesehen wird (5, 171, 315, 316), sind die regulatorischen Eigenschaften der PKC bei der intestinalen basolateralen HCO_3^- -Aufnahme durch den NBCe1-B innerhalb des murinen Kolon wenig erforscht.

Ein weiterer Aspekt des dysregulierten Ionentransports bei CED stellt die Regulation sogenannter Schlussleisten dar, die zwischen benachbarten Epithelzellen lokalisiert sind und parazelluläre Diffusionsbarrieren bilden. Eine gestörte Integrität des gastrointestinalen Epitheliums bei chronischer Entzündung ist mit einer veränderten Expression der Komponenten von

Schlussleistenkomplexen und einer erhöhten parazellulären Durchlässigkeit von Ionen korreliert (90, 131, 370, 408). Bestandteile der Schlussleisten sind Claudine und Occludine, die als Transmembranproteine innerhalb der Schlussleistenkomplexe exprimiert werden, und maßgeblich dessen Barriereigenschaften beeinflussen (115, 192, 215). Die unterschiedliche Expression von Claudinen und Occludinen moduliert die Permeabilität bzw. Anionen- und Kationenselektivität der Schlussleisten (191, 192). Diarrhö ist mit einer Störung der Säure-Basen-Homöostase und mit einem erhöhten luminalen Anteil von Cl^- und HCO_3^- assoziiert (108, 156, 345, 383). Die Bedeutung der veränderten Zusammensetzung der Schlussleistenkomplexe auf die Säure-Basen-Homöostase des intestinalen Epithels wurde aber bisher nicht untersucht.

1.1 Elektrolyttransport im Kolon

Die Absorptionsfähigkeit des Kolon von elektrolytreicher Flüssigkeit beruht auf der Absorption von Natriumchlorid (Na^+Cl^-), sowie der Aufnahme von Kalium (K^+) und kurzkettiger Fettsäuren (SCFA) (166, 193, 371). Die absorbierende Kapazität des Kolon ist mit bis zu zwei Litern pro Tag sehr effizient, da ca. 90% der Flüssigkeit und der darin enthaltenen Salze, welche das Kolon passieren, aufgenommen werden (88). Unter physiologischen Bedingungen absorbiert das Kolon Na^+ und Cl^- , wohingegen K^+ und HCO_3^- sezerniert werden (43). Die Absorption bzw. Sekretion von Wasser erfolgt passiv über die Homöostase von osmotischen Gradienten durch die aktive Bewegung von Na^+ und Cl^- oder HCO_3^- durch die Epithelzellen (177). Die Funktion der basolateralen Na^+/K^+ -ATPase liefert dabei die elektrochemische Triebkraft (79, 185, 223, 312). Durch das resultierende negative Potential und das chemische Ungleichgewicht werden die Aufnahme von Kationen, insbesondere von Na^+ und die Abgabe von Anionen und K^+ begünstigt. Allerdings sind aufgrund der geringen Permeabilität der Lipiddoppelschicht Ionentransporter für dessen Bewegung erforderlich.

Innerhalb des Dickdarms sind Kolonkrypten und das Oberflächenepithel zwei spezialisierte Kompartimente, die einen Expressionsgradienten von Iontentransportern und Kanälen entlang der Krypten-Villus-Achse aufweisen (386). Die meisten immunhistochemisch gefärbten „Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator“ (CFTR)-Kanäle, die bei der Sekretion von Cl^- und HCO_3^- beteiligt sind, wurden in Krypten des Dünn- und Dickdarm lokalisiert (82, 174, 356). In Zellen der Kryptenbasis werden zudem bei der Absorption beteiligte Transporter, wie des bei der elektrogenen Na^+ -Absorption beteiligten epithelialen Na^+ -Kanals (ENaC) kaum exprimiert, weshalb angenommen wird, dass die Kryptenbasis die sekretorische Funktion des Kolonepithels übernimmt (108, 132, 284, 386). Die apikalen Absorptionsmechanismen für Na^+ , Cl^- und K^+ , sowie die Sekretion von Cl^- und HCO_3^- sind von basolateralen Transportmechanismen abhängig und für die Homöostase des pH_i , der Volumenregulation und des elektrochemischen Gradienten essentiell (15, 91). Bei der Aufnahme von Na^+Cl^- wird zwischen elektroneutraler und elektrogener Absorption unterschieden.

1.1.1 Elektroneutrale Na^+Cl^- Absorption

Bei Nagetieren findet ein Großteil der elektroneutralen Na^+Cl^- Absorption im Austausch für Protonen (H^+) und HCO_3^- in Oberflächenepithelzellen und Krypten des distalen Dünndarm, sowie innerhalb der apikalen Membran des Kolon statt (193, 247, 283, 312, 329). Die apikale, elektroneutrale Aufnahme von Na^+ und Cl^- im Kolon wird hauptsächlich durch das Zusammenspiel des Na^+/H^+ Austauschers 3 (NHE3; SLC9A3) und des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauschers DRA (SLC26A3) bewerkstelligt, die in der apikalen Membran der Enterozyten exprimiert werden (234, 309, 310). Innerhalb des Dickdarms findet parallel zu der elektroneutralen Absorption von Na^+ und Cl^- die luminalen Basalsekretion von HCO_3^- und Protonen statt (247), weshalb hauptsächlich DRA und NHE3 als Mediatoren der Na^+Cl^- -Absorption angesehen werden (19, 193). Die basolaterale

Na^+/K^+ -ATPase generiert durch den Natrium-Export einen Na^+ -Gradienten, woraufhin Na^+ apikal über NHE3 importiert wird und gleichzeitig durch den Efflux von H^+ , das subapikale Zytoplasma alkalisiert wird (312). Der steigende pH_i aktiviert den luminalen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch durch DRA und folglich den Cl^- -Import und HCO_3^- -Export (177, 193, 196). NHE3 und DRA haben eine Stöchiometrie von jeweils 1:1, weshalb die Ladungsverteilung auf beiden Seiten der Membran nicht verändert wird und somit elektroneutrale Na^+Cl^- -Absorption erfolgt. Eine Übersicht der Ionentransportern, die bei der elektroneutralen Na^+Cl^- -Absorption beteiligt sind, ist in Abb. 1 dargestellt.

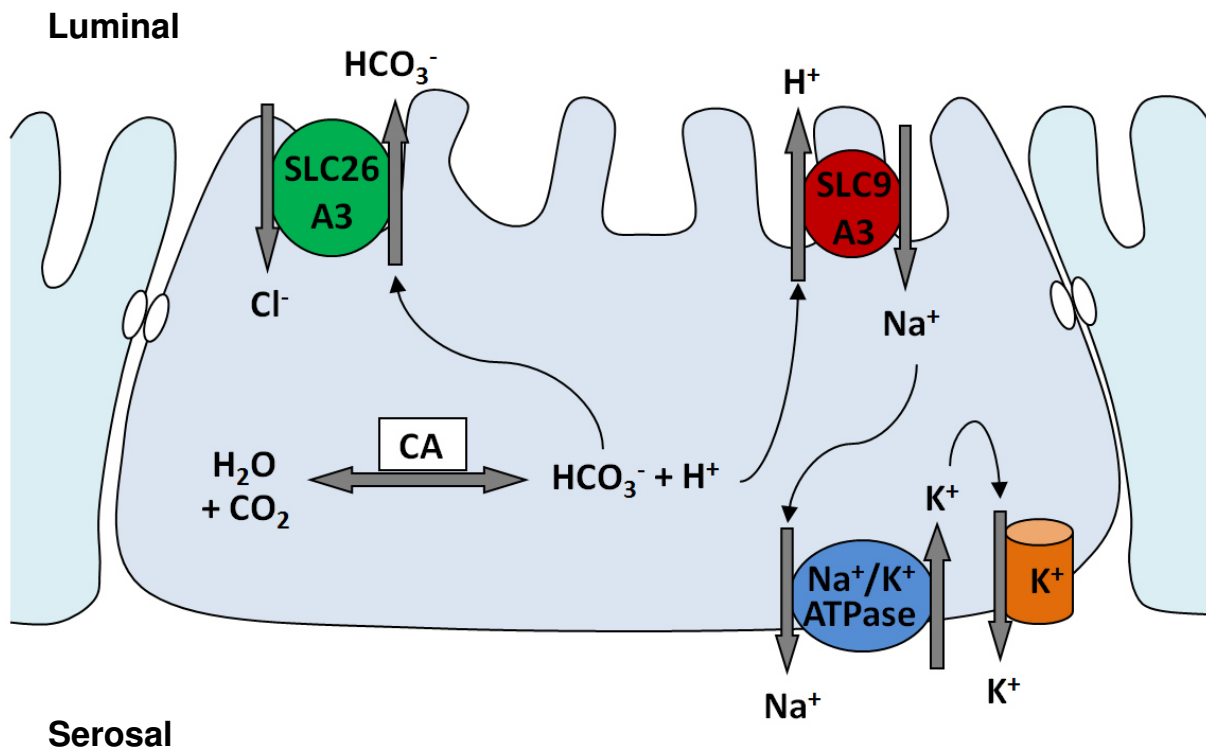


Abbildung 1: Beteiligte Ionentransporter bei der elektroneutralen Na^+Cl^- -Absorption des murinen Kolon

1.1.2 Elektrogene Na^+Cl^- -Absorption

Schon früh wurde die elektrogene Absorption von Na^+ und Cl^- als hauptsächlichster Aufnahmemechanismus des distalen humanen Kolon sowie bei

Kaninchen und Nagetieren beschrieben (188, 220, 280). Die elektrogene Absorption ist auf den oberen Teil der Krypten des distalen Kolon begrenzt (132, 188, 386) (siehe Abb. 2). Es wurde schon früh gezeigt, dass die apikale, elektrogene Na^+ -Absorption über den spannungsabhängigen, Amilorid-sensitiven, epithelialen Na^+ -Kanal ENaC gegen einen hohen Konzentrationsgradienten erfolgt (301, 347, 362, 402). Der transepitheliale Widerstand des Kolon ist höher als bei anderen gastrointestinalen Segmenten und die transepitheliale Spannung übersteigt -20mV , was die Triebkraft für die Aufnahme von Na^+ gegen einen hohen Konzentrationsgradienten liefert (177). Na^+ kann dadurch über ENaC in die Enterozyten aufgenommen werden, was die luminale Membran depolarisiert, wodurch Cl^- -Ionen über den Cl^- -Kanal CFTR in die Zelle gelangen. Das Schlüsselprotein für den Na^+ -Export (und K^+ -Import) über die basolaterale Membran und die damit verbundene Aufrechterhaltung des elektrochemischen Gradienten ist, wie bei der elektroneutralen Na^+Cl^- -Absorption, die basolaterale Na^+/K^+ -ATPase (185), die entlang der gesamten Krypten-Villus-Achse exprimiert und Na^+ -abhängig ist (79). Über den Export von 3 Na^+ und den Import von 2 K^+ erhält die Na^+/K^+ -ATPase ein negatives Potential der Zelle (193). Durch die ENaC- und CFTR-medierte hypertotonische ElektrolytabSORPTION entsteht ein osmotischer Gradient, wodurch Wasser para- und transzellulär über Aquaporine in die Epithelzellen aufgenommen werden kann. Die parazelluläre Cl^- -Aufnahme trägt ebenfalls zur elektrogenen Na^+Cl^- -Absorption bei, allerdings ist der Anteil der parazellulären Cl^- -Absorption durch den parazellulären Gewebewiderstand begrenzt (124). Bei der elektrogenen und elektroneutralen Absorption von Na^+Cl^- ist der genaue basolaterale Cl^- -Exportweg noch unklar, erfolgt aber vermutlich durch die Beteiligung basolateraler Cl^- -Kanäle, K^+/Cl^- -Kotransporter und/oder durch $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch (6, 132, 193, 284, 387).

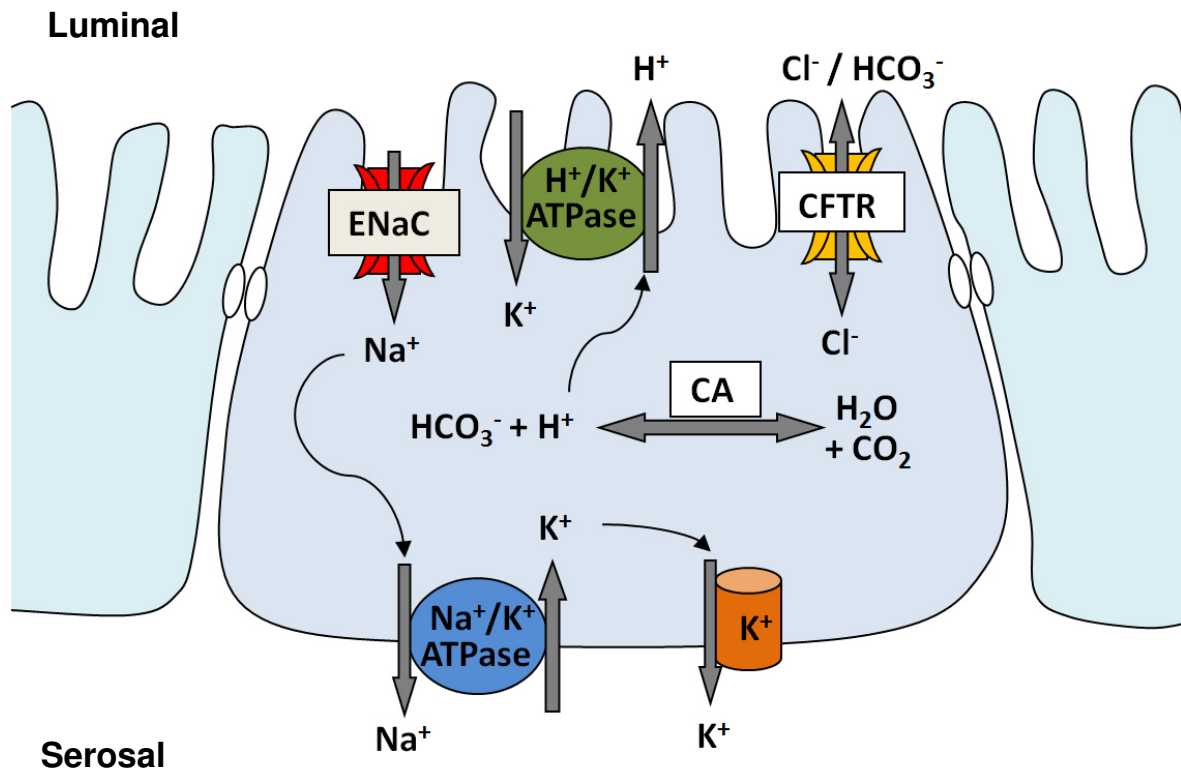


Abbildung 2: Beteiligte Ionen-Transporter bei der elektrogenen Na^+Cl^- Absorption des murinen Kolon

1.2 Anionentransport und Transporterexpression des Kolon

Die HCO_3^- -Sekretion des Kolonepithels beeinflusst das luminaire Milieu (121), ist essentiell für die Wundheilung (106), die korrekte Mukusekretion (117), um die Mukosa vor luminaler Säure und vor bakterieller Infektion zu schützen (176, 294). Durch die luminaire HCO_3^- -Sekretion, die als biologischer pH-Puffer fungiert, werden die durch das Mukusgel diffundierenden H^+ -Ionen unter der Bildung von CO_2 und H_2O neutralisiert (5, 202, 316).

Anhand von Mausmodellen wurde gezeigt, dass CFTR für die basale und stimulierte HCO_3^- -Sekretion im murinen Dünndarm essentiell ist (75, 313, 328). Allerdings können diese Erkenntnisse nicht direkt auf den Dickdarm übertragen werden, weil eine unterschiedliche Transporterexpression zwischen den intestinalen Segmenten besteht. Im murinen Kolon ist im Vergleich zu

Segmenten des Dünndarms eine verringerte Anzahl von CFTR-Kanälen lokalisiert worden (174). Dennoch weist das Kolon im Vergleich mit anderen Segmenten des Gastrointestinaltrakts eine hohe HCO_3^- -Sekretion auf (394). Im murinen Kolon ist die basale HCO_3^- -Sekretion von der Verfügbarkeit von luminalem Cl^- und serosalem HCO_3^- abhängig, sensitiv gegenüber dem Anionenaustauscher Inhibitor 4,4'-Diisothiocyano-2,2'-stilbenedisulfonic acid (DIDS) und weist nahezu gleiche Cl^- - und HCO_3^- -Absorptionsraten auf (372). Die apikale Basalsekretion von HCO_3^- erfolgt somit wahrscheinlich zum größten Teil durch DRA, der stark im Kolon exprimiert ist (348), und dessen Fehlfunktion zu Chloriddiarrhö führt (156), was die wichtige Funktion dieses Austauschers bei der Cl^- -Rückresorption zeigt. Parallel wurde eine cAMP-induzierte, Cl^- -unabhängige elektrogene HCO_3^- -Sekretion durch die parallele apikale $\text{HCO}_3^-/\text{Cl}^-$ -Leitfähigkeit des CFTR-Kanals beobachtet, die durch den CFTR Inhibitor Glibenclamide verhindert wurde (108, 193, 372). Allerdings ist eine cAMP-abhängige HCO_3^- -Sekretion auch im Kolon CFTR-defizienter Mäuse gemessen worden (19, 395). Die cAMP-induzierte HCO_3^- -Sekretion des mittleren Kolonepitheliums ist daher nur partiell von der apikalen CFTR-Leitfähigkeit abhängig. Es wird angenommen, dass der größte Anteil der HCO_3^- -Basalsekretion, als auch der Agonist-stimulierten HCO_3^- -Sekretion des murinen Kolon durch DRA erfolgt, weil SLC26A3-defiziente Mäuse eine stark verringerte HCO_3^- -Sekretion zeigten und DRA-mRNA, sowie mDRA-Transkripte stark im Kolon exprimiert werden (19, 234, 396). Für den kolonischen $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch durch DRA und die im Zusammenspiel mit NHE3 parallel erfolgende Rückresorption von Na^+Cl^- bei gleichzeitiger Basalsekretion von HCO_3^- ist die basolaterale Versorgung mit HCO_3^- durch Natrium-Bikarbonat Kotransporter notwendig (30, 119, 171, 193). Während der stimulierten kolonischen HCO_3^- -Sekretion wird Bikarbonat basolateral über einen oder mehrere $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Transporter importiert (17, 119, 404). Parallel kann Bikarbonat intrazellulär über die Karboanhydrase II durch CO_2 -Hydratation

generiert werden (127, 343), wobei die anfallenden Protonen über NHE3 aus der Zelle transportiert werden (85). Für die elektrogene CFTR-medierte Cl^- -Sekretion wird die basolaterale Cl^- -Aufnahme zum größten Teil durch den Na^+ - K^+ - 2Cl^- Kotransporter (NKCC1; SLC12A2) bewerkstelligt (109, 140, 309). Es wurden jedoch bei NKCC1-defizienten Mäusen vergleichbare elektrogene Cl^- -, elektrogene HCO_3^- - und elektroneutrale HCO_3^- -Sekretionsraten innerhalb des Kolon nach Stimulation mit cAMP beobachtet (20, 377). Dies deutet auf alternative basolaterale Cl^- -Aufnahmemechanismen hin, bei denen vermutlich die Anionen Austauscher Isoform 2 (AE2; SLC4A2) und basolaterale $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Kotransporter beteiligt sind und die CFTR-medierte $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ - und die HCO_3^- -Sekretion über DRA unterstützen (6, 118, 284, 377, 409). Die hauptsächlich bei der Cl^- - und HCO_3^- -Sekretion beteiligten Transporter sind in Abb. 3 dargestellt.

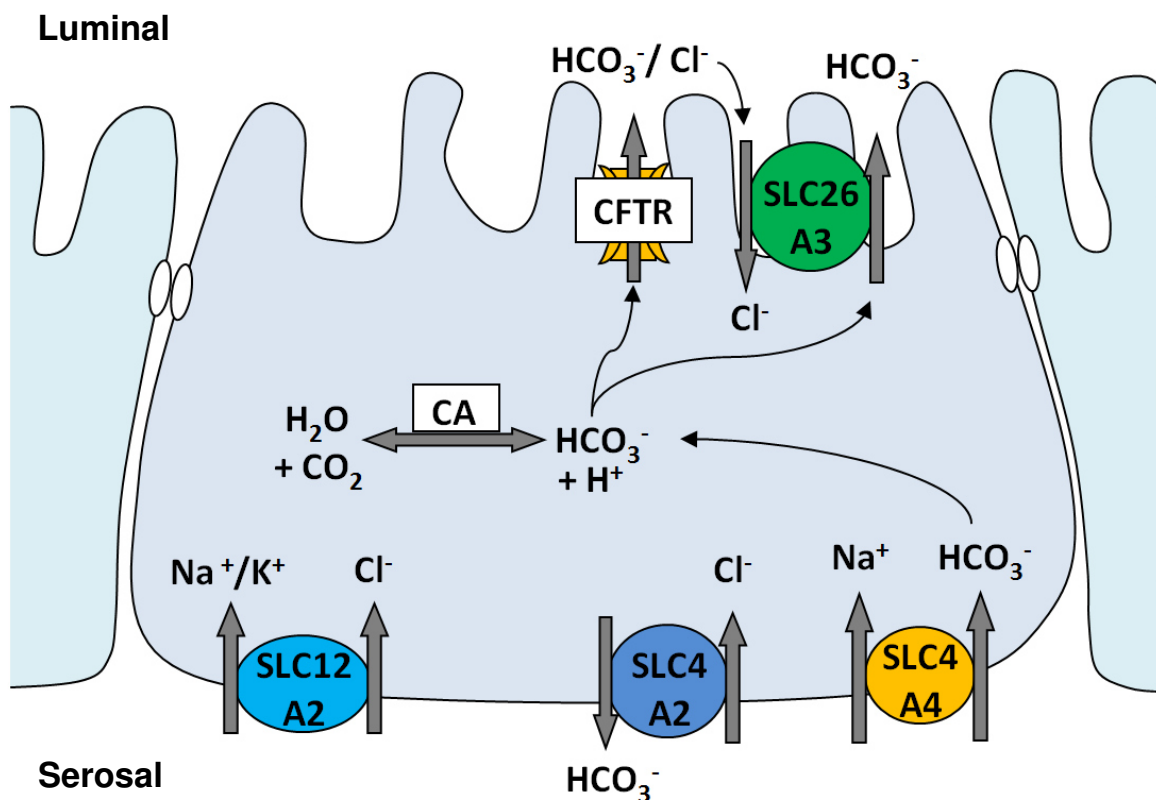


Abbildung 3: Beteiligte Transporter bei der Anionensekretion im murinen Kolon.

Neben dem aktiven Cl^- -abhängigen und Cl^- -unabhängigen HCO_3^- -Transport wird HCO_3^- innerhalb des Kolon im Austausch mit SCFA sezerniert (19, 348, 365, 372). Um die verschiedenen Aufgaben zu erfüllen, besteht eine unterschiedliche Transporterverteilung innerhalb des proximalen, mittleren und distalen Kolon, was zu einer divergenten Absorption und Sekretion führt. Bei der elektroneutralen Na^+Cl^- -Absorption ist der Na^+/H^+ Austausch durch NHE3 und der $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch durch DRA funktionell gekoppelt (247), allerdings bestehen innerhalb des Kolon stark variierende Expressiongradienten der beiden Transporter und deren Koexpression wurde von Talbot & Lytle nur im mittleren Kolon nachgewiesen (348). Dadurch scheint die gekoppelte, elektroneutrale Na^+Cl^- -Absorption über NHE3 und DRA auf dieses Segment beschränkt zu sein. Innerhalb des proximalen Kolon wird DRA nur geringfügig exprimiert, während NHE3 stark vertreten ist (348). Die hohe Expression von NHE3 bei geringer Expression von DRA im proximalen Kolon sorgt durch die starke H^+ -Extrusion und stark reduzierte HCO_3^- -Sekretion für ein saures Mikroklima, was die Absorption von negativ geladenen SCFA im Austausch für HCO_3^- in diesem Segment begünstigt (348). Das dafür benötigte HCO_3^- könnte durch die starke Expression des NBCe1-B innerhalb des proximalen Kolon (174) bereitgestellt werden. Innerhalb des proximalen Kolon erfolgt vermutlich elektroneutrale Na^+ -Absorption über NHE3 in Verbindung mit der Aufnahme von SCFA (19, 248, 348, 371). Für das distale Kolon wurde im Gegensatz dazu eine hohe Expression von DRA, aber kaum NHE3 gefunden, was durch die Absorption von Cl^- und simultaner hoher HCO_3^- -Sekretion eine Alkalisierung der mukosalen Oberfläche vermuten lässt, was der Azidifizierung durch generierte Protonen als Folge der mikrobiellen Fermentation entgegen wirkt (27, 156, 348).

1.2.1 Stimulation der Anionensekretion

Erfolgt eine Stimulation, die den intrazellulären cAMP, cGMP, Ca^{2+} -Level erhöht, wird in allen Darmabschnitten die ElektrolytabSORPTION inhibiert und parallel die elektrogene Sekretion von HCO_3^- und Cl^- cAMP-, cGMP- und Ca^{2+} -abhängig stimuliert Anionensekretion aktiviert (30, 132, 177, 193, 312, 313). Die elektroneutrale Na^+Cl^- Absorption wird durch cAMP über die Inhibition von NHE3 gehemmt und gleichzeitig wird die Anionensekretion durch eine Protein Kinase A (PKA)-medierte Phosphorylierung von CFTR aktiviert (10, 223, 406). Die stimulierte, CFTR-medierte Cl^- -Sekretion sorgt für eine negative luminale Potentialdifferenz, woraufhin Na^+ parazellulär sezerniert wird und dadurch die Sekretion von Flüssigkeit erfolgt (177). Luminale Säure sowie die Stimulation mit Carbachol, cAMP und Ca^{2+} führte zu einer erhöhten Membranassoziiierung von CFTR und NBCe1 bei gleichzeitiger Internalisierung von NHE3 (175). Diese synchronisierte Transporterverteilung spricht für eine erhöhte HCO_3^- -Sekretion über CFTR/NBCe1 und eine verminderte Flüssigkeitsabsorption, bei der NHE3 beteiligt ist (175). Vermutlich inhibiert der gestiegene pH_i durch akkumuliertes HCO_3^- neben der verringerten NHE3-Expression den Säure-aktivierten NHE3, wodurch die Na^+ - und folglich auch die Flüssigkeitsabsorption stark verringert wird (396). Zyklisches GMP inhibiert ebenfalls NHE3 (68) und aktiviert CFTR über eine cGMP-abhängige Protein Kinase II (129). Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Carbachol führt durch eine $\text{PLC}\gamma$ -medierte Inhibition von NHE3 zu einer gesenkten elektroneutralen Na^+ -Absorption (406). Die elektrogene Na^+ -Absorption wird durch cAMP durch eine CFTR-medierte Inhibition von ENaC herunterreguliert (220) und die cAMP-induzierte Inhibition der elektroneutralen Na^+Cl^- -Absorption ist ebenfalls CFTR-abhängig (76). Dies zeigt, dass Inhibition der Absorption und Aktivierung der Sekretion nicht separiert sind, weil für den inhibitorischen Effekt von cAMP auf die Na^+Cl^- -Absorption CFTR benötigt wird.

DRA-defiziente Mäuse zeigten innerhalb des mittleren Kolon allerdings keine cAMP-induzierte HCO_3^- -Sekretion durch Forskolin, wohingegen die CFTR-Leitfähigkeit für Cl^- unbeeinträchtigt war (396). Dies spricht für eine Sekretagoga-induzierte HCO_3^- -Sekretion, an der DRA maßgeblich beteiligt ist, CFTR hauptsächlich die Cl^- -Sekretion mediiert und dadurch die für den DRA-vermittelten $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausch benötigten Cl^- -Ionen bereitstellt (19).

Die kolonische HCO_3^- -Sekretion wird durch cAMP (18, 77, 372, 395), cGMP (313) und cholinerge Stimulation (17, 404) erhöht. Parallel zu der stimulierten apikalen HCO_3^- -Sekretion wird die Aktivität von NBCs durch Forskolin (18) und Carbachol (17) gesteigert und beide Sekretagoga erhöhen die Oberflächenexpression des NBCe1 (404).

1.3 Regulation der pH-Homöostase

Die Integrität der gastrischen Mukosa ist in Anwesenheit starker luminaler Säure von einer intakten Epithelzellschicht abhängig und die Aufnahme von Basen bzw. HCO_3^- durch den basolateralen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransport, in die durch das luminaire Milieu azidifizierte Oberflächenzellen, ist für die Regulation des pH_i essentiell (148, 271). Die Anwesenheit von luminaler Säure induziert zudem eine starke Membranexpression von CFTR und NBCe1, wohingegen NKCC1 internalisiert wird, was auf eine verstärkte HCO_3^- -Sekretion schließen lässt, um einer luminalen Azidifizierung entgegen zu wirken (174). Intrazelluläres HCO_3^- reguliert den pH_i , indem es unter der Bindung von Protonen zu Kohlensäure (H_2CO_3) hydratisiert wird und anschließend zu CO_2 und H_2O dissoziiert. Neben der basolateralen Aufnahme kann HCO_3^- intrazellulär reversibel durch Karboanhydrasen über die Hydratation von CO_2 generiert werden (238). CAI und CAII sind im Zytoplasma von murinen Kolonenterozyten und CAIV in dessen apikaler Membran exprimiert (46). Die Protonenextrusion ist ebenfalls ein Mechanismus, um den pH_i zu regulieren. Es wurde kürzlich gezeigt, dass die NHE-Isoformen 1 und 2 in der Basalregion von Kolonkrypten und NHE3 in

kolonischen Oberflächenzellen hauptsächlich für den H^+ -Export verantwortlich sind (327). Die bei der Generation von HCO_3^- entstehenden H^+ werden durch Na^+/H^+ Austausch über die basolaterale Membran exportiert und die Inhibition der CA oder NHE1 führte zu einer verringerten basalen und stimulierten HCO_3^- -Sekretion (172). NHE3-defiziente Mäuse zeigten aber im Gegensatz zu NBCe1-defizienten Mäusen nur eine milde Azidose (309, 319), weshalb davon ausgegangen wird, dass der NBCe1 maßgeblich an der Aufrechterhaltung des pH_i beteiligt ist. NBCe1-A und NBCe1-B regulieren den pH_i , indem importiertes HCO_3^- einer Azidifizierung entgegen wirkt und die Zellhomöostase erhalten wird (1, 47, 290, 292). Innerhalb des murinen Kolon wird jedoch hauptsächlich die NBCe1-B Isoform exprimiert (404). Untersuchungen des intrazellulären pH zeigten, dass die Erholung von Kolonkrypten nach einer Ansäuerung von der Verfügbarkeit von HCO_3^- abhängt aber teilweise auch Amilorid-sensitiv ist (18).

1.4 Natrium Bikarbonat Kotransporter

Na^+/HCO_3^- -Kotransporter spielen bei der Regulation des pH_i und für die apikale, intestinale HCO_3^- -Sekretion eine entscheidende Rolle (47, 66, 134, 174, 175, 194, 315, 333, 404). NBC sind DIDS-sensitive Mitglieder der Transporterfamilie löslicher Carrier und Membranproteine (SLC), werden durch das SLC4A Gen codiert und beinhalten die elektroneutralen Cl^-/HCO_3^- -Austauscher (AE1-4; SLC4A1-4), die elektrogenen Na^+/HCO_3^- -Kotransporter NBCe1 (SLC4A4) und NBCe2 (SLC4A5), die elektroneutralen, Amilorid-sensitiven und Na^+ -gekoppelten HCO_3^- -Transporter NBCn1 (SLC4A7), NBCn2 (SLC4A10) und die Na^+ -abhängigen Cl^-/HCO_3^- -Austauscher NDCBE (3, 41, 212, 289, 290). Die elektroneutralen (NBCn) und elektrogenen (NBCe) Na^+/HCO_3^- Kotransporter werden mit einer Stöchiometrie des Na^+/HCO_3^- -Kotransports von 1:1 bzw. 1:>1 klassifiziert (49, 136). Genauere Angaben über

die Transportstöchiometrie der NBCs und dessen Regulation und sind unter Anhang H beschrieben.

Für die apikale, intestinale HCO_3^- -Sekretion ist die Verfügbarkeit von HCO_3^- durch den basolateralen Bikarbonat-Import über den elektrogene SLC4A4 wichtig (17, 66, 174, 175, 315, 404). Bei Säugetieren gibt es 3 näher untersuchte Varianten des elektrogenen SLC4A4 (NBCe1-A, B und C) (3, 212). Diese Splice Varianten des elektrogenen NBCe1 unterscheiden sich durch ihren N- oder C-Terminus, verfügen aber über eine konservierte Transmembranregion (2, 41). Die ersten 41 N-terminalen Aminosäuren (AS) des NBCe1-A sind bei der NBCe1-B Isoform durch eine Sequenz bestehend aus 85 AS ersetzt. Der N-Terminus der NBCe1-C Variante ist identisch mit der des NBCe1-B, unterscheidet sich aber durch die C-terminale AS Sequenz bei der 46 AS des NBCe1-B durch 61 AS des NBCe1-C ersetzt sind (41). Vor kurzem identifizierte NBCe1-D und NBCe1-E Transkripte wurden aus dem reproduktiven Gewebe von Mäusen isoliert und unterscheiden sich von NBCe1-A und NBCe1-B durch das Fehlen einer Sequenz von neun AS des zytosolischen N-Terminus (212), allerdings wurde bisher weder dessen Expression auf dem Proteinlevel, noch dessen Funktion beschrieben.

1.4.1 Lokalisation des NBC

Erstmals wurde 1983 ein basolaterales elektrogenes Na^+ - und HCO_3^- -abhängiges Kotransportsystem beschrieben, das die renale HCO_3^- -Resorption vom Lumen ins Blut mediiert (47). Ähnliche $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -abhängige Basentransporter wurden in Zellen des Gastrointestinaltrakts nachgewiesen, die unter physiologischen Konditionen jedoch als Basenimporteure fungieren (7, 315). Die funktionale Existenz von $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ -Kotransportern im Dünndarm von Ratten wurde erstmals 1993 gezeigt (168). Insbesondere das Duodenum ist aufgrund des Eintritts von Magensäure permanent einer starken Azidifikation ausgesetzt und verfügt im Vergleich zu anderen Segmenten des GI Trakts über

die höchste NBC Expression (315). Die basolaterale Expression der elektroneutralen Isoform NBCn1 wurde bei Mäusen innerhalb des Duodenum und Kolon nachgewiesen (67). Der NBCn1 wurde im Duodenum als wichtiger HCO_3^- -Importmechanismus identifiziert, was allerdings für das Kolon nicht bestätigt werden konnte (67, 327). Satt dessen wurde die Beteiligung des basolateral exprimierten, kolonischen NBCn1 bei der korrekten Entfaltung der Mukusschicht nachgewiesen (327). Der NBCe1-A ist hauptsächlich in der basolateralen Membran des proximalen Nierentubulus exprimiert und mediiert dort mit einer Stöchiometrie von $3 \text{HCO}_3^- : 1 \text{Na}^+$ den Großteil des HCO_3^- Efflux aus dem Lumen ins Blut (290, 318, 398), wohingegen die NBCe1-C Variante im Gehirn exprimiert wird (49, 219).

Der Na^+ - HCO_3^- -Kotransporter NBCe1-B ist die häufigste Splice Variante und wurde in einer Vielzahl von Geweben nachgewiesen, insbesondere in der Bauchspeicheldrüse, im Gehirn und im Intestinaltrakt (174, 218, 290, 291, 404). NBCe1-B akkumuliert in der Bauchspeicheldrüse mit einer Transportrate von $2 \text{HCO}_3^- : 1 \text{Na}^+$ intrazellulär HCO_3^- (136, 169), was für die luminale Sekretion bestimmt ist. Die vorherrschende NBCe1 Isoform in murinen Kolonkrypten ist die NBCe1-B Variante (404). Der NBCe1-B mediiert den elektrogenen Transport von 2HCO_3^- und 1Na^+ (271) und ist der hauptsächlich Mechanismus für den basolateralen HCO_3^- -Import in Epithelzellen (202). Segmentspezifische Untersuchungen zur NBCe1-B-Lokalisation zeigten eine hohe Expressionsrate im Duodenum, Ileum und in der oberen Kryptenregion des proximalen Kolon (174), wobei ein Expressiongradient des NBCe1-B von proximal nach distal innerhalb des murinen Kolon vorhanden war. Barmeyer et al. zeigten ebenfalls eine hohe Expression von NBCe1-B-Transkripten innerhalb des proximalen Kolon und ein etwas geringeres Vorkommen im distalen Kolon (28). Arbeiten über den Agonist-stimulierten I_{sc} des distalen Kolon zeigten, dass trotzdem eine hohe Anionensekretion in diesem Segment hauptsächlich durch HCO_3^- -Sekretion erfolgt, DIDS-sensitiv ist und von der basolateralen

Verfügbarkeit von Na^+ und HCO_3^- abhängt (397, 409). Die geringe Expression des elektroneutralen NBCn1 und des elektrogenen NBCe1-A wurden ebenfalls in isolierten Kolonkrypten nachgewiesen (182, 404), allerdings ist der NBCe1-B die vorherrschende Isoform, wenn die gesamte Krypte berücksichtigt wird. Zwar kann nicht ausgeschlossen werden, dass andere $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Kotransporter bei den Beobachtungen dieser Arbeit eine Rolle spielen, allerdings zeigten humane Expressionsanalysen nur sehr geringe PCR Signale für NBCe1-A (NBCe2; SLC4A5), NBCn1 (SLC4A7) und Cl^- -abhängige NBC innerhalb des Kolon (86).

Von diversen Arbeitsgruppen konnte die Relevanz der Protein Kinase C als wichtiger Modulator des Ionen- und HCO_3^- -Transports nachgewiesen werden (17, 122, 299, 353, 358).

1.5 Protein Kinase C

Protein Kinasen beeinflussen eine Vielzahl zellulärer Prozesse wie z.B. die Regulation der epithelialen Barriere (99, 173) und des Ionentransports (39, 59, 274, 275, 349). Die Familie der PKCs umfasst Phospholipid abhängige Enzyme, welche den Transfer einer Phosphatgruppe von Adenosintriphosphat (ATP) auf die Hydroxy-(OH)-Gruppe von Serin- und Threoninresten anderer Proteine katalysieren. Bisher sind 12 PKC Isoformen identifiziert worden, die in vier Gruppen unterteilt sind (272).

Die strukturelle Gemeinsamkeit aller PKC Isoformen ist eine N(H₂)-terminale regulatorische Domäne und eine C(OOH)-terminale katalytische Region (239). Die N-terminale Region inhibiert durch die Bindung der C-terminalen Region die katalytische Aktivität (239). Der C-terminale Teil enthält die Kinase Domäne (C4) und die ATP Bindungsstelle (C3) (155). Konventionelle, neue und atypische PKC Isoformen besitzen eine von der C1 Domäne N-terminal lokalisierte Pseudosubstratsequenz, welche die Bindung von Substraten der PKC autoinhibitorisch blockiert (158, 170, 180, 256).

Die katalytische Aktivität der konventionellen Isoenzyme PKC α , β I, β II und γ wird durch die Verfügbarkeit der Kofaktoren 1,2-Diacylglycerin (DAG)/Phorbolster und Ca²⁺ bestimmt (180). Die regulatorische Domäne konventioneller PKC Isoformen enthält neben einer C1A- und C1B-Domäne, die als DAG-/PMA-bindende Motive fungieren, eine C2 Domäne, die Ca²⁺-abhängig Phospholipide bindet (162, 255, 341). Dieser konservierten C2 Domäne fehlt hingegen innerhalb der Gruppe der neuen PKC δ , ϵ , η und θ Isoformen ein Säurerest, der für die Ca²⁺-Sensitivität verantwortlich ist, weshalb die neuen PKC Isoformen nur Phorbolster für dessen Aktivierung benötigen (341). Die atypischen PKC Isoformen ζ und ι/λ sind weder Ca²⁺ noch DAG sensitiv, enthalten eine atypische C1-Domäne die Phosphatidylserin oder Ceramid bindet, aber enthalten keine C2-Domäne (341). Atypische PKC Isoformen werden durch PIP₃ aktiviert, wodurch die Inhibition durch eine Arginin-Pseudosubstratsequenz aufgehoben wird (170). Die vierte Gruppe umfasst die wenig erforschten Protein Kinase N (PKN) und PKC-ähnlichen Isoformen PKN1, PKN2 und PKN3 (272).

Es ist allerdings nur wenig über die PKC-vermittelte Regulation des murinen NBCe1-B und den Einfluss auf die apikale HCO₃⁻-Sekretion bekannt. Arbeiten über die stimulierte HCO₃⁻-Sekretion des Intestinaltraktes untersuchen fast ausschließlich den apikalen Cl⁻/HCO₃⁻ Austauscher DRA und den Cl⁻/HCO₃⁻-Kanal CFTR, obwohl die Beteiligung der PKC bei der Regulation des HCO₃⁻-Transportes mehrfach bestätigt wurde (9, 151, 231) und die PKC bei der Regulation des Ionentransportes und des Transportertraffickings eine wichtige Rolle spielt (39, 151, 184). Durch unsere Arbeitsgruppe wurde die Beteiligung von konventionellen und neuen PKC Isoformen bei der cholinergen Stimulation des NBCe1 in murinen Kolonkrypten nachgewiesen (17), es ist aber nur wenig über die Beteiligung der PKC bei der cAMP-medierte Modulation des murinen NBCe1-B bekannt. Für die cAMP-abhängige Stimulation des NBCe1-B ist eine PKA-medierte Phosphorylierung des COOH-Terminus des NBCe1-B

wichtig (138). Somit könnte der HCO_3^- -Transport durch den NBCe1-B neben einer PKC-abhängigen modulierten Oberflächenexpression auch durch die Regulation der NBCe1-B Aktivität verändert werden.

Fragestellung:

In einer Kooperationsarbeit soll anhand von $\text{TNF}\alpha$ -überexprimierenden Mäusen, die eine chronische Entzündung des Ileokolon entwickeln, zuerst auf der Organebene das Bikarbonat-Gleichgewicht und die epitheliale Barriere des proximalen Kolon untersucht werden. Um zu klären, ob Ionentransporter bei dem verwendeten Mausmodell dysreguliert sein könnten, wird die mRNA Expression der Transporter DRA und PAT1, die bei der Regulation des Säure-Basen-Gleichgewichts beteiligt sind, sowie der Einfluß von NHE3 auf das Säure-Basen-Gleichgewicht innerhalb des Kolon untersucht. Mit Hilfe der Ussing Kammer, ^3H -Mannitol- und Dilutionspotentialmessungen sowie der Immunhistochemie wird die luminale Alkalisierung, die stimulierte HCO_3^- -Sekretion, parazelluläre Permeabilität, Ionenselektivität und die Lokalisation der Bestandteile von Schlussleistenkomplexen innerhalb des proximalen Kolon von $\text{TNF}^{\Delta\text{ARE}}$ Mäusen bestimmt.

Weiterführend soll auf zellulärer Ebene die PKC-vermittelte kurzfristige Regulation des NBCe1-B und dessen Einfluß auf die HCO_3^- -Homöostase untersucht werden. Weil der NBCe1-B innerhalb des murinen Kolon exprimiert wird (404) und hauptsächlich in Krypten lokalisiert ist (18), wurden isolierte native Kolonkrypten für die Untersuchung der NBCe1-B Aktivität und Expression verwendet, die eine Untersuchung der Sekretagoga-vermittelten Modulation des NBCe1-B in nativen Kolonkrypten direkt nach der Stimulation ermöglichen. Neue PKC Isoformen sind bei der Regulation der epithelialen Cl^- -Sekretion beteiligt, indem die Expression des basolateralen $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ Kotransporter (NKCC1) verringert wird (59, 105, 250, 349). Um festzustellen, ob dieser PKC-abhängige Regulationsmechanismus auch für den NBCe1-B

vorliegt, wird die Oberflächenexpression des NBCe1-B in Anwesenheit von Carbachol, Forskolin und PKC Inhibitoren mit Hilfe der Oberflächenbiotinylierung untersucht. Unter Verwendung immunhistologischer Färbungen soll vorab untersucht werden, ob verschiedene PKC Isoformen in unmittelbarer Nähe des NBCe1-B lokalisiert sind. Über die Oberflächenbiotinylierung wird die Phosphorylierung und Translokation konventioneller und neuer PKC Isoformen nach Stimulation mit Forskolin, Carbachol und PMA beobachtet und die pH-sensitive Mikrofluorometrie soll zeigen, welchen Einfluss die Inhibition der PKC auf die Stimulation des NBCe1-B durch Forskolin in nativen Kolonkrypten hat.

2 Ergebnisse

2.1 Publikation „Short Term Regulation of Murine Colonic NBCe1-B (Elektrogenic Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter) Membrane Expression and Activity by Protein Kinase C“

Veröffentlicht in PLOS ONE 9(3): e92275

Oliver May*, Haoyang Yu*, Brigitte Riederer, Michael P. Manns, Ursula Seidler, Oliver Bachmann

* Die Autoren teilen die Erstautorenschaft

Received for publication March 4, 2013; Accepted February 20, 2014

DOI:10.1371/journal.pone.0092275

Published online March 18, 2014

Beitrag der Autoren:

Experimentelles Design: OM, HY, US, OB

Durchführung der Experimente: OM, HY, BR

Auswertung der Daten: OM, HY, BR

Verfassen der Publikation: OM, OB

Korrektur und Genehmigung: OM, OB, US, MPM

Short-Term Regulation of Murine Colonic NBCe1-B (Electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter) Membrane Expression and Activity by Protein Kinase C

Oliver May¹, Haoyang Yu¹, Brigitte Riederer, Michael P. Manns, Ursula Seidler, Oliver Bachmann*

Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover Medical School, Hannover, Germany

Abstract

The colonic mucosa actively secretes HCO_3^- , and several lines of evidence point to an important role of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport (NBC) as a basolateral HCO_3^- import pathway. We could recently demonstrate that the predominant NBC isoform in murine colonic crypts is electrogenic NBCe1-B, and that secretagogues cause NBCe1 exocytosis, which likely represents a component of NBC activation. Since protein kinase C (PKC) plays a key role in the regulation of ion transport by trafficking events, we asked whether it is also involved in the observed NBC activity increase. Crypts were isolated from murine proximal colon to assess PKC activation as well as NBC function and membrane abundance using fluorometric pH_i measurements and cell surface biotinylation, respectively. PKC isoform translocation and phosphorylation occurred in response to PMA-, as well as secretagogue stimulation. The conventional and novel PKC inhibitors Gö6976 or Gö6850 did not alter NBC function or surface expression by themselves, but stimulation with forskolin (10^{-5} M) or carbachol (10^{-4} M) in their presence led to a significant decrease in NBC-mediated proton flux, and biotinylated NBCe1. Our data thus indicate that secretagogues lead to PKC translocation and phosphorylation in murine colonic crypts, and that PKC is necessary for the increase in NBC transport rate and membrane abundance caused by cholinergic and cAMP-dependent stimuli.

Citation: May O, Yu H, Riederer B, Manns MP, Seidler U, et al. (2014) Short-Term Regulation of Murine Colonic NBCe1-B (Electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter) Membrane Expression and Activity by Protein Kinase C. PLoS ONE 9(3): e92275. doi:10.1371/journal.pone.0092275

Editor: Makoto Kanzaki, Tohoku University, Japan

Received: March 4, 2013; **Accepted:** February 20, 2014; **Published:** March 18, 2014

Copyright: © 2014 May et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by a grant from the Deutsche Forschungsgemeinschaft (www.dfg.de) to O. Bachmann (SFB621-C10). Brigitte Riederer was funded by the SFB621-C9 grant to U. Seidler. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: bachmann.oliver@mh-hannover.de

These authors contributed equally to this work.

Introduction

Electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter NBCe1 exists in 2 basolaterally localized variants (SLC4 family members NBCe1-A and NBCe1-B) with major differences in their transport direction, stoichiometry, expression pattern, and regulation [1]. NBCe1-B is more widely distributed, and is thought to act as a base-loading mechanism in the gastrointestinal epithelium together with NBCn1 to enable cellular pH regulation and transepithelial HCO_3^- transport [2–4]. NBCe1-A, on the other hand, is primarily found in the kidney, where it mediates HCO_3^- reabsorption in concert with apical Na^+/H^+ exchanger NHE3 [1].

Early on, the importance of physiologically relevant regulatory pathways has been investigated, and these studies have revealed a differential regulation of NBCe1-A and NBCe1-B by cholinergic and cAMP-dependent stimulation [2,5–8]. These differences have been attributed to the regulatory properties of the respective variant arising from the primary structure [9–11], but also to cell-type specific factors [5,10], underlining the importance of data derived from experiments using native tissue rather than heterologous expression systems.

Protein kinase C (PKC) has been shown to modulate HCO_3^- transport in various experimental systems [12–18]. The described short-term functions of PKC are complex and isoform-specific and involve direct effects on transporters and channels [13,19], the

modulation of other signal transduction pathways [15,16], and an influence on transporter/channel trafficking [20,21]. Although basolateral HCO_3^- uptake in the intestinal epithelium by specific transporters is believed to be essential for intracellular pH regulation and further functions of HCO_3^- , and also rate-limiting for transepithelial HCO_3^- transport, the role of PKC in the regulation of intestinal HCO_3^- uptake has not been studied in detail.

In renal cells, early functional data indicates a stimulatory effect of PKC on $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport: In cultured proximal tubule cells pre-treated with ethylisopropyl amiloride, ^{22}Na uptake is significantly enhanced in the presence of phorbol ester and HCO_3^- [22]. Similarly, fluorometrically measured $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter activity was stimulated by PMA in isolated proximal tubules [23]. The question thus arises whether PKC also activates NBC in the gut. It has to be kept in mind, however, that $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter regulation displays fundamental differences between the kidney and the gastrointestinal tract for other pathways, making the results from renal cells not readily transferable to the gut epithelium. In the latter, the relevance of PKC in regulating basolateral base-loading transporters like NBC is largely unknown.

We could previously demonstrate that cholinergic stimulation of NBC in isolated murine colonic crypts is partially reversible by

treatment with PKC inhibitors [8]. However, it is not clear whether PKC is involved in the cAMP pathway, which differentially regulates NBCe1 [2,6], and/or in subcellular redistribution [24,25] of the transporter in the intestine. We therefore set off to study the regulation of NBCe1 by protein kinase C in native colonic tissue.

Materials and Methods

Materials

The polyclonal anti-NBCe1 antibody K1A directed against the cytoplasmic COOH-terminus common to the NBCe1-A and NBCe1-B subtypes was generously supplied by Walter Boron [24,26]. The anti-PKC- α , δ and ϵ antibodies, the corresponding blocking peptides as well as the anti-phospho-PKC antibodies were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA, USA). 12-(2-cyanoethyl)-6,7,12,13-tetrahydro-13-methyl-5-oxo-5H-indolo (2,3-a) pyrrolo (3,4-c)-carbazole (Gö-6976), and 2-[1-(3-dimethylaminopropyl)-1H-indol-3-yl]-3-(1H-indol-3-yl)-maleimide (Gö-6850; bisindolylmaleimide I) were from Merck (Darmstadt, Germany). Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG, Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG, Nigercin, and 2',7'-biscarboxyethyl-5(6)-carboxyfluorescein (BCECF/AM) were all from Invitrogen (Life Technologies, Darmstadt, Germany), and the anti- β -actin-antibody was from Abcam (Cambridge, UK). Forskolin, carbachol, and phorbol-12-myristate-13-acetate (PMA) were from Sigma (Taufkirchen, Germany). Sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate (Sulfo-NHS-SS-Biotin) was purchased from Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA. All other chemicals were either obtained from Sigma or from Merck at the highest grade available.

Animals

C57BL/6 mice were kept in the animal facility of Hannover Medical School under standardized light and climate conditions, had access to water and chow *ad libitum*, and were used for the experiments at the age of 3 months. All experiments followed approved protocols and guidelines from the Medical School of Hannover (Permit Number: AZ 2012/10) and the local authorities for the regulation of animal welfare (Niedersächsisches Landesministerium für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit).

Preparation of colonic crypts

After CO₂ narcosis, mice were sacrificed by cervical dislocation (in accordance with the German law for animal protection [TierSchG §4 Abs. 1]), keeping CO₂ exposure as short as possible to minimize the effect on acid/base transporters. Subsequently, crypts were isolated as previously described [24] from a 3–4 cm proximal colonic segment filled with and incubated in EDTA-containing buffer (in mM: 127 NaCl, 5 KCl, 1 MgCl₂, 5 sodium pyruvate, 10 HEPES, 5 EDTA, 1% BSA, and 5 glucose, pH 7.4, gassed with 100% O₂) at 37°C for 12 min, harvested after gentle agitation, immersed in ice cold buffer A and stored on ice until use.

Microfluorometry

Intracellular pH (pH_i) was measured in BCECF-loaded crypts using a video imaging system exactly as previously described [8,24]. After intracellular acidification with an NH₄⁺-prepulse protocol by subsequent perfusion with buffers C, D and B (see Table S1), pH_i recovery rates were measured in the presence of the intended compounds and 700 μ M dimethylamiloride (DMA), which we have shown to entirely inhibit Na⁺/H⁺ exchange activity in murine colonic crypts. Calibration of the 440- to 490-nm ratio was performed using the high K⁺-nigercin method [8].

Cell surface biotinylation

Isolated murine colonic crypts were immersed in buffer B (37°C, pH 7.4) and treated with PMA, secretagogues and/or PKC inhibitors according to the experimental protocol, incubated twice with biotinylation buffer (in mM: 154 NaCl, 10 borate, 7.2 KCl, and 1.8 CaCl, pH 9.0, 1 mg/ml Sulfo-NHS-SS-Biotin), washed and lysed as previously described [24]. Biotinylated protein was retrieved using streptavidin beads (NeutrAvidin, Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA).

Immunoblotting

A previously validated amount of each fraction yielding signals within a linear range of optical density suitable for semi-quantification was loaded, and size fractionated as described by Hillesheim et al. [27]. Western blots were loaded with anti-NBCe1 antibody (1:500 in TBS-Tween) or anti- β -actin-antibody (1:2500 in TBS-Tween) and incubated overnight at 4°C. The secondary antibody (goat anti-rabbit IgG conjugated to horseradish peroxidase, KPL, Gaithersburg, MD, USA) was diluted (1:10,000 for anti-NBCe1) in TBS-Tween and incubated for 1 h at room temperature. The antigen-antibody complexes on the membranes were visualized with a Western blotting detection reagent (Amersham Pharmacia Biotech), and the image was captured on Hyperfilm (Amersham Biosciences, GE Healthcare, München, Germany). ODI (optical density integrated) was determined as described [24], and normalized to the internal β -actin control.

Immunohistochemistry

To estimate the distribution of PKC isoforms in relation to NBCe1, the mid colon of C57B/6 mice was prepared. NBCe1 was visualized on cryosections stained with the K1A-antibody exactly as previously described [24]. For the PKC isoforms, mid-colon preparations were embedded in paraffin, sectioned with a Microm HM335E microtome (Microm, Walldorf, Germany) at 2 μ m thickness, and deparaffinized. For improved antibody binding, slides were boiled in DAKO Target Retrieval Solution at pH 9 at 96°C for 20 min. After a 6 h blocking period with 10% goat serum, slides were incubated for 24 h at 4°C with the anti-PKC (α , δ , ϵ) antibodies (1:100) in antibody diluent (5% goat serum in PBST), followed by the secondary antibodies (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG or Alexa Fluor 488 Donkey anti-mouse IgG 1:1000, 1 h at room temperature). The slides were then washed four times and embedded in DAKO fluorescent mounting medium. Images were acquired using an Olympus BX 60 microscope (camera: Olympus CX 50) and processed with ImageJ (NIH, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

Statistical analysis

Results are given as means \pm SE. Proton fluxes were calculated by multiplying the initial steep pH_i slope after the re-addition of Na⁺, which was determined by regression analysis, with the total buffering capacity at the initial pH_i, including the intrinsic buffering capacity (β _i) and, in addition, the CO₂-dependent buffering capacity for CO₂/HCO₃⁻-containing solutions. Student's t-test in its paired and unpaired form, where appropriate, was used for pair-wise tests, and ANOVA was used for multiple comparisons (ANOVA for correlated samples in the biotinylation experiments), and Tukey's HSD (Honestly Significant Difference) Test as a post-hoc test. A p-value less than 0.05 was considered statistically significant.

Results

In this study designed to investigate the role of PKC during secretagogue-associated activation of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter (NBC), we first asked how PKC isoforms are subcellularly localized in murine colon, and whether PKC activation by forskolin and carbachol occurs in isolated crypts. To this end, we stained murine colonic sections with antibodies against NBCe1 as well as conventional and novel PKC isoforms (α , δ , ϵ). As observed previously, NBCe1 was found in the basolateral membrane, with some signal in the cytoplasm likely representing inactive NBCe1 in the resting state [24]. All PKC isoforms were expressed in the cytoplasm of the epithelial cells, with a somewhat stronger expression in surface cells, and an accentuation of PKC- α and - ϵ expression in the vicinity of the apical membrane (Figure 1). Since all PKC isoforms tested were present in crypt cell cytoplasm, an interaction with NBC, which is expressed in the basolateral crypt membrane [2,24], is theoretically conceivable.

PKC activation occurs in parallel with its translocation to the membrane, and we thus performed experiments to verify whether this can be observed in our model. In a first approach, cell surface biotinylation with a general PKC antibody was carried out (Figure 2). In a second set of experiments, the effect on PKC- α and PKC- ϵ phosphorylation was studied using an antibody directed against the phosphorylated PKC isoforms (Figure 3). As expected, direct PKC activation by PMA induced PKC translocation to the membrane, as well as increased PKC phosphorylation. Interestingly, however, the secretagogues forskolin and carbachol also led to an increase in PKC translocation and phosphorylation. PKC- α phosphorylation by secretagogues was completely reversed by G66850 (bisindolylmaleimide I), while for PKC- ϵ , only PMA-induced PKC phosphorylation, but not the secretagogue effect was significantly diminished. This may indicate a differential function of these conventional and novel PKC isoenzymes in secretagogue vs. phorbol ester dependent stimulation.

Next, we sought to investigate the role of PKC during secretagogue-dependent NBC regulation in colonic crypts. We had previously shown that carbachol-induced NBC activation is abolished by G66850 and G66976, with a non-significant trend towards a weaker effect of G66976 [8], which only inhibits conventional PKC isoforms [28]. Following up on these data, we fluorometrically measured NBC activity with and without forskolin stimulation and PKC inhibitors, respectively. $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter activity was fluorometrically determined in isolated murine colonic crypts [2,8]. Na^+/H^+ exchange (NHE) was pharmacologically separated using a dose of di-methyl-amiloride which is inhibitory for all NHE isoforms present in the colon [8]. Similar to carbachol, G66850 and G66976 both completely reversed the stimulatory effect of forskolin, indication that PKC is involved in PKC stimulation by both secretagogues (Figure 4). There was trend towards lower flux values during stimulation with forskolin in the presence of PKC inhibitor vs. inhibitor alone.

Since NBC is regulated by membrane trafficking [21,24,29,30], and this mode of regulation has been reported to involve PKC signaling in the case of different basolateral membrane transport proteins [21,31,32], we analyzed NBCe1 membrane abundance in response to secretagogues. Having previously shown that forskolin and carbachol elicit their stimulatory effect on NBC at least partially via an increase in membrane expression [24], we investigated whether PKC is involved in secretagogue-induced NBC exocytosis. Preincubation with G66850 or G66976 alone did not alter NBC membrane expression, but caused a significant reduction of biotinylated NBC after stimulation with forskolin or carbachol (Figure 5).

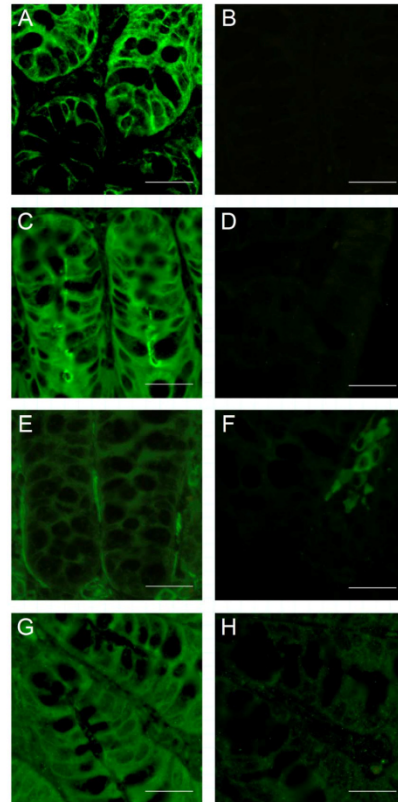


Figure 1. Immunohistochemical staining of NBCe1 and PKC isoforms in murine colonic tissue sections. NBCe1 (A) is expressed in the basolateral membrane of colonic crypts. Cytoplasmatic expression was observed for PKC α (C), δ (E) and ϵ (G) isoforms, with an apparent slight accumulation of the signal in the vicinity of the cell membrane for PKC α and PKC ϵ . Control experiments without the secondary antibody (NBCe1, B) and blocking peptides (PKC isoforms, D/F/H) showed no specific signal. Size of the scale bar is 50 μm . doi:10.1371/journal.pone.0092275.g001

Discussion

The effect of PKC on $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport is time-dependent and complex, and its investigation in various experimental systems has yielded controversial results. In the case of renal NBC, e. g., phorbol ester exerts a stimulatory effect in renal cells [22,23], but inhibits PKC activity in hk(human kidney)NBCe1-transfected *Xenopus oocytes* [33]. Having previously reported PKC involvement in cholinergic NBC stimulation in native colonic tissue [8], we now sought to follow up on this observation, and set off to study the role of PKC in short-term modulation of NBC activity and membrane expression. Since NBC is mostly crypt-localized [2], we used isolated crypts for fluorometric and biotinylation experiments.

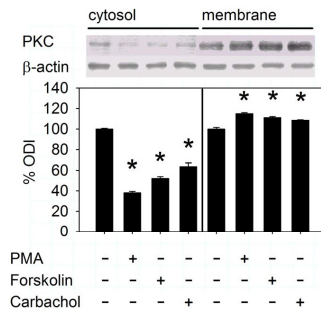


Figure 2. PKC translocation in response to PMA and secretagogues. PKC membrane expression as assessed by surface biotinylation and probing with a general PKC antibody significantly increased after exposure to PMA (100 nM), forskolin (10⁻⁵ M), or carbachol (10⁻⁴ M, 10 min each), which was paralleled by a decrease in cytosolic PKC expression [ODI: optical density integrated; *p<0.05 vs. unstimulated, n = 6 preparations from separate mice in each group, ANOVA for correlated samples followed by Tukey's HSD (Tukey's honestly significant difference test), values expressed as % of the unstimulated control for cytosol and membrane, respectively]. doi:10.1371/journal.pone.0092275.g002

Given the stimulatory effect of secretagogues on colonic NBC, we first investigated PKC translocation, which was enhanced, and phosphorylation by these compounds. Interestingly, only the phosphorylation of PKC- α , but not of PKC- ϵ induced by secretagogues was sensitive to PKC inhibition. This may be explained by several published observations: The phosphorylation of PKC- ϵ appears to be more complex, with different PKC isoenzymes involved, and the phosphorylation state of conventional vs. novel PKC differentially contributes to its degradation probability [34,35]. Furthermore, PKC- ϵ phosphorylation increases during mTORC1 activation after secretagogues and PMA, while PKC- α may even be degraded in response to these stimuli [36–39]. We believe that the differences between PKC- α and - ϵ regarding (auto-) phosphorylation-, degradation-, and regulation pathways contribute to the observed results. Our findings possibly point to a more prominent role of PKC- ϵ than PKC- α during secretagogue-dependent PKC stimulation. This would represent a parallel to the studies from the group of Jeffrey Matthews, who reported PKC- ϵ -dependent internalization of NKCC [40]. Together with our immunohistochemical data, we can conclude that PKC isoforms are present in the vicinity of NBC in the basolateral membrane, and are translocated and phosphorylated upon phorbol ester- and secretagogue exposure.

Having found that not only the known PKC activator carbachol, but also cAMP-dependent stimulation with forskolin can lead to PKC translocation and phosphorylation, we next fluorometrically assessed NBC activity after exposure to forskolin and/or PKC inhibitors. NBCe1-B is expressed at significant levels in murine colon [24], and although we cannot entirely exclude the contribution of other acid/base transporters, we have previously accumulated molecular and functional evidence that the Na⁺ and HCO₃⁻ dependent, DMA-insensitive pH_i recovery we measure in crypts after imposing an acid load is mediated – at least predominantly – by NBCe1-B [2,8]. Indeed, forskolin stimulation of NBC was reversed by PKC inhibition, which we had previously demonstrated for cholinergic stimulation [8]. While the group of Ira Kurtz had shown that the PKA-dependent phosphorylation

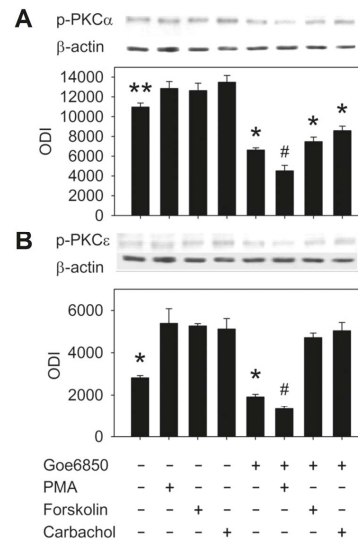


Figure 3. PKC phosphorylation in response to PMA and secretagogues. Phosphorylation was assessed in crypt lysates using the respective antibody recognizing the phosphorylated isoform. All compounds caused an increased in phosphorylated PKC- α (A) and PKC- ϵ (B; preincubation 10 min, 37°C; **p<0.05, *p<0.05 vs. unstimulated). When G66850 (5 μ M) was added 10 min prior to stimulation, the effect of stimulation on p-PKC- α was completely reversed (A; #p<0.01, *p<0.05). PKC- ϵ phosphorylation, however, was only inhibited in the case of PMA (100 nM), but not secretagogues (B; #p<0.01, *p<0.05; n = 6 preparations from separate mice in each group, ANOVA for correlated samples followed by Tukey's HSD). doi:10.1371/journal.pone.0092275.g003

site Thr⁴⁹ is important for cAMP-dependent stimulation of NBCe1-B [10], these experiments indicate that not only cAMP-induced exocytosis represents an additional important component of NBCe1-B regulation [24], but that PKC is also a prerequisite for functional NBC activation elicited by forskolin. This adds to the complex and diverse regulatory roles of PKC, which mediates inhibitory effects on anion transport, such as the one of substance P on HCO₃⁻ secretion in pancreatic ducts [17], but also stimulatory effects, such as phorbol ester stimulation of duodenal bicarbonate secretion in guinea pigs *in vivo* [18].

Given the importance of subcellular redistribution for NBC regulation [24], we hypothesized that membrane trafficking is part of the mechanism by which PKC inhibition reverses secretagogue stimulation of NBC. Apart from NBC, PKC is known to also modulate the membrane abundance of another major basolateral anion import mechanism in the intestine, namely Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter [41], which represents the main import pathway for Cl⁻ destined for secretion. In the colonic epithelial cell line T84, phorbol ester down-regulates basolateral Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter [42] by reducing NKCC1 surface expression via PKC- ϵ [40]. To evaluate this mode of regulation for NBC, we performed cell surface biotinylation experiments with carbachol-, forskolin- and PKC inhibitor-preincubation and found, unexpectedly, that PKC inhibition not only blocks secretagogue-induced exocytosis [24], but causes a significant reduction in NBC membrane abundance. Our experimental setup does not allow us to

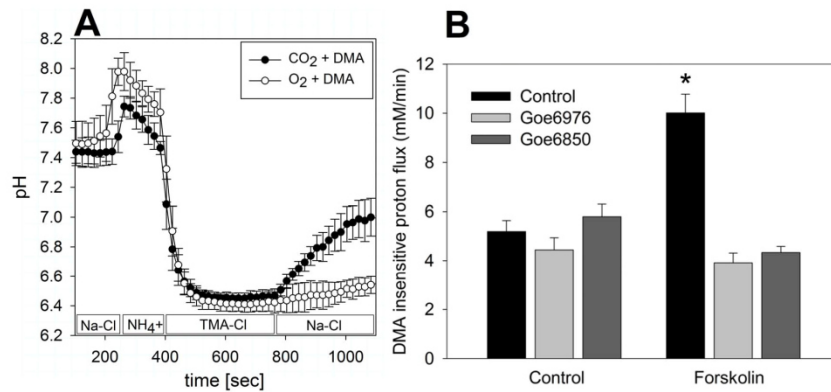


Figure 4. pH-microfluorometrical determination of NBC activity in the presence of PKC inhibitors with and without forskolin stimulation. NBC transport rates were determined as the Na⁺- and CO₂/HCO₃⁻-dependent, DMA-insensitive proton flux rates during pH_i recovery from an acid load. A: Average pH_i trace (n=5) illustrating the pH_i recovery protocol, where crypts were acidified with an NH₄⁺ "prepulse" to a pH of 6.4±0.2 in Na⁺-free buffer (TMA-Cl) and let to recover after Na⁺ re-addition in the presence of 700 μM DMA to block all Na⁺/H⁺ exchanger isoforms. In the absence of CO₂/HCO₃⁻, no significant pH_i recovery was observed, but in its presence, there was a steady pH_i increase representing Na⁺/HCO₃⁻ cotransport (NBC; [2,8]). B: Left side: Incubation with Gō6976 (5 μM, 10 min prior to stimulation, light grey bars) or Gō6850 (5 μM, 10 min prior to stimulation, dark grey bars) did not alter the control proton flux rates (solid bars; p=n.s.). Right side: Stimulation with forskolin led to the previously observed significant stimulation of NBC (10.2±0.8 vs. 5.3±0.4 mM/min; *p<0.05). Preincubation with either of the PKC inhibitors completely reversed this effect (n=5–7 experiments from separate mice, p=n.s., ANOVA for independent samples followed by Tukey's HSD). doi:10.1371/journal.pone.0092275.g004

differentiate between membrane insertion and retrieval, but this finding indicates that PKC is an elemental component of secretagogue-dependent NBC regulation, and that its inhibition may block the NBC membrane turnover to an extent that leads to decreased membrane expression. In the functional studies (Fig. 4), there was only a trend towards lower NBC activity, so these two measures do not fully quantitatively correlate. The reason may be that the decrease in NBC1 membrane expression that occurs in the presence of PKC inhibitors despite secretagogue stimulation is

in part compensated for by a functional activation of NBC itself by forskolin [2].

In two elegant studies, the group of Irina Gritchchenko delineated cholinergic regulation of NBC subtypes transfected into a salivary gland cell line, and the role of PKC in this process [21,30]. They observed an initial functional activation followed by NBCe1 endocytosis within the 5–15 minutes after stimulation, and interpreted this as a mechanism to adapt salivary secretion to a new steady-state [30]. In a follow-up study which separated the

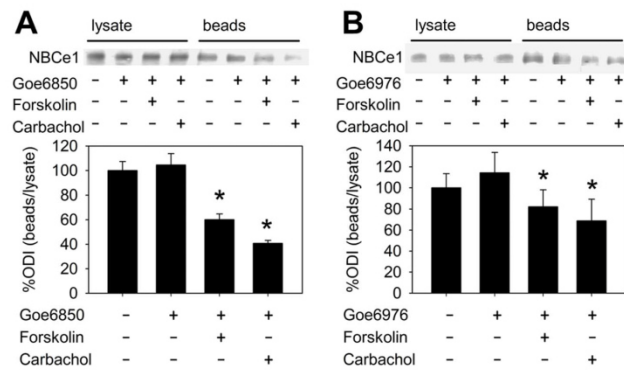


Figure 5. NBCe1 membrane expression during secretagogue stimulation and PKC inhibition with Gō6850 or Gō6976. In cell surface biotinylation experiments, neither Gō6850 (A; 5 μM) nor Gō6976 (B; 5 μM; continuous incubation for 20 min [+/-] vs. vehicle [-/-]) caused changes in NBCe1 surface expression. When forskolin (10⁻³ M) or carbachol (10⁻⁴ M) were added after 10 min, NBCe1 surface expression significantly decreased (40 and 59% for Gō6850, and 8 and 31% for Gō6976, respectively; n=5–7 preparations from separate mice in each group, *p<0.05, ANOVA for correlated samples followed by Tukey's HSD). doi:10.1371/journal.pone.0092275.g005

NBC and PKC isoforms/subtypes, they reported that PMA caused endocytosis of NBCe1-B, and that carbachol-dependent redistribution of NBCe1 into early endosomes is mediated by PKC- α , β , γ and novel PKC- ϵ [21]. Our approach using primary isolated crypts permits us to observe the primary events directly after stimulation, but due to their limited viability, we do not know whether the initial exocytosis and activity increase is also followed by redistribution to an intracellular compartment. Our results indicate that PKC is highly relevant for the stimulation-associated NBC exocytosis that leads to the activity increase after secretagogue exposure, with PKC inhibition causing a strong redistribution into an intracellular compartment.

One important question is whether other HCO_3^- transporters are relevant. NBCn1, which is essential for duodenal acid-base-balance [3,43], is also expressed in the colon [3]. The localization within the crypt-villus-axis, however, seems to be distinct, with NBCe1 being expressed in the upper part of the crypt, and NBCn1 in the lower part (unpublished). We have previously reported very low PCR expression levels for NBCn1 as compared with NBCe1 in isolated crypts [24], with the caveat that expression of different gene products is difficult to compare due to e. g. different primer efficiencies. In a more recent paper, NBCe1 and NBCn1 levels in the scraped colonic mucosa were comparable [3], which may be due to the fact that other structures such as blood vessels where NBCn1 has been described are present in this preparation. Despite the undisputable presence of NBCn1 in the lower colonic crypt, where it may serve a specialized function, there is thus substantial evidence indicating that NBCe1 is the predominant transporter when the entire crypt is taken into account. This was done in the present study by using isolated crypts for the biotinylation experiments, and regions of interest covering the bulk of the crypt in the fluorometric experiments. In a comparative expression study of SLC4 gene family members in human tissues, Damkier et al. reported a significant PCR signal for NBCe1, and a very low signal for NBCe2, NBCn1, and Cl-dependent NBC in the colon [44], the expression pattern overall being comparable to the existing data from rodents. Overall, the existing functional and molecular data gives us several clues that NBCe1 is important as a $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter in the murine colonic crypt, and there is no clear indication so far that the importance of other $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ transporters comes close. However, we cannot entirely exclude a functional role of other $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ transporters in our observations.

How exactly PKC exerts its regulatory effects on NBCe1 on a molecular level remains to be clarified. The question arises

whether PKC acts exclusively via NBC endocytosis, or exerts an additional direct effect on the transporter. In salivary ParC5 cells, electrogenic NBC was also endocytosed by PMA [30], while this compound significantly reduced hk(human kidney) NBCe1 activity in *Xenopus oocytes*, without changing its membrane abundance [33]. Sequence comparison of the renal and the intestinal/pancreatic NBC subtypes revealed that the latter has a unique N-terminus of 85 amino acids, which replaces the first 41 amino acids in renal NBC [9]. This N-terminus contains 2 putative phosphorylation sites for protein kinase C, beginning at Ser³⁸ and Ser⁶⁵ [9]. As NBCe1-B possesses additional unique putative PKC phosphorylation sites [9], it is theoretically conceivable that PKC acts directly on NBC activity. Furthermore, PKC can inhibit the interaction of Slc26 family members and carbonic anhydrase (CA), a process termed "metabolon disruption" [45], and we have previously shown CA to be involved in cholinergic NBC stimulation [8], making this another potential regulatory mechanism for PKC. The recent discovery of an autoinhibitory module within the N-terminus of different NBCs, which is regulated by IRBIT and PIP2 [46] raises the question how PKC fits in and whether it acts sequentially or in parallel. Further studies involving site-directed mutagenesis modifying the previously identified putative PKC consensus phosphorylation sites unique to NBCe1-B [9] will have to solve this issue in the future.

Supporting Information

Table S1 Buffers used for the fluorometric experiments. All buffers contained a combined buffering system including HEPES/TRIS. Osmolarity was 290–300 mOsm/l, and pH was adjusted to 7.4. TMA: tetramethylammonium, HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), TRIS: Tris(hydroxymethyl) aminomethane. (DOC)

Acknowledgments

The K1A-antibody directed against NBCe1 was a generous gift from Walter Boron, Case Western Reserve University, Cleveland, Ohio, USA.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: OB US MM. Performed the experiments: HY OM BR. Analyzed the data: HY OM BR OB. Contributed reagents/materials/analysis tools: OB US MM. Wrote the paper: OB US OM.

References

- Romero MF, Fulton CM, Boron WF (2004) The SLC4 family of HCO_3^- transporters. *Physiol Rev* 44: 495–509.
- Bachmann O, Rossmann H, Berger UV, Colledge WH, Ratcliff R, et al. (2003) cAMP-mediated regulation of murine intestinal/pancreatic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter subtype pNBC1. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G37–45.
- Chen M, Praetorius J, Zheng W, Xiao F, Riederer B, et al. (2012) The electroneutral $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter NBCn1 is a major pH regulator in murine duodenum. *J Physiol*.
- Jacob P, Christiani S, Rossmann H, Lamprecht G, Viellard-Baron D, et al. (2000) Role of $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Cotransporter NBC1, Na^+/H^+ Exchanger NHE1, and Carbonic Anhydrase in Rabbit Duodenal Bicarbonate Secretion. *Gastroenterology* 119: 406–419.
- Bachmann O, Franke K, Yu H, Riederer B, Li HC, et al. (2008) cAMP-dependent and cholinergic regulation of the electrogenic intestinal/pancreatic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter pNBC1 in human embryonic kidney (HEK293) cells. *BMC Cell Biol* 9: 70.
- Ruiz OS, Arruda JA (1992) Regulation of the renal $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter by cAMP and Ca-dependent protein kinases. *Am J Physiol* 262: F560–565.
- Ruiz OS, Qiu YY, Cardoso LR, Arruda JA (1997) Regulation of the renal $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter: VII. Mechanism of the cholinergic stimulation. *Kidney Int* 51: 1069–1077.
- Bachmann O, Reichelt D, Tuo B, Manns MP, Seidler U (2006) Carbachol increases $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransport activity in murine colonic crypts in a M_3 -, Ca^{2+} /calmodulin-, and PKC-dependent manner. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G650–657.
- Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, et al. (1998) Molecular cloning, chromosomal localization, tissue distribution, and functional expression of the human pancreatic sodium bicarbonate cotransporter. *J Biol Chem* 273: 17689–17695.
- Gross E, Fedotoff O, Pushkin A, Abuladze N, Newman D, et al. (2003) Phosphorylation-induced modulation of pNBC1 function: distinct roles for the amino- and carboxy-termini. *J Physiol* 549: 673–682.
- Gross E, Kurtz I (2002) Structural determinants and significance of regulation of electrogenic $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ cotransporter stoichiometry. *Am J Physiol Renal Physiol* 283: F876–887.
- Glaser S, Alvaro D, Roskams T, Phinizy JL, Stoica G, et al. (2003) Dopaminergic inhibition of secretin-stimulated choleresis by increased PKC-gamma expression and decrease of PKA activity. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 284: G683–694.
- Orsenigo MN, Tosco M, Baroni MD, Bazzini G, Laforenza U, et al. (2002) Protein kinase C regulation of rat jejunal transport systems: mechanisms involved in bicarbonate absorption. *Exp Physiol* 87: 299–309.

14. Saksena S, Gill RK, Syed IA, Tyagi S, Alrefai WA, et al. (2002) Inhibition of apical Cl⁻/OH⁻ exchange activity in Caco-2 cells by phorbol esters is mediated by PKCε. *Am J Physiol Cell Physiol* 283: C1492–C1500.
15. Saksena S, Gill RK, Tyagi S, Alrefai WA, Sarwar Z, et al. (2005) Involvement of c-Src and protein kinase C delta in the inhibition of Cl⁻/OH⁻ exchange activity in Caco-2 cells by serotonin. *J Biol Chem* 280: 11859–11868.
16. Tuo BG, Chow JY, Barrett KE, Isenberg JI (2004) Protein kinase C potentiates cAMP-stimulated mouse duodenal mucosal bicarbonate secretion in vitro. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G814–G821.
17. Hegyi P, Rakonczay Z Jr, Tizlavicz L, Varro A, Toth A, et al. (2005) Protein kinase C mediates the inhibitory effect of substance P on HCO₃⁻ secretion from guinea pig pancreatic ducts. *Am J Physiol Cell Physiol* 288: C1030–C1041.
18. Odes HS, Reimer R, Muallem R, Schwenk M, Beil W, et al. (1996) Role of protein kinase C in duodenal mucosal bicarbonate secretion in the guinea pig. *Pharmacology* 53: 60–65.
19. Broughman JR, Sun L, Umar S, Scott J, Sellin JH, et al. (2006) Chronic PKC-β activation in HT-29 Cl19a colonocytes prevents cAMP-mediated ion secretion by inhibiting apical membrane current generation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291: G318–G330.
20. Qu F, Liu HJ, Xiang Y, Tan YR, Liu C, et al. (2011) Activation of CFTR trafficking and gating by vasoactive intestinal peptide in human bronchial epithelial cells. *J Cell Biochem* 112: 902–908.
21. Perry C, Baker OJ, Reyland ME, Grichchenko II (2009) PKC{α}{β}{γ} and PKC{δ}-dependent endocytosis of NBCe1-A and NBCe1-B in salivary parotid acinar cells. *Am J Physiol Cell Physiol* 297: C1409–C1423.
22. Ruiz GS, Wang LJ, Qiu YY, Kear F, Bernardo A, et al. (1996) Regulation of the renal Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter: VI. Mechanism of the stimulatory effect of protein kinase C. *Kidney Int* 49: 696–704.
23. Yamada H, Seki G, Taniguchi S, Uwatoko S, Nosaka K, et al. (1996) Roles of Ca²⁺ and PKC in regulation of acid/base transport in isolated proximal tubules. *Am J Physiol* 271: F1068–F1076.
24. Yu H, Riederer B, Stieger N, Boron WF, Shull GE, et al. (2009) Secretagogue stimulation enhances NBCe1 (electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter) surface expression in murine colonic crypts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 297: G1223–G1231.
25. Espiritu DJ, Yang VL, Bernardo AA, Arruda JA (2004) Regulation of renal Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter stimulation by CO₂: role of phosphorylation, exocytosis and protein synthesis. *J Membr Biol* 199: 39–49.
26. Schmitt BM, Biemesderfer D, Romero MF, Boulpaep EL, Boron WF (1999) Immunolocalization of the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter in mammalian and amphibian kidney. *Am J Physiol* 276: F27–F38.
27. Hillesheim J, Riederer B, Tuo B, Chen M, Manns M, et al. (2007) Down regulation of small intestinal ion transport in PDZK1- (CAP70/NHERF3) deficient mice. *PLoS Arch* 4: 575–586.
28. Martiny-Baron G, Kazanietz MG, Mischak H, Blumberg PM, Kochs G, et al. (1993) Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Go 6976. *J Biol Chem* 268: 9194–9197.
29. Espiritu DJ, Yang VL, Bernardo AA, Arruda JAL (2004) Regulation of Renal Na⁺/HCO₃⁻ Cotransporter Stimulation by CO₂: Role of Phosphorylation, Exocytosis and Protein Synthesis. *Journal of Membrane Biology* 199: 39–49.
30. Perry C, Quisell D, Reyland M, Grichchenko II (2008) Electrogenic NBCe1 (SLC4A4) but not electroneutral NBCn1 (SLC4A7) cotransporter undergoes cholinergic-stimulated endocytosis in salivary ParC5 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*.
31. Song JC, Hrnjez BJ, Farokhzad OC, Matthews JB (1999) PKC-ε regulates basolateral endocytosis in human T84 intestinal epithelia: role of F-actin and MARCKS. *Am J Physiol* 277: C1239–C1249.
32. Liu J, Kesiry R, Periyasamy SM, Malhotra D, Xie Z, et al. (2004) Ouabain induces endocytosis of plasmalemmal Na⁺/K-ATPase in LLC-PK1 cells by a clathrin-dependent mechanism. *Kidney Int* 66: 227–241.
33. Perry C, Blaine J, Le H, Grichchenko II (2006) PMA- and ANG II-induced PKC regulation of the renal Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (hkBNCe1). *Am J Physiol Renal Physiol* 290: F417–F427.
34. Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ (2000) Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J* 19: 496–503.
35. Durgan J, Cameron AJ, Saurin AT, Hanrahan S, Totty N, et al. (2008) The identification and characterization of novel PKCε phosphorylation sites provide evidence for functional cross-talk within the PKC superfamily. *Biochem J* 411: 319–331.
36. Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez IIA, Moreau J, Bonnel E, et al. (2011) ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem* 286: 567–577.
37. Leontieva OV, Black JD (2004) Identification of two distinct pathways of protein kinase Cα down-regulation in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* 279: 5788–5801.
38. Kim HW, Ha SH, Lee MN, Huston E, Kim DH, et al. (2010) Cyclic AMP controls mTOR through regulation of the dynamic interaction between Rheb and phosphodiesterase 4D. *Mol Cell Biol* 30: 5406–5420.
39. Edelstein J, Hao T, Gao Q, Morales L, Rockwell P (2011) Crosstalk between VEGFR2 and muscarinic receptors regulates the mTOR pathway in serum starved SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Cell Signal* 23: 239–248.
40. Del Castillo IC, Fedor-Chaikin M, Song JC, Starlinger V, Yoo J, et al. (2005) Dynamic regulation of Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter surface expression by PKC-ε in Cl⁻ secretory epithelia. *Am J Physiol Cell Physiol* 289: C1332–C1342.
41. Tang J, Bouyer P, Mykoniatis A, Buschmann M, Madin KS, et al. (2010) Activated PKC{δ} and PKC{ε} inhibit epithelial chloride secretion response to cAMP via inducing internalization of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1. *J Biol Chem* 285: 34072–34085.
42. Matthews JB, Awtry CS, Hecht G, Tally KJ, Thompson RS, et al. (1993) Phorbol ester sequentially downregulates cAMP-regulated basolateral and apical Cl⁻ transport pathways in T84 cells. *Am J Physiol* 265: C1109–C1117.
43. Singh AK, Xia W, Riederer B, Juric M, Li J, et al. (2013) Essential role of the electroneutral Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCn1 in murine duodenal acid/base balance and colonic mucus layer build-up in vivo. *J Physiol*.
44. Damkier HH, Nielsen S, Praetorius J (2007) Molecular expression of SLC4-derived Na⁺-dependent anion transporters in selected human tissues. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 293: R2136–R2146.
45. Alvarez BV, Vilas GL, Casey JR (2005) Metabolism disruption: a mechanism that regulates bicarbonate transport. *Embo Journal* 24: 2499–2511.
46. Hong JH, Yang D, Shcheynikov N, Ohana E, Shin DM, et al. (2013) Convergence of IRBIT, phosphatidylinositol (4,5) biphosphate, and WNK/SPAK kinases in regulation of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporters family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110: 4105–4110.

2.2 Publikation „Increased Epithelial Permeability Is the Primary Cause for Bicarbonate Loss in Inflamed Murine Colon“

Veröffentlicht in *Inflammatory Bowel Diseases* (2013;19:904–911)

Marina Juric*, Fang Xiao, MD*, Salah Amasheh, PhD, Oliver May, Kristin Wahl, Heike Bantel, MD, Michael P. Manns, MD, Ursula Seidler, MD, Oliver Bachmann, MD

* Die Autoren teilen die Erstautorenschaft

Received for publication August 31, 2012; Accepted September 6, 2012.

DOI 10.1097/MIB.0b013e3182813322

Published online March 14, 2013.

Beitrag der Autoren:

Experimentelles Design: MJ, FX, SA, US, OB

Durchführung der Experimente: MJ, FX, SA, OM, KW

Auswertung der Daten: MJ, FX, US, OB

Verfassen der Publikation: MJ, US, OB

Korrektur und Genehmigung: HB, MPM

Increased Epithelial Permeability Is the Primary Cause for Bicarbonate Loss in Inflamed Murine Colon

Marina Juric,* Fang Xiao, MD,* Salah Amasheh, PhD,[†] Oliver May,* Kristin Wahl,* Heike Bantel, MD,* Michael P. Manns, MD,* Ursula Seidler, MD,* and Oliver Bachmann, MD*

Background: Bicarbonate loss into the lumen occurs during intestinal inflammation in different species. However, candidate pathways like CFTR or DRA are inhibited in the inflamed gut. This study addressed the question whether and how inflammation-associated increased intestinal permeability may result in epithelial HCO_3^- loss.

Methods: Murine proximal colon was studied because it does not express functional DRA but is inflamed in the tumor necrosis factor α overexpressing mouse model ($\text{TNF}^{\Delta\text{ARE}}$). Luminal alkalization, ^3H -mannitol fluxes, impedance spectroscopy, and dilution potentials were measured in Ussing chambers, whereas expression and localization of tight junction-associated proteins were analyzed by Western blots and immunohistochemistry.

Results: Luminal alkalization rates and ^3H -mannitol fluxes were increased in $\text{TNF}^{\Delta\text{ARE}}$ proximal colon, whereas forskolin-stimulated I_{sc} was not altered. Epithelial resistance was reduced, but subepithelial resistance increased. The epithelial lining was intact, and enterocyte apoptosis rate was not increased despite massively increased Th1 cytokine levels and lymphoplasmacellular infiltration. Measurement of dilution potentials suggested a loss of cation selectivity with increased anion permeability. Western analysis revealed a downregulation of occludin expression and an upregulation of both claudin-2 and claudin-5, with no change in ZO-1, E-cadherin, claudin-4, and claudin-8. Immunohistochemistry suggested correct occludin localization but reduced tight junction density in $\text{TNF}^{\Delta\text{ARE}}$ surface epithelium.

Conclusions: Inflammation during $\text{TNF-}\alpha$ overexpression leads to increased epithelial permeability in murine proximal colon, decreased tight junctional cation selectivity, and increased HCO_3^- loss into the lumen. Inflammation-associated colonic HCO_3^- loss may occur through leaky tight junctions rather than through HCO_3^- secreting ion transporters.

(*Inflamm Bowel Dis* 2013;19:904–911)

Key Words: tight junction, claudin, occludin, large intestine

The ability of the colonic epithelium to control surface and luminal pH is critical for many aspects of the epithelial interface barrier and transport function, including the absorption of short chain fatty acids, mucus production, and bacterial colonization and proliferation.^{1–3} Acid–base homeostasis is altered during intestinal inflammation, which is often the cause of acute and chronic diarrheal diseases and has been associated with increased luminal

HCO_3^- content in humans⁴ and animal models.⁵ Particularly, severe and chronic intestinal inflammation occurs in inflammatory bowel disease (IBD), and early studies have attempted to define the impact of chronic colonic inflammation on luminal pH. Because of the technical complexity, gastrointestinal pH profiles have only been measured in small numbers of patients suffering from IBD using a radiotelemetry capsule, and most of the more recent studies have demonstrated higher values in the colon of patients with IBD than in the healthy controls^{6,7}; for review, see Nugent et al⁸.

Intestinal inflammation and proinflammatory cytokines weaken the epithelial barrier by various mechanisms, including altered tight junctional anatomy.⁹ Tight junctions (TJs) are formed by multiprotein complexes including, e.g., occludin, tricellulin, claudins, and junctional adhesion molecules, which restrict the free movement of ions across the epithelium. The continued exploration of barrier components has revealed that not all of them are “tightening”¹⁰. Although claudin-2 is selective for cations,¹¹ several other claudins promote or regulate anion permeability.^{12–15} Intestinal inflammation influences the TJ composition, reducing the expression of “tightening” claudins and occludin, leading to strand breaks,¹⁶ or upregulating the pore-forming claudin-2.^{17,18}

HCO_3^- movement into the intestinal lumen occurs in a highly segment-specific and tightly regulated fashion^{19–21} and

Supplemental digital content is available for this article. Direct URL citations appear in the printed text and are provided in the HTML and PDF versions of this article on the journal's Web site (www.ibdjournals.org).

Received for publication August 31, 2012; Accepted September 6, 2012.

From the *Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover Medical School, Hannover, Germany; and [†]Institute of Clinical Physiology, Charité, Campus Benjamin Franklin, Berlin, Germany. Dr. Xiao is now with the Department of Gastroenterology and Hepatology, Tongji Hospital, Wuhan, China.

The first two authors share the first, and the last two share the corresponding authorship.

Supported by grants from the Deutsche Forschungsgemeinschaft to O. Bachmann (SFB621-C10) and to U. Seidler (SFB621-C9 and DFG SE460/13-4).

The authors have no conflicts of interest to disclose.

Reprints: Oliver Bachmann, MD, Department of Gastroenterology, Hepatology and Endocrinology, Hannover Medical School, Carl-Neuberg-Str. 1, 30625 Hannover, Germany (e-mail: bachmann.oliver@mh-hannover.de).

Copyright © 2013 Crohn's & Colitis Foundation of America, Inc.

DOI 10.1097/MIB.0b013e3182813322

Published online 14 March 2013.

represents a major mechanism for luminal pH control.²² During chronic colitis, HCO₃⁻ could potentially reach the lumen through the paracellular pathway, which plays a minor role in the healthy epithelium.²³ However, the significance of TJ modification for acid–base balance in the inflamed intestine has not been studied, and it is not known whether specific changes to components of the epithelial barrier by the inflammatory process can lead to HCO₃⁻ losses. One major obstacle to such studies is the influence of inflammation on active HCO₃⁻ transporters, predominantly luminal Cl⁻/HCO₃⁻ transporters from the Slc26 family. The proximal colon of rats was shown to lack DRA (downregulated in adenoma, Slc26a6), which is the primary pathway for basal HCO₃⁻ output into the colonic lumen in the absence of nutrients,^{24,25} and murine proximal colon was found to be similar (Xiao et al²⁶ and this study). The expected rates of HCO₃⁻ transport across the apical membrane of the proximal colonic epithelium under resting conditions should be negligible, which makes this segment ideal to test the hypothesis that changes to the epithelial barrier during intestinal inflammation cause HCO₃⁻ leakage.

MATERIALS AND METHODS

Animals

TNF^{ΔARE} mice (TNF^{tm2Gkl})²⁷ were bred on a C57BL/6J background at the animal care facility at Hannover Medical School under standardized conditions. Sex-matched and age-matched heterozygous mice (TNF^{+/ΔARE}) and their healthy littermates (TNF^{+/+}) at the age of 6–8 months were used for the experiments. Mice were killed by CO₂ narcosis and subsequent cervical dislocation. Animal care and experimentation were approved by and carried out in accordance with the Medical School of Hannover and the local authorities for the regulation of animal welfare (Niedersächsisches Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit).

pH-Stat Titration of HCO₃⁻ Secretory Rates and I_{sc}

Experiments were carried out exactly as described previously.²⁶ Excised proximal colon was stripped of external muscle layers, mounted into Ussing chambers, and bathed with equimolar solutions, pH 7.4 (serosally [in mM]: 108 NaCl; 25 NaHCO₃; 3 KCl; 1.3 MgSO₄; 2 CaCl₂; 2.25 KH₂PO₄; 8.9 glucose; 10 sodium pyruvate, gassed with 95% O₂/5% CO₂; and luminally with 154 mM NaCl, gassed with 100% O₂). Neural activity and prostaglandin generation were blocked with 1 μM tetrodotoxin and 3 μM indomethacin (serosal). HCO₃⁻ secretory rates were determined by pH-stat titration and electrical parameters recorded under open circuit conditions. I_{sc} was calculated from recording tissue resistance (R_t) and potential difference (PD) in 2-minute intervals.

Fluxes of [³H] Mannitol

To assess tissue permeability, bilateral [³H] mannitol fluxes were measured as previously described²⁸ in isolated proximal

colonic TNF^{+/ΔARE} and TNF^{+/+} mucosa, with bilaterally identical CO₂/O₂-gassed solutions (as described for the serosal solution above, except for 9 mM lactose in the mucosal bath and 1 mM mannitol in both), under short circuit conditions. After 30-minute equilibration, 74 KBq/mL ³H-mannitol (Perkin Elmer, Waltham, MA) was added either to the serosal or the mucosal bath, and samples were taken as quadruple in 15-minute intervals for 90 minutes.

Dilution Potentials

The permeability of sodium and chloride ions was measured with a modified dilution potential technique.²⁹ In brief, pieces of stripped proximal colon were mounted into Ussing chambers and equilibrated in our basal solution with mannitol instead of glucose on the luminal side (see pH-Stat titration). The mucosal solution was then substituted with a 54 mM NaCl-containing solution, whereas osmolarity was maintained with 108 mM of mannitol. Electrical parameters were recorded in 30-second intervals for 30 minutes before and after the substitution. Ion permeability ratio (P_{Na}/P_{Cl}) was calculated from the dilution potential by using the Goldman–Hodgkin–Katz equation. Using Ohm's law, the total conductance G was calculated. The absolute permeabilities of sodium (P_{Na}) and chloride (P_{Cl}) were obtained by using a simplified Kimizuka–Koketsu equation.

Impedance Spectroscopy

Tissues were mounted in Ussing chambers, and one path impedance spectroscopy was performed to discriminate between epithelial (R_{epi}) and subepithelial (R_{sub}) resistance exactly as described previously.³⁰ To adjust mucosal surface area from TNF^{+/ΔARE} and TNF^{+/+}, images of hematoxylin/eosin-stained paraffin sections were analyzed with the processing software Image J (NIH, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Villus height and crypt depth of the epithelium and the thickness of the subepithelial tissue layers were measured. The number of villi and crypts were counted. On average, 10 adjacent sections were analyzed. The ratio of mucosal-to-serosal surface area was determined, representing apical epithelial area and subepithelial area corresponding to the opening area of the Ussing chamber.

See Additional Materials, Supplemental Digital Content 1, <http://links.lww.com/IBD/A121> for quantitative real-time PCR, measurements of apoptosis, Western blot analysis, immunofluorescence, and statistical analysis.

RESULTS

Characterization of Proximal Colonic Inflammation in the TNF^{ΔARE} Colitis Model

As a model of chronic intestinal inflammation, TNF^{+/ΔARE} mice and their wild-type (WT) littermates were used. These mice develop a Crohn's disease–like phenotype with ileocolitis and pronounced arthritis^{26,27} (Fig. 1A). A significant separation of the weight curves after 16 weeks for both male and female mice

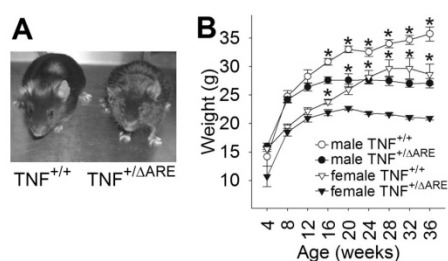


FIGURE 1. Phenotype and weight development of TNF^{ΔARE} mice. Heterozygous TNF^{+ΔARE} mice display a fuzzy fur and signs of arthritis (A). From the 16th week of life, the body weight of TNF^{+ΔARE} males and females (● and ▼) is significantly lower compared with TNF^{+/+} males and females (○ and ▽), respectively (B); n = 4–17 per data point.

was observed (Fig. 1B). In analogy to human inflammatory bowel disease,^{31–33} it was previously established that heterozygous animals not only suffer from a pronounced intestinal absorptive defect but also display a reduced net secretory response.²⁶

Histologically, mild-to-moderate colonic inflammation with a proximal-to-distal gradient was observed (Fig. 2A, B). The inflammatory infiltrate (consisting mostly of B and T lymphocytes, Fig. B and C, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/IBD/A122>) partially extended into the submucosa, but no gross ulceration was present. There was no indication of disrupted continuity of the epithelium, which could have represented a bias for transport and permeability studies. TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) staining did not reveal obvious differences in the frequency of apoptotic cells (Fig. 2C), which was further substantiated by a caspase 3/7 activity assay (Fig. 2D). In line with the histologic signs of inflammation, the content of the inflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF) α and interleukin 1 β was markedly elevated on a messenger RNA (mRNA) level (Fig. 2E, F). The results of Figures 1 and 2 therefore substantiate the presence of a mild non-erosive colitis with chronically strongly elevated Th1 cytokines in the proximal colon.

Basal Luminal Alkalinization Rates in the Proximal Colon of TNF^{ΔARE} Mice and Analysis of Active Transport Involvement

Luminal HCO₃⁻ output in the isolated proximal colonic mucosa was low, consistent with previous results,²⁶ due to virtual absence of DRA (Figs. 3A, C and 4A). However, basal alkalinization rates were significantly higher in TNF^{+ΔARE} than in WT proximal colon (Fig. 3A, C) without a difference between male and female animals. The I_{sc} was not significantly different (Fig. 3B, D), suggesting that electrogenic Cl⁻ secretion was not disturbed. To exclude that chronic inflammation leads to an upregulation of Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers, DRA (Slc26a3), and PAT1 (Slc26a6), mRNA abundance was measured by semiquantitative

real-time PCR. The expression of both was very low in murine proximal colon (Fig. 4A, B). No differences in anion exchanger expression between WT and heterozygous mice were detected with all reference genes used (Fig. 4C, D). This suggested that neither alterations in electrogenic HCO₃⁻ secretion nor luminal Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers were involved.

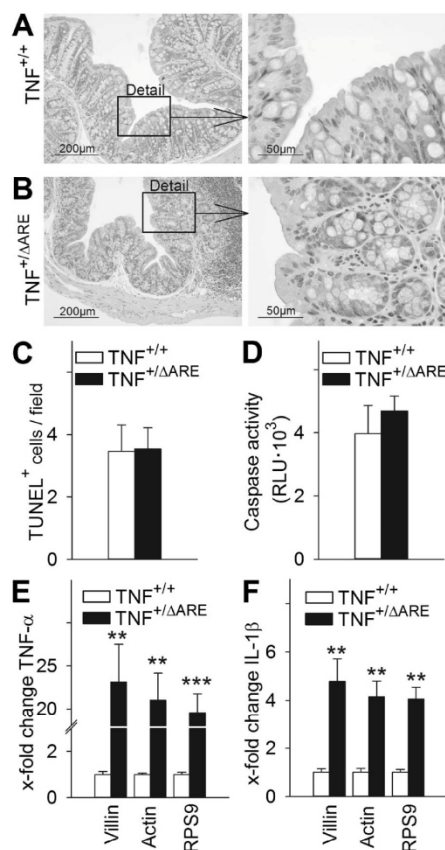


FIGURE 2. Histology and cytokine RNA expression in the proximal colon of TNF^{ΔARE} mice. Compared with TNF^{+/+} (A), mild-to-moderate inflammation can be observed in the proximal colon of TNF^{+ΔARE} mice (B), leaving the epithelial lining intact. There is no sign of a higher apoptotic rate as assessed by TUNEL staining (C, n = 4) and a caspase 3/7 assay (D, n = 4). TNF- α mRNA expression of TNF^{+ΔARE} animals (■) is 23.1-fold, 21-fold, and 19.6-fold increased compared with villin, actin, and RSP9 as a control gene, respectively (E). Interleukin 1 β (IL-1 β) mRNA is 4.8-fold (villin) and 4.1-fold (actin and RSP9) higher expressed compared with TNF^{+/+} (F) (□, mRNA expression value taken as 1, n = 6).

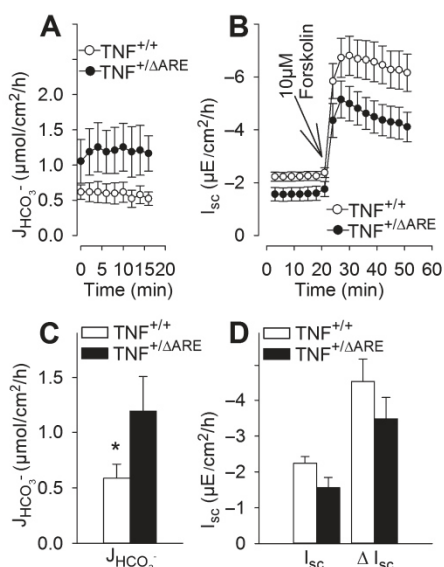


FIGURE 3. Time course of basal HCO₃⁻ output (A) and I_{sc} (B) in the proximal colon of TNF^{+/ΔARE} mice. Basal HCO₃⁻ output of TNF^{+/ΔARE} mice (■) is significantly higher compared with TNF^{+/+} animals (□, A and C). No significant differences are found in basal and forskolin-stimulated I_{sc} (ΔI_{sc}) among the 2 groups (B and D, n = 6/5).

Epithelial Permeability and Barrier Selectivity in the Inflamed Proximal Colon

To assess permeability changes in the proximal colon of TNF^{+/ΔARE} mice and their normal littermates as a potential cause of HCO₃⁻ leakage, ³H-labeled mannitol flux rates were measured in isolated proximal colonic epithelium. Indeed, higher fluxes were observed in TNF^{+/ΔARE} tissue (Fig. 5A), which indicates increased paracellular permeability for small uncharged solutes. Impedance spectroscopy, which allows the differentiation of epithelial (R_{epi}) and subepithelial (R_{sub}) resistances, demonstrated a markedly lower R_{epi} (Fig. 5B). In contrast, R_{sub} was elevated, probably because of subepithelial thickening (Figs. 2B and 5B and Fig. A, Supplemental Digital Content 2, <http://links.lww.com/IBD/A122>).

Next, we measured dilution potentials in heterozygous compared with healthy colonic epithelia during isoosmolar dilution of the apical NaCl concentration by 50% (see Materials and Methods section). Interestingly, the dilution potential was significantly altered in heterozygous animals, reflecting a calculated shift in the permeability ratio toward Cl⁻ (Table 1). Using the measured conductance and the modified Kimitsuka-Koketsu equation, the Na⁺ permeability, which was overall higher, was found to be unchanged (Fig. 5C). This suggested a decrease in cation selectivity of the inflamed proximal colonic mucosa.

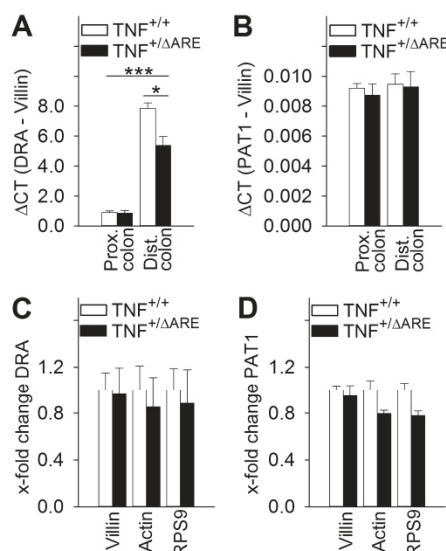


FIGURE 4. RNA expression of the apical Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger DRA and PAT1 in the proximal and distal colon of TNF^{+/ΔARE} mice. To illustrate the heterogeneity of DRA, ΔCT values of proximal and distal colonic mRNA are shown. DRA mRNA is significantly higher expressed in the distal colon, where it additionally differs significantly between TNF^{+/+} (□) and TNF^{+/ΔARE} (■) mice (A). PAT1 at a very low expression level does neither differ between the 2 colonic segments nor the 2 groups (B). Independently of the control gene, the expression level of both exchangers does not differ between TNF^{+/ΔARE} and TNF^{+/+} mice in the proximal colon (C and D) (mRNA expression value of the control group taken as 1, n = 6).

Expression and Localization of TJ-associated Proteins

The influence of proinflammatory cytokines on the differential expression of TJ components has been documented in several studies^{34,35} and could explain the observed permeability changes. To investigate whether an altered abundance of the different proteins can be observed in inflamed versus healthy mice, the expression of occludin and representative members of pore-forming (claudin-2) and tightening (claudin-5, claudin-4, and claudin-8) claudins as well as adherens junction components was assessed. Occludin, which was suggested as a general indicator for TJ integrity and which was shown to be strongly regulated by TNF-α, was downregulated in TNF^{+/ΔARE} proximal colonic tissue. Localization of occludin, however, was unchanged in heterozygous versus WT animals, but disturbed strand morphology was present, with an apparent reduction in TJ density than in WT mucosa (Fig. 6C, D). Although claudin-2 was upregulated on a protein level, analysis of the tightening claudins gave a mixed image, with an upregulation of claudin-5 and no change of claudin-4 or claudin-8. The adherens junction-associated

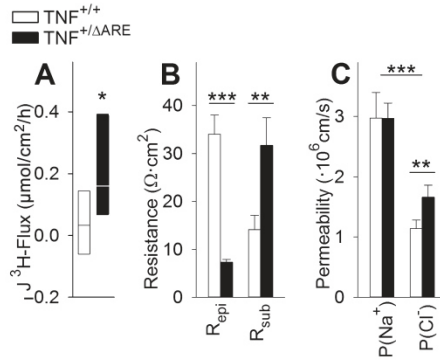


FIGURE 5. Permeability studies in the proximal colon of TNF^{ΔARE} mice. As an indication for paracellular permeability, TNF^{+/ΔARE} (■) proximal colon displays a significantly higher ³H-mannitol flux rate compared with TNF^{+/+} (□, A, n = 4) colon. Impedance spectroscopy measurements (B, n = 8) reveal furthermore a significantly lower epithelial resistance (R_{eppi}) and coevally significantly elevated subepithelial resistance (R_{sub}) in TNF^{+/ΔARE} tissue. Additionally, dilution potentials (C, n = 7/8) show not only an overall higher permeability of Na⁺ versus Cl⁻ but also a significantly higher permeability for Cl⁻ ions in TNF^{+/ΔARE} proximal colon compared with the control group.

proteins E-cadherin (E-Cad) and zona occludens protein 1 (ZO-1) were not changed (Fig. 6A, B).

DISCUSSION

Intestinal inflammation results in disturbed barrier function and a dysregulation of electrolyte transport.^{31,36} However, changes in epithelial pH homeostasis because of altered permeability and paracellular leakage have not been studied. The experiments presented here demonstrate the existence of a higher paracellular permeability and loss of cation selectivity in otherwise mildly and chronically inflamed proximal colonic mucosa, leading to enhanced HCO₃⁻ leakage into the proximal colonic lumen.

We and others have previously investigated the impact of intestinal inflammation on epithelial HCO₃⁻ transport.^{26,37} Zhang et al³⁷ injected mice with an anti-CD3 monoclonal antibody and measured ileal I_{sc} and HCO₃⁻ secretion in the Ussing chamber. In this acute inflammation model, the authors found a shift from

electroneutral Cl⁻/HCO₃⁻ exchange to a predominantly electrogenic anion secretion with an increased intracellular cAMP content but no expressional changes for CFTR. Similarly, the chronically inflamed ileum and mid-distal colon of TNF^{ΔARE} heterozygotes displays reduced Cl⁻-dependent HCO₃⁻ secretion, which is due to the loss of DRA.²⁶ A downregulation of this exchange process was also found in the colon of these mice,²⁶ the HLA-B27/β2m transgenic rat, the interleukin 10 knockout mouse with spontaneous colitis, and in patients with ulcerative colitis.³⁸ Although these studies had established a dysregulation of pH regulating ion transporters during intestinal inflammation, the importance of barrier changes for intestinal pH homeostasis remained unresolved because the experimental design did not permit to separate active transport from paracellular leakage.

Recent studies have reported a pronounced segmental heterogeneity for ion transporter expression,²⁴ leading to significant variability within even the same organ, such as the colon, and different species.²⁰ In particular, the proximal murine colonic mucosa displays very low rates of luminal alkalization,³⁹ and DRA expression in this segment is almost negligible.²⁴ We therefore chose the murine proximal colon of TNF-α overexpressing mice (which develop an ileocolitis and in which the proximal colon is more affected than the distal colon) for the present study, assuming that it would permit us to measure the passive leakage of HCO₃⁻ without the influence of an inflammation-associated decrease in DRA-mediated Cl⁻/HCO₃⁻ exchange. Indeed, luminal alkalization occurred at almost negligible rates in WT mucosa, compared with the 10-fold higher rates in the ileal and mid-distal murine colonic mucosa,²⁶ paralleled by a very low DRA expression, which was unchanged with respect to mRNA abundance in TNF^{+/ΔARE} mice (Fig. 4). Luminal alkalization rate was significantly increased in proximal colonic mucosa of TNF^{ΔARE} heterozygotes, which was in contrast to the decreased HCO₃⁻ output rates in the mid-distal colon.²⁶ I_{sc}, however, was not significantly altered by the inflammatory state in the proximal colon, neither the basal nor the forskolin-stimulated value. The crypt-expressed CFTR anion channel (or any other channel) is therefore not responsible for the higher luminal alkalization rates. In addition, CFTR expression levels were unchanged. We speculated that another potential reason may be less luminal acidification by the apical Na⁺/H⁺ exchanger NHE3, which has been shown to be dysfunctional despite normal expression and localization in moderately severe murine and human intestinal inflammation.^{31,33,40}

TABLE 1. Results of Dilution Potentials in the Proximal Colon of TNF^{ΔARE} Mice

	DP, mV	P(Na ⁺)/P(Cl ⁻), 10 ⁻⁶ cm/sec	J(Na ⁺), μEq/cm ² /h	J(Cl ⁻), μEq/cm ² /h
TNF ^{+/+}	-8.00 ± 0.24	2.62 ± 0.08	6.43 ± 0.37	2.46 ± 0.21
TNF ^{+/ΔARE}	-5.06 ± 0.01	1.80 ± 0.07	6.41 ± 0.13	3.59 ± 0.16
P	<0.001	<0.001	n.s.	<0.001

Data represent mean ± standard error of the mean. DP, dilution potential; J, flux; n.s., not significant; P, permeability.

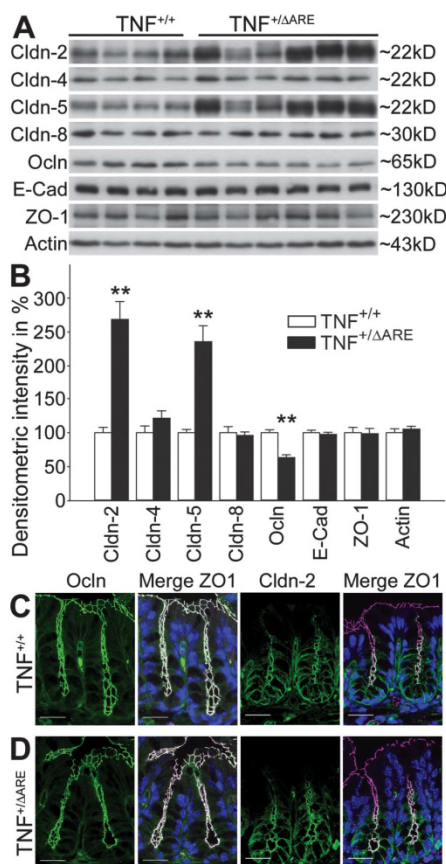


FIGURE 6. Expression of TJ-associated proteins and localization of zona occludens protein 1 (ZO-1, magenta), occludin (Ocln, green), and claudin-2 (Cldn-2, green) in the proximal colon of TNF^{ΔARE} mice. Densitometric analysis of the original Western blots (A, n = 4/6) shows a significant upregulation of claudin-2 (Cldn-2) and claudin-5 (Cldn-5) in TNF^{+/ΔARE} tissue. Although claudin-4 (Cldn-4), claudin-8 (Cldn-8), e-cadherin (E-Cad), and zona occludens protein 1 (ZO-1) remain unchanged, occludin (Ocln) expression is found to be reduced in the inflamed colon (B). In TNF^{+/+} (C) and to TNF^{+/ΔARE} animals (D), ZO-1 and Ocln are expressed in the same apical region of every enterocyte (merge). Occludin seems not to be differentially localized but TJ density appeared to be lower. Cldn-2 localization is restricted to the lower part of the crypt in both groups. Bar = 25 μm.

However, NHE3 mRNA expression was also equal in TNF^{+/ΔARE} and TNF^{+/+} mice, and luminal application of fully NHE3 inhibitory concentrations of the specific NHE3 inhibitor S1611 did not affect luminal alkalization rates in the chambered proximal colon (Fig. A and B, Supplemental Digital Content 3,

<http://links.lww.com/IBD/A123>), indicating that this transporter is quiescent under the conditions of our experiments. The likely reason for this is the complete absence of CO₂ in the lumen (which would diffuse into the enterocytes, acidify them, and stimulate NHE3), the absence of any other acidifying substances in the luminal bath (such as short chain fatty acids), and therefore an inactivation of NHE3 exchange by the high pH_i in colonic surface cells under the given experimental conditions. Thus, transporter-mediated events do not explain the observed higher alkalization rates in TNF^{ΔARE} heterozygote mucosa.

In addition to disturbed electrolyte transport, changes in intestinal epithelial barrier function have been described in many experimental models of bowel inflammation, sometimes preceding inflammation.^{32,35,41} Cytokines can directly influence barrier components.⁴² As a major inflammatory messenger, TNF-α has been shown to downregulate claudin-1, upregulate claudin-2,⁴³ and degrade occludin mRNA in a micro-RNA-dependent manner.⁴⁴ Occludin was shown to regulate macromolecule flux across the intestinal epithelium,⁴⁵ which may explain our observation of increased ³H-mannitol permeability during TNF-α overexpression but also that of increased HCO₃⁻ leakage.

Because of the cation selectivity of small and large intestinal mucosa, paracellular permeation of anions occurs at a much lower rate than cations, i.e., Na⁺, in healthy mucosa. A paracellular passage of HCO₃⁻ ions may occur when the charge selectivity for cations is decreased, which is what we found. We therefore searched for the reason for the decrease in cation selectivity. Expression of WT and mutated claudins in Madin-Darby canine kidney cells under an inducible promoter first clearly demonstrated that claudins can mediate charge selectivity of the paracellular pathway for ions. When the charge of selected extracellular amino acids was reversed, ion selectivity increased Na⁺ (claudin-4) or switched the preference from Na⁺ to Cl⁻ permeability (claudin-15).¹⁰ When claudin-2 is overexpressed in Madin-Darby canine kidney monolayers, paracellular permeability increased 5.6-fold compared with the vector control, with relative cation selectivity.¹¹ Several studies have linked claudins to increased Cl⁻ permeability, but whether this occurs through an increase in paracellular permeability or through upregulation of transcellular transport was not clearly determined in most of them.¹²⁻¹⁵ Recently, claudin-10a and claudin-17 have been characterized as being anion selective,⁴⁶ but claudin-10a is expressed at extremely low levels in the proximal colon (data not shown), and claudin-17 mRNA is absent in the colon⁴⁷ and is also not upregulated in the inflamed intestine (J.-D. Schulzke, personal communication, August 2012). In our study, the observed changes in claudin expression pattern included increased expression of tightening as well as “pore-forming” components and no obvious explanation for the decrease in cation selectivity. However, it is known that claudins are expressed in rodent colon, which have not been studied for their ion permeation properties in detail but do pose additional pathways for cations and/or anion.^{48,49} We did find a strong downregulation in occludin expression (as mentioned above), and the immunohistochemistry

revealed a normal localization of the TJ components in the zones of cell–cell contacts but a coarser architecture in the TNF^{ΔARE} heterozygote mucosa. Given the complexity of the TJ, it may be that in the present case, not a single protein directly confers increased HCO₃⁻ permeability but that expressional changes of other, even tightening components alter TJ regulation and increase permeability for HCO₃⁻, as it has been suggested for renal cells.⁵⁰

What may be the clinical implications of our findings? On a local level, the increased HCO₃⁻ leakage will change mucosal surface pH and likely affect the mucosa-associated hydrogenotrophic gut flora⁵¹ and luminal flora,³ alter the microbial fermentation, and influence colonic health. Alterations of gut flora composition have indeed been observed during intestinal inflammation,⁵² and are believed to be involved in IBD pathogenesis.⁵³ The functional downregulation of both Na⁺/H⁺ and Cl⁻/HCO₃⁻ exchangers of the surface epithelium, in combination with increased HCO₃⁻ leakage, observed even in this mild nonerosive inflammatory state as observed in the TNF^{ΔARE} proximal colon, will completely alter the segmental surface cell pH profiles and luminal bulk pH in the different colonic segments and thus be one of the reasons for alteration of gut microbiome during intestinal inflammation, with possible detrimental consequences. The second consequence of paracellular HCO₃⁻ leakage in the inflamed intestine may be a very considerable loss of base equivalents from the systemic circulation. It is likely that this leakage occurs wherever intestinal epithelium is inflamed, although, as discussed above, this will be difficult or even impossible to prove in intestinal segments with significant active HCO₃⁻ transport masking additional HCO₃⁻ leakage. Because inflammation also downregulates DRG-mediated Cl⁻/HCO₃⁻ exchange, this loss of HCO₃⁻ is in part compensated, but for the price of losing Cl⁻. A third consequence of paracellular HCO₃⁻ leakage will be the loss of acidic microclimate in those segments of the gut where it is present and necessary to drive proton-coupled nutrient uptake, such as in the jejunum and ileum, or nonionic diffusion of weak acids, such as short chain fatty acids in the proximal colon.

In summary, we describe an enhanced luminal alkalization associated with a TJ defect in chronic intestinal inflammation, which is likely to have a significant effect on epithelial pH homeostasis, making it an important pathophysiological factor in inflammatory bowel disease.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank George Kollias for providing the TNF^{ΔARE} mouse model, Ulrike Bode and Manuela Büttner for the B220 antibody, and Mathias Homef and Natalie Torow for the CD3 antibody.

REFERENCES

- Garcia MA, Yang N, Quinton PM. Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J Clin Invest*. 2009;119:2613–2622.
- Vidyasagar S, Barmeyer C, Geibel J, et al. Role of short-chain fatty acids in colonic HCO₃⁻ secretion. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2005;288:G1217–G1226.
- Duncan SH, Louis P, Thomson JM, et al. The role of pH in determining the species composition of the human colonic microbiota. *Environ Microbiol*. 2009;11:2112–2122.
- Field M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J Clin Invest*. 2003;111:931–943.
- Sundaram U, West AB. Effect of chronic inflammation on electrolyte transport in rabbit ileal villus and crypt cells. *Am J Physiol*. 1997;272:G732–G741.
- Press AG, Hauptmann IA, Hauptmann L, et al. Gastrointestinal pH profiles in patients with inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther*. 1998;12:673–678.
- Ewe K, Schwartz S, Petersen S, et al. Inflammation does not decrease intraluminal pH in chronic inflammatory bowel disease. *Dig Dis Sci*. 1999;44:1434–1439.
- Nugent SG, Kumar D, Rampton DS, et al. Intestinal luminal pH in inflammatory bowel disease: possible determinants and implications for therapy with aminosaliculates and other drugs. *Gut*. 2001;48:571–577.
- Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, et al. Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology*. 1999;116:301–309.
- Colegio OR, Van Itallie CM, McCreary HJ, et al. Claudins create charge-selective channels in the paracellular pathway between epithelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2002;283:C142–C147.
- Amasheh S, Meiri N, Gitter AH, et al. Claudin-2 expression induces cation-selective channels in tight junctions of epithelial cells. *J Cell Sci*. 2002;115:4969–4976.
- Gunzel D, Amasheh S, Pfaffenbach S, et al. Claudin-16 affects transcellular Cl⁻ secretion in MDCK cells. *J Physiol*. 2009;587:3777–3793.
- Ohta A, Yang SS, Rai T, et al. Overexpression of human WNK1 increases paracellular chloride permeability and phosphorylation of claudin-4 in MDCKII cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006;349:804–808.
- Tatum R, Zhang Y, Lu Q, et al. WNK4 phosphorylates ser206 of claudin-7 and promotes paracellular Cl⁻ permeability. *FEBS Lett*. 2007;581:3887–3891.
- Angelow S, Kim KJ, Yu AS. Claudin-8 modulates paracellular permeability to acidic and basic ions in MDCK II cells. *J Physiol*. 2006;571:15–26.
- Van Itallie CM, Anderson JM. Measuring size-dependent permeability of the tight junction using PEG profiling. *Methods Mol Biol*. 2011;762:1–11.
- Prasad S, Mingrino R, Kaukinen K, et al. Inflammatory processes have differential effects on claudins 2, 3 and 4 in colonic epithelial cells. *Lab Invest*. 2005;85:1139–1162.
- Zeissig S, Burgel N, Gunzel D, et al. Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut*. 2007;56:61–72.
- Seidler U. Acta Physiologica symposium: acid-base transporters and epithelial electrolyte transport. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;201:1–2.
- Bachmann O, Seidler U. News from the end of the gut—how the highly segmental pattern of colonic HCO₃⁻ transport relates to absorptive function and mucosal integrity. *Biol Pharm Bull*. 2011;34:794–802.
- Bachmann O, Juric M, Seidler U, et al. Basolateral ion transporters involved in colonic epithelial electrolyte absorption, anion secretion and cellular homeostasis. *Acta Physiol (Oxf)*. 2011;201:33–46.
- Binder HJ, Rajendran V, Sadasivan V, et al. Bicarbonate secretion: a neglected aspect of colonic ion transport. *J Clin Gastroenterol*. 2005;39:S53–S58.
- Endeward V, Gros G. Low carbon dioxide permeability of the apical epithelial membrane of guinea-pig colon. *J Physiol*. 2005;567:253–265.
- Talbot C, Lytle C. Segregation of Na/H exchanger-3 and Cl/HCO₃⁻ exchanger SLC26A3 (DRA) in rodent cecum and colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;299:G358–G367.
- Schweinfest CW, Spyropoulos DD, Henderson KW, et al. slc26a3 (dra)-deficient mice display chloride-losing diarrhea, enhanced colonic proliferation, and distinct up-regulation of ion transporters in the colon. *J Biol Chem*. 2006;281:37962–37971.
- Xiao F, Juric M, Li J, et al. Loss of downregulated in adenoma (DRA) impairs mucosal HCO₃⁻ secretion in murine ileocolonic inflammation. *Inflam Bowel Dis*. 2012;18:101–111.
- Kontoyiannis D, Pasparakis M, Pizarro TT, et al. Impaired on/off regulation of TNF biosynthesis in mice lacking TNF AU-rich elements:

- implications for joint and gut-associated immunopathologies. *Immunity*. 1999;10:387–398.
28. Guba M, Kuhn M, Forssmann WG, et al. Guanylin strongly stimulates rat duodenal HCO₃⁻ secretion: proposed mechanism and comparison with other secretagogues. *Gastroenterology*. 1996;111:1558–1568.
 29. Kahle KT, MacGregor GG, Wilson FH, et al. Paracellular Cl⁻ permeability is regulated by WNK4 kinase: insight into normal physiology and hypertension. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101:14877–14882.
 30. Markov AG, Veshnyakova A, Fromm M, et al. Segmental expression of claudin proteins correlates with tight junction barrier properties in rat intestine. *J Comp Physiol B*. 2010;180:591–598.
 31. Seidler U, Lenzen H, Cinar A, et al. Molecular mechanisms of disturbed electrolyte transport in intestinal inflammation. *Ann N Y Acad Sci*. 2006;1072:262–275.
 32. Clayburgh DR, Musch MW, Leitges M, et al. Coordinated epithelial NHE3 inhibition and barrier dysfunction are required for TNF-mediated diarrhea in vivo. *J Clin Invest*. 2006;116:2682–2694.
 33. Yeruva S, Farkas K, Hubricht J, et al. Preserved Na⁽⁺⁾/H⁽⁺⁾ exchanger isoform 3 expression and localization, but decreased NHE3 function indicate regulatory sodium transport defect in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1149–1161.
 34. Heller F, Florian P, Bojarski C, et al. Interleukin-13 is the key effector Th2 cytokine in ulcerative colitis that affects epithelial tight junctions, apoptosis, and cell restitution. *Gastroenterology*. 2005;129:550–564.
 35. Tang Y, Clayburgh DR, Mittal N, et al. Epithelial NF- κ B enhances transmucosal fluid movement by altering tight junction protein composition after T cell activation. *Am J Pathol*. 2010;176:158–167.
 36. Martinez-Augustin O, Romero-Calvo I, Suarez MD, et al. Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflamm Bowel Dis*. 2009;15:114–127.
 37. Zhang H, Ameen N, Melvin JE, et al. Acute inflammation alters bicarbonate transport in mouse ileum. *J Physiol*. 2007;581:1221–1233.
 38. Yang H, Jiang W, Furth EE, et al. Intestinal inflammation reduces expression of DRA, a transporter responsible for congenital chloride diarrhea. *Am J Physiol*. 1998;275:G1445–G1453.
 39. Yu H, Riederer B, Steger N, et al. Secretagogue stimulation enhances NBCe1 (electrogenic Na⁽⁺⁾/HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter) surface expression in murine colonic crypts. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297:G1223–G1231.
 40. Farkas K, Yeruva S, Rakoneczay Z Jr, et al. New therapeutic targets in ulcerative colitis: the importance of ion transporters in the human colon. *Inflamm Bowel Dis*. 2011;17:884–898.
 41. Suenart P, Maerten P, Van AG, et al. Effects of T cell-induced colonic inflammation on epithelial barrier function. *Inflamm Bowel Dis*. 2010;16:1322–1331.
 42. Hering NA, Schulzke JD. Therapeutic options to modulate barrier defects in inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2009;27:450–454.
 43. Amasheh M, Fromm A, Krug SM, et al. TNF α -induced and berberine-antagonized tight junction barrier impairment via tyrosine kinase, Akt and NF κ B signaling. *J Cell Sci*. 2010;123:4145–4155.
 44. Ye D, Guo S, Al-Sadi R, et al. MicroRNA regulation of intestinal epithelial tight junction permeability. *Gastroenterology*. 2011;141:1323–1333.
 45. Al-Sadi R, Khatib K, Guo S, et al. Occludin regulates macromolecule flux across the intestinal epithelial tight junction barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2011;300:G1054–G1064.
 46. Krug SM, Gunzel D, Conrad MP, et al. Charge-selective claudin channels. *Ann N Y Acad Sci*. 2012;1257:20–28.
 47. Krug SM, Gunzel D, Conrad MP, et al. Claudin-17 forms tight junction channels with distinct anion selectivity. *Cell Mol Life Sci*. 2012;69:2765–2778.
 48. Inai T, Sengoku A, Guan X, et al. Heterogeneity in expression and subcellular localization of tight junction proteins, claudin-10 and -15, examined by RT-PCR and immunofluorescence microscopy. *Arch Histol Cytol*. 2005;68:349–360.
 49. Fujita H, Chiba H, Yokozaki H, et al. Differential expression and subcellular localization of claudin-7, -8, -12, -13, and -15 along the mouse intestine. *J Histochem Cytochem*. 2006;54:933–944.
 50. Sas D, Hu M, Moe OW, et al. Effect of claudins 6 and 9 on paracellular permeability in MDCK II cells. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2008;295:R1713–R1719.
 51. Nava GM, Carbonero F, Croix JA, et al. Abundance and diversity of mucosa-associated hydrogenotrophic microbes in the healthy human colon. *ISME J*. 2012;6:57–70.
 52. van Nuenen MH, Venema K, van der Woude JC, et al. The metabolic activity of fecal microbiota from healthy individuals and patients with inflammatory bowel disease. *Dig Dis*. 2004;49:485–491.
 53. Swidsinski A, Weber I, Loening-Baucke V, et al. Spatial organization and composition of the mucosal flora in patients with inflammatory bowel disease. *J Clin Microbiol*. 2005;43:3380–3389.

3 Diskussion

3.1 HCO_3^- -Transport und epitheliale Integrität des entzündeten Kolon

Bei CED treten signifikante Defekte in der Barrierefunktion und erhöhter transzellulärer Transport auf (305, 306, 331). Neben einer verringerten elektrogenen und elektroneutralen Na^+Cl^- -Absorption wird ein geringerer epithelialer Gewebewiderstand als Ursache für die gesenkte Salz- und Wasserabsorption des entzündeten Kolon vermutet (302, 314).

Um herauszufinden, welche pathophysiologischen Umstände innerhalb des murinen Kolon vorliegen, wurde zunächst untersucht, ob ein dysregulierter Transport bzw. eine veränderte Barrierefunktion bei chronischer intestinaler Entzündung vorliegt. Heterozygote $\text{TNF}^{+\Delta\text{ARE}}$ Mäuse entwickeln chronische Entzündungen im Duodenum, Ileum, proximalen und distalen Kolon, was sie zu einem guten Modell für die Untersuchung chronischer Entzündungen im Intestinaltrakt macht. Vorherige Arbeiten über die HCO_3^- -Sekretion im entzündeten Kolon zeigten eine verringerte HCO_3^- -Sekretion des Ileum und mittleren Kolon von $\text{TNF}^{+\Delta\text{ARE}}$ Mäusen, die von luminal verfügbarem Cl^- abhängig war (394). Es konnte eine normale Aktivität von ENaC, NHE3, CFTR, NBC aber eine stark verringerte Expression von DRA festgestellt werden (394, 396), was die Herabregulation von DRA als essentiellen Mediator der HCO_3^- -Sekretion im Kolon bestätigt. Innerhalb des proximalen Kolon wird DRA im Gegensatz zum mittleren und distalen Kolon kaum exprimiert (348), weshalb dieses Segment für die Untersuchung der epithelialen Barriere und dessen Durchlässigkeit für HCO_3^- verwendet wurde. In einer Kooperation wurde deshalb vorerst auf Organebene die intestinale Permeabilität des proximalen entzündeten Kolon von $\text{TNF}^{\Delta\text{ARE}}$ Mäusen, die Expression der Bestandteile von Tight Junctions und apikaler $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austauscher, sowie die basale und stimulierte HCO_3^- -Sekretion untersucht.

Die Versuche der Kooperationspartner zeigten, dass das proximale Kolon von $\text{TNF}^{+/\Delta\text{ARE}}$ Mäusen in Ussing Kammer Experimenten unter Verwendung der ^3H -Mannitol-Messung und der Bestimmung von Dilutionspotentialen verglichen mit ihren gesunden Geschwistern eine hohe luminale Alkalisierung, einen erhöhten HCO_3^- -Verlust des Epithels, eine erhöhte parazelluläre Permeabilität sowie eine verringerte Kationenselektivität aufweist. Es wurde keine Veränderung des basalen oder stimulierten I_{sc} , gemessen, weshalb ein abnormaler Anionentransport durch CFTR oder andere Transporter als Ursache ausgeschlossen werden kann. Um herauszufinden, ob eine NHE3-medierte Protonenextrusion die erhöhte luminale Alkalisierung verursacht, wurde in Ussing Kammer Experimenten die luminale Alkalisierung des proximalen Kolon von $\text{TNF}^{+/\Delta\text{ARE}}$ Mäusen in Anwesenheit des NHE3 Inhibitors S1611 unter Cl^- -freien Bedingungen gemessen (die verwendete Methode der Ussing Kammer ist unter Anhang C beschrieben). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Inhibition von NHE3 durch S1611 keinen Einfluß auf die luminale Alkalisierungsrate hatte. Stattdessen wurde eine herabregulierte Occludin-Expression bei gleichzeitig erhöhter Expression der Claudine-2 und -5 durch die Kooperationspartner gemessen. Immunhistochemische Färbungen lassen vermuten, dass eine Dyslokation von Occludinen nicht stattfindet aber eine reduzierte Verteilung der Schlussleisten bei $\text{TNF}^{+/\Delta\text{ARE}}$ Mäusen auftritt.

Durch die abnormale Zusammensetzung der Tight Junctions aufgrund der veränderten Expression der enthaltenen Proteine könnte die verringerte Dichte der Tight Junctions und die erhöhte epitheliale Durchlässigkeit für HCO_3^- erklärt werden. Zeissig et al stellten anhand von Biopsien von Patienten mit CED ebenfalls eine veränderte Struktur der Tight Junctions, eine erhöhte Expression von Claudin-2 und einen reduzierten epithelialen Widerstand fest (408). Der erhöhte Bikarbonatverlust des Epithels könnte somit die beobachtete luminale Alkalisierung des proximalen Kolon verursachen. Weil eine saure Umgebung für die Protonen-gekoppelte Absorption von SCFA in diesem Segment wichtig

ist (348), könnte dessen Absorption beeinflusst werden, wodurch die luminale Alkalisierung zusätzlich verstärkt werden könnte, weil weniger HCO_3^- im Austausch für SCFA sezerniert werden kann.

Der apikale Bikarbonat-Export ist von der intrazellulären Verfügbarkeit von HCO_3^- und partiell von der Aktivität des basolateralen elektrogenen NBCe1 abhängig (16, 119, 172, 193, 404). Nachdem gezeigt worden ist, dass wahrscheinlich ein verstärkter Bikarbonatverlust innerhalb des chronisch entzündeten murinen proximalen Kolon bei $\text{TNF}^{+/ΔARE}$ Mäusen für die erhöhte luminale Alkalisierung verantwortlich ist, sollte nachfolgend auf zellulärer Ebene die kurzzeitige Stimulation der Aktivität und Expression des murinen kolonischen NBCe1-B durch Forskolin und Carbachol unter Berücksichtigung der regulatorischen Funktion der PKC in dieser Arbeit untersucht werden. Eine Beschreibung der verwendeten Materialien und Methoden befindet sich im Anhang A bis Anhang C. Die Mechanismen der Regulation von PKC Isoformen sind komplex, weshalb zuerst dessen Phosphorylierung und Aktivierung näher beschrieben wird.

3.2 Aktivierung der PKC durch Forskolin, Carbachol und PMA

Um die Relevanz der PKC bei der Regulation des murinen NBCe1-B zu untersuchen, wurde zunächst durch immunhistochemische Färbungen bestätigt, dass sich sowohl die konventionelle $\text{PKC}\alpha$, als auch die neuen $\text{PKC}\delta$ und $\text{PKC}\epsilon$ Isoformen in unmittelbarer Nähe des basolateral lokalisierten NBCe1-B im murinen Kolon befinden. Innerhalb dieser Arbeit wurde nachfolgend gezeigt, dass nach der Stimulation mit Forskolin, Carbachol und PMA sowohl eine verstärkte Phosphorylierung von $\text{PKC}\alpha$ und $\text{PKC}\epsilon$, als auch die Translokation von PKC Isoformen zur Plasmamembran erfolgt, was Voraussetzung für deren enzymatische Aktivität ist (96, 179). Nach Vorinkubation mit dem Inhibitor Gö6850, der die Aktivität konventioneller und neuer PKC Isoformen blockiert,

wurde eine verringerte PMA-, Carbachol- und Forskolin-induzierte Phosphorylierung der PKC α Isoform gemessen. Unter gleichen Bedingungen führte jedoch nur eine Inkubation mit Gö6850 und PMA zu einer signifikant verringerten Phosphorylierung der PKC ϵ Isoform. Die Stimulation mit Forskolin und Carbachol führte hingegen zu einer gesteigerten Phosphorylierung von PKC ϵ , was durch die Applikation von Gö6850 nicht inhibiert worden ist. Diese Ergebnisse lassen unterschiedliche Effekte der Sekretagoga- und Phorbolster-induzierten Stimulation der verschiedenen PKC Isoformen vermuten und sprechen für eine bedeutende Rolle der neuen PKC ϵ Isoform. Tuo et al. untersuchten die HCO $_3^-$ -Sekretion bei Mäusen und fanden, dass die cAMP-stimulierte duodenale HCO $_3^-$ -Sekretion durch eine einstündige Vorinkubation mit PMA PKC ϵ -abhängig potenziert werden konnte, jedoch keinen Effekt auf die Carbachol-induzierte HCO $_3^-$ -Sekretion hatte (358), was ebenfalls für eine bedeutende Funktion der PKC ϵ Isoform spricht. Die unveränderte Phosphorylierung von PKC ϵ nach Stimulation mit Forskolin und Carbachol in Anwesenheit des Inhibitors Gö6850 könnte durch die Beteiligung des mammalian target of rapamycin (mTOR) und über die divergenten Degradationsprozesse der PKC Isoformen erklärt werden.

Es wird angenommen, dass die 3-Phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK1) bei der initiellen Phosphorylierung aller PKC Isoformen beteiligt ist, was neben der Translokation für die Aktivierung der PKC als essenzieller Schritt angesehen wird (24, 130, 190, 242, 255). Die Phosphoinositid 3-Kinase (PI3K) kann über G-Protein gekoppelte Rezeptoren und Forskolin aktiviert werden und phosphoryliert membranständiges Phosphatidylinositol (38, 81, 342, 355, 368), wodurch Phosphatidylinositol-3,4-Diphosphat (PIP $_2$) und Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat (PIP $_3$) als sekundäre Botenstoffe freigesetzt werden (256, 300), die wiederum die Kinaseaktivität der PDK1 regulieren (33, 368, 392) und zudem die PLC aktiviert (21, 103), was die PIP $_2$ -Hydrolyse zu DAG und IP $_3$ stimuliert (287). Dadurch könnte über die Sekretagoga-vermittelte Stimulation

der Zelle sowohl die initiale Phosphorylierung der PKC Isoformen, als auch die z.T. für die weitere vollständige Aktivierung der PKC Isoformen benötigte Generation von DAG ausgelöst werden. Eine ausführliche Beschreibung über die Phosphorylierung und Aktivierung der PKC Isoformen sind im Anhang D. 1 und Anhang D. 2 aufgeführt.

3.2.1 Phosphorylierung und Aktivierung der PKC durch mTOR

Parallel zu der initiellen PDK1-medierten Phosphorylierung der PKC Isoformen ist allerdings die Aktivierung des mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) und mTORC2 für die weitere Phosphorylierung und Aktivierung von PKC Isoformen wichtig (102, 165, 266, 267, 303, 413), wobei die mTOR Komplexe ebenfalls PI3K-abhängig reguliert werden (143, 197, 198, 401). Eine ausführlichere Beschreibung der Regulation von mTOR, bei der PKC Isoformen beteiligt sind, ist im Anhang D. 3 beschrieben.

Phorbolster, Forskolin und Carbachol induzieren die Phosphorylierung von mTOR bzw. mTOR Substraten über unterschiedliche Mechanismen, die größtenteils wiederum von neuen PKC Isoformen und der Beteiligung von Akt abhängig sind (58, 73, 98, 164, 183, 240, 244, 254, 330). Dadurch könnten diese Agonisten der PKC insbesondere eine PKC β - und PKC ϵ -abhängige Phosphorylierung und Aktivierung von Akt auslösen, was wiederum die Aktivität des mTORC1 steigert und eine verstärkte Phosphorylierung von PKC Isoformen auslösen könnte.

Die Stimulation durch Sekretagoga erhöht die Aktivität von mTOR in humanen Zellen (98, 183) und verringert die Akt/PRAS40/TSC2-vermittelte mTORC1-Inhibition (siehe Anhang D. 3), wodurch eine verstärkte Phosphorylierung und Aktivierung der PKC α (Ser⁶⁵⁷), PKC δ (Ser⁶⁶²) und PKC ϵ (Ser⁷²⁹) Isoform durch mTORC1 ausgelöst werden könnte (266, 413). Eine PKC-abhängige Aktivierung von mTOR durch Forskolin und Carbachol könnte eine verstärkte Phosphorylierung, insbesondere neuer PKC Isoformen auslösen. Rybin et al.

zeigten, dass die Kinaseaktivität der PKC δ Isoform wiederum für die Phosphorylierung von PKC ϵ wichtig ist (297), weshalb die Phosphorylierung der PKC ϵ Isoform nach Stimulation mit Forskolin und Carbachol, welche die Aktivität der PKC δ Isoform erhöhen, potenziert werden könnte.

Trotz der Inhibition der PKC ϵ Isoform durch Gö6850 könnte dadurch nach cholinergem und cAMP-induzierter Stimulation eine verstärkte Phosphorylierung des hydrophoben Motivs von PKC ϵ an Ser⁷²⁹, was durch den in dieser Arbeit verwendeten Antikörper detektiert wird, eine gesteigerte Menge der phosphorylierten PKC ϵ Isoform verursachen, was in dieser Arbeit beobachtet worden ist. Hinzu kommt, dass die PKC ϵ Isoform sowohl durch mTORC1, als auch mTORC2 phosphoryliert wird (102, 266, 413), was ebenfalls für eine bedeutende Rolle und verstärkte mTOR-bedingte Phosphorylierung und Aktivierung der PKC ϵ Isoform im Vergleich mit anderen PKC Isoformen vermuten lässt.

3.2.2 Degradation von PKC Isoformen

Im Gegensatz zu PKC ϵ wurde nach der Stimulation mit Forskolin und Carbachol in Anwesenheit von Gö6850 eine verringerte Menge der phosphorylierten PKC α Isoform in dieser Arbeit detektiert.

Eine kurzzeitige Inkubation mit Agonisten führt zu der Aktivierung von PKC Isoformen, nach längerer Inkubation jedoch zu deren Herunterregulation. Nach einer Phorbol-ester-induzierten initiellen Aktivierung der PKC α , δ und ϵ Isoform erfolgte bei Nagetieren die Konjugation der PKC Isoformen mit Ubiquitin und eine Proteasom-abhängigen Degradation (100, 216, 233, 338). Dieser Ubiquitin/proteasomale Abbau erforderte weder die Internalisierung noch die Dephosphorylierung der PKC α Isoform, wohingegen ein zweiter Mechanismus durch die endosomale Internalisierung konventioneller PKC Isoformen und eine Proteasom-unabhängige Dephosphorylierung und Degradation über Lysosome und der Beteiligung von Proteinphosphatasen erfolgt (205, 217). Der Abbau der

PKC α durch Proteasome und Lysosome kann parallel in intestinalen Epithelzellen stattfinden und durch einen einzigen PKC-Agonisten ausgelöst werden (205). Im Gegensatz zu den konventionellen PKC Isoformen scheint die Degradation der murinen PKC ϵ Isoform nur Proteasom-abhängige statt zu finden, wobei eine aktive Kinase bzw. vollständige Phosphorylierung von PKC ϵ benötigt wird (216). Diese unterschiedliche Degradation könnte dazu führen, dass im Vergleich zu PKC ϵ eine geringere Anzahl von phosphorylierten PKC α Proteinen bei Stimulation mit Sekretagoga und paralleler Inhibition mit Gö6850 detektiert worden ist. Der in dieser Arbeit verwendete pPKC α Antikörper detektiert das hydrophobe Motiv (Ser⁶⁵⁷) und die Degradation von PKC α könnte insbesondere in Anwesenheit von Gö6850 und PMA mit einer Dephosphorylierung dieser C-terminalen Region korreliert sein. PKC α aktiviert perinukleär die PLD1, weshalb vermutlich die eigene Inaktivierung beeinflusst wird (159, 160). Frühe Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigten bereits, dass konventionelle PKC Isoformen Agonist-induziert die eigene Dephosphorylierung initiieren können (145, 200).

Eine neue Studie zeigt, dass eine Aktivierung des mTORC1 in humanen und murinen Zellen über eine erhöhte Expression proteasomaler Untereinheiten die Kapazität für die Proteindegradation steigern kann (412). Neue PKC Isoformen regulieren die Phosphorylierung der Aktivierungsschleife konventioneller PKC Isoformen (297) und eine Depletion der PKC ϵ Isoform oder der mTORC2 Komponente Rictor erhöhte die Degradation anderer PKC Isoformen in humanen Epithelzellen (32). Insbesondere die neuen PKC δ und PKC ϵ Isoformen sind bei der Regulation von mTOR beteiligt (244, 330) und könnten dadurch Einfluss auf die proteasomale Degradation haben, die insbesondere bei konventionellen PKC Isoformen erfolgt (205). Die parallele Applikation des Inhibitors neuer PKC Isoformen Gö6850 und PMA hat in dieser Arbeit eine starke Reduktion der phosphorylierten PKC ϵ Isoform verursacht, weshalb dessen Inhibition und/oder eine veränderte Aktivität von mTOR bzw. gesteigerte

Proteindegradation eine gesenkte Phosphorylierung von PKC α ausgelöst haben könnte.

Stahelin et al. führten Studien über das Membran-Targeting und die Aktivierung konventioneller und neuer PKC Isoformen durch und fanden konformative Unterschiede und wechselnde Affinitäten der C1 Domäne verschiedener PKC Isoformen gegenüber DAG (339). Die neuen PKC Isoformen sind nicht Ca²⁺-abhängig, weisen jedoch aufgrund einer modifizierten C1 Domäne eine erhöhte Affinität für DAG auf (95, 123). Für PKC ϵ wurde im Gegensatz zu anderen Isoformen eine vergleichsweise starke Affinität zu DAG und eine erhöhte Flexibilität der C1A und C1B Domäne festgestellt (340). Dadurch ist die C1 Domäne der PKC ϵ Isoform für DAG schneller zugänglich, was eine schnellere Translokation von PKC ϵ zur Plasmamembran und folglich eine schnellere Reaktion auf DAG zur Folge hat. Somit könnte eine Agonist-induzierte Aktivierung neuer PKC Isoformen schneller erfolgen und dadurch im Vergleich mit konventionellen PKCs eine gesteigerte Phosphorylierung von PKC ϵ stattfinden. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass nach der Stimulation mit Forskolin eine maximale Menge des biotinylierten NBCe1-B nach 20-minütiger Inkubation gemessen werden konnte, was durch die Stimulation mit Carbachol bereits nach 10 Minuten erfolgte (404) und durch eine unterschiedliche Kinetik bei der PKC-abhängigen cholinergen bzw. Forskolin-induzierten Translokation des NBCe1-B bedingt sein könnte. Eine andere Studie zeigte, dass PKC α entgegengesetzte Affinitäten der C1A und C1B Domäne für DAG bzw. Phorbol ester aufweist, während für die C1A/B Domänen der PKC γ Isoform jeweils gleich hohe Affinitäten für DAG/Phorbol ester nachgewiesen wurde (11). Zudem beschreibt A. Newton die Möglichkeit, dass wenn eine hohe Affinität von Phorbol estern oder eine hohe Ca²⁺-Konzentration vorliegt, PKC Isoformen allein durch die Bindung von Ca²⁺ an der C2 Domäne oder von DAG an der C1 Domäne an die Membran rekrutiert werden und die

Pseudosubstratsequenz freisetzen könnten, was die PKC Isoformen jedoch sensitiv gegenüber Dephosphorylierung und Degradation macht (256).

Die divergenten Affinitäten zu ihren Bindungspartnern lassen unterschiedliche Reaktionskinetiken, Substratbindungsaffinitäten und eventuell verschiedene Translokationseigenschaften der PKC Isoformen vermuten. Weitere Ausführungen über die DAG-induzierte Regulation von PKC Isoformen und dessen Interaktion mit diesen Signalwegen sind unter Anhang D. 6 und Anhang D. 7 beschrieben.

3.3 Regulation des NBCe1-B durch Sekretagoga und PKC

Bei der Agonist-stimulierten HCO_3^- -Sekretion ist die Aktivität des elektrogenen NBCe1-B parallel zu CFTR erhöht, was die Wichtigkeit des NBCe1 bei der basolateralen Bereitstellung von HCO_3^- für die stimulierte apikale Sekretion unterstreicht (16, 17, 172). In Kolonkrypten von CFTR-defizienten Mäusen zeigten Bachmann et al., dass im Vergleich mit gesunden Tieren eine gesenkte NBCe1-B Aktivität vorhanden ist, die durch Forskolin unabhängig von der apikalen HCO_3^- -Sekretion gesteigert werden konnte (18). Nachfolgende Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe zeigten innerhalb des murinen Dickdarms, dass die Sekretagoga Forskolin und Carbachol den NBCe1 stimulieren und eine PKC-abhängige cholinerge Modulation der NBCe1 Oberflächenexpression und Aktivität, vermutlich durch die Regulation von Exozytose und Endozytose, stattfindet (17, 18, 404). Allerdings sind in der Niere gegenläufige Ergebnisse über die Sekretagoga-induzierte NBC-Regulation erzielt worden (296), was die Spezies- bzw. organspezifische Regulation verdeutlicht.

Erstaunlicherweise zeigen die Ergebnisse der Oberflächenbiotinylierung dieser Arbeit, dass die Inhibition der PKC durch Gö6850/Gö6976 (Inkubationszeit jeweils 20 Minuten) in Anwesenheit von Forskolin und Carbachol nicht nur die Sekretagoga-vermittelte erhöhte Oberflächenexpression des NBCe1-B verhindert, sondern auch eine verringerte Membranhäufigkeit des NBCe1-B

verursacht. Mit Hilfe mikrofluorometrischer Messungen wurde ein gesteigerter Na^+ -, $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -sensitiver und DMA-unabhängiger Protonenfluss während der Erholung nativer muriner Kolonkrypten von einer Azidifikation nach Stimulation mit Forskolin gemessen, was einer verstärkten Aktivität des NBCe1-B entspricht. Die Applikation von Inhibitoren konventioneller (Gö6796) bzw. konventioneller und neuer (Gö6850) PKC Isoformen hat die erhöhte NBCe1-B Funktionalität nach Stimulation mit Forskolin jeweils vollständig gehemmt und zeigt die PKC-abhängige Modulation der NBCe1-B Aktivität durch Forskolin. Bachmann et al. fanden dagegen heraus, dass die gesteigerte Aktivität des NBCe1-B nach cholinergem Stimulation nur teilweise durch die Blockierung konventioneller PKC Isoformen durch Gö6976 aber vollständig über Gö6850 gehemmt wurde, der zusätzlich neue PKC Isoformen inhibiert (17). Dies zeigt, dass der murine NBCe1-B auf unterschiedliche Weise durch Forskolin und Carbachol reguliert wird und neue PKC Isoformen maßgeblich beteiligt sind. PKC Isoformen sind allerdings bei der Regulation der Ca^{2+} - und cAMP-Konzentration involviert und die Signalwege des Ca^{2+} -mobilisierenden Sekretagoga Carbachol bzw. die cAMP-Generation durch Forskolin interagieren miteinander, weshalb eine Unterscheidung zwischen der Ca^{2+} - bzw. cAMP-abhängigen Regulation des NBCe1-B schwierig ist. Eine Beschreibung dieser Signalkaskaden befindet sich unter Anhang D. 5. Ein weiterer möglicher Regulationsmechanismus des NBCe1-B könnte durch die Interaktion mit Karboanhydrasen erfolgen, was unter Anhang D. 4 beschrieben ist.

Von diversen Arbeitsgruppen wurde die Beteiligung der PKC bei der Modulation der Membranexpression von Ionentransportern nachgewiesen (112, 208, 275, 335, 337, 373) und ein veränderter Ionentransport wird bei der Pathophysiologie sekretorischer Diarrhö als entscheidend beschrieben (193). Agonisten modulieren die verschiedenen PKC Isoformen auf unterschiedliche Weise. Song et al. beschreiben, dass $100\mu\text{M}$ Carbachol bei intestinalen Zellen speziell die PKC ϵ Isoform aktiviert, die maßgeblich an der basolateralen

Endozytose beteiligt ist (335, 336). Untersuchungen an humanen Intestinalzellen zeigten, dass PMA parallel die PKC α , δ und ϵ Isoformen aktiviert, aber nur eine Neuverteilung von PKC ϵ und PKC α an die Membran erfolgte, während PKC δ innerhalb des Zytosols verblieben ist (334, 349). Andere Arbeitsgruppen zeigten eine PMA- und Carbachol-mediierte Endozytose des basolateralen NBCe1 und NKCC1 unter spezieller Beteiligung neuer PKC Isoformen in humanen Kolonozyten, Nierenzellen von Hunden und murinen Speicheldrüsenzellen (250, 274, 276, 349). Nach Perry et al. könnte die PMA- und Carbachol-vermittelte Endozytose 5-15 Minuten nach Stimulation eine Neuverteilung und Anpassung des NBCe1-B an das neue Fließgleichgewicht darstellen.

PMA verursachte eine schnelle Stimulation der basolateralen Endozytose, gefolgt von einer verlangsamten Rückkehr zum Basalzustand (335). Im Gegensatz zu Carbachol verhinderte PMA allerdings auch die Wiederherstellung der funktionellen Aktivität des basolateralen NKCC1, vermutlich durch die PKC-vermittelte Regulation einer erneuten Expression des NKCC1 (59, 105).

Die Stimulation der basolateralen Endozytose durch PMA wurde durch die Inhibition neuer PKC Isoformen (durch Gö6850) blockiert und war mit der Translokation der PKC ϵ Isoform und der Beteiligung von F-Actin und des F-Actin verbindenden Protein myristoylated alanine-rich C kinase substrate (MARCKS) korreliert (335). MARCKS wird neben der PKC ϵ Isoform jedoch auch durch die konventionelle PKC α Isoform phosphoryliert (363), was die Neuverteilung von MARCKS von der Plasmamembran zum Zytosol und dessen Verbindung mit F-Actin beeinflusst (147) und wiederum die Einstülpung der basolateralen Membran und die Endozytose reguliert (335). Song et al. beobachteten einen PMA-induzierten und vermutlich PKC α -abhängigen verringerten transepithelialen Widerstand (334), der durch die PKC α - und PKC ϵ -bedingte Neustrukturierung von F-Actin/MARCKS bedingt sein könnte. Die Beteiligung konventioneller und neuer PKC Isoformen bei der Modulation des Zytoskeletts wird auch durch den mTORC2 gezeigt, der die konventionelle

PKC α Isoform (Thr⁶³⁸) (165, 303) und die neue PKC ϵ (S⁷²⁹) Isoform (165, 243) phosphoryliert und bei der Regulation des Aktin-Zytoskeletts involviert ist (245, 303). Die Regulation der Endozytose und die Remodelierung des Zytoskeletts erfolgten dadurch wahrscheinlich PKC ϵ - und PKC α -abhängig. Die PKC-abhängige Regulation von Endozytose und Exozytose könnte aber stimulationsspezifisch über unterschiedliche Mechanismen erfolgen, die von der Aktivierung konventioneller und/oder neuer PKC Isoformen abhängig sind. Dies würde auch erklären, weshalb die Inhibition der verschiedenen PKCs unterschiedliche Auswirkungen auf die Internalisierung von Transportern hat.

Die besondere Rolle der neuen PKC Isoformen bei der Regulation des NBCe1-B durch Sekretagoga wird durch die Verwendung des Inhibitors konventioneller PKC Isoformen (Gö6976) verdeutlicht, der innerhalb dieser Arbeit nur eine partielle Inhibition der NBCe1-B Expression durch Forskolin bzw. Carbachol (8% bzw. 31%) verursachte. Erfolgte eine Inkubation mit Gö6850, der konventionelle und neue PKC Isoformen inhibiert, wurde die Oberflächenexpression des NBCe1 hingegen um 40% bzw. 59% verringert. Die Biotinylierungsergebnisse der unterschiedlichen phosphorylierten PKC Isoformen dieser Arbeit sprechen parallel für eine wichtige Rolle der PKC ϵ Isoform und die Beteiligung der neuen PKC Isoformen als wichtige Signalmoleküle wurde bei der Entwicklung unterschiedlicher Typen der Colitis beschrieben (224, 251).

PMA verursachte die Endozytose des NBCe1-B und Carbachol führte nach anfänglich gesteigerter NBCe1-B Aktivität zu einer PKC-abhängigen Neuverteilung des NBCe1-B in NBCe1-transfizierten Speicheldrüsenzellen (274, 277). Die in dieser Arbeit verwendeten nativen Kolonkrypten ermöglichen im Gegensatz zu den häufig verwendeten NBCe1-transfizierten/exprimierenden Zelllinien die Untersuchung der Sekretagoga-vermittelten Modulation des murinen kolonischen NBCe1-B in nativen Kolonkrypten direkt nach der Stimulation. Frühere Ergebnisse unserer Arbeitsgruppe von Yu et al. zeigten an

nativen Kolonkrypten, dass die Inhibition der Endozytose durch Colchicin und Chlorpromazin zu einer erhöhten NBCe1-B Häufigkeit aufgrund eines blockierten Recyclings des Transporters führt, ohne die Aktivität des NBCe1-B zu verändern, wobei eine Inhibition der Aktin-Polymerisation keinen Einfluss hatte (404).

Mit der in dieser Arbeit verwendeten Methode der Oberflächenbiotinylierung lässt sich allerdings nicht feststellen, ob eine gesteigerte Endozytose und/oder gesenkte Exozytose des NBCe1-B nach der Stimulation mit Sekretagoga erfolgt. Die mikrofluorometrische Untersuchung des Na^+ - und $\text{CO}_2/\text{HCO}_3^-$ -abhängigen, DMA-unabhängigen Protonenflusses bei Stimulation mit Forskolin und 10 minütiger Vorinkubation mit Gö6850/Gö6976 zeigten im Vergleich mit den Kontrollwerten keine signifikant verringerte NBCe1-B Aktivität, was gegen eine verstärkte Internalisierung des NBCe1-B spricht. Allerdings könnte eine Forskolin-vermittelte, gesteigerte NBCe1-B Aktivität die gesenkte Funktionalität infolge einer verringerten Membranexpression des NBCe1-B in Anwesenheit von Sekretagoga und PKC Inhibitoren z.T. kompensieren. Durch Sekretagoga erfolgt wahrscheinlich die PKC-abhängige Exozytose und Aktivitätssteigerung des NBCe1-B, wohingegen eine Inhibition der PKC eine intrazelluläre Neuverteilung des NBCe1-B verursacht.

3.3.1 Autoinhibition des elektrogenen $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Kotransporter

McAlear et al. beobachteten 2006, dass die NBCe1-B und NBCe1-C Isoform nur ca. 20% bis 30% der Aktivität des NBCe1-A aufweisen und fanden, dass der N-Terminus des NBCe1-A eine autostimulatorische Domäne besitzt (230). Im Gegensatz dazu fungiert der N-Terminus der NBCe1-B und NBCe1-C Kotransporter als autoinhibitorische Domäne (203). Folglich unterscheiden sich Aktivität und Regulation der verschiedenen NBCe1 Splice Varianten. Die Autoinhibition des NBCe1-B erfolgt im Ruhezustand aufgrund einer Bindung des Gerüstproteins with no lysine protein kinases 1 (WNK) an 4-Ste20-related

proline-alanine-rich kinases (SPAK), welche NBCe1 und CFTR phosphorylieren und dessen Membranexpression verringern (399, 400).

3.3.2 Aktivierung des NBCe1 durch IRBIT und Freisetzung von Ca^{2+}

Eine Agonist-vermittelte Aktivierung der membranständigen Phospholipase C führt über die Hydrolyse des Phospholipids Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) zur Freisetzung von DAG und Inositol-1,4,5-trisphosphat (IP_3) (40, 235, 270, 389). In sekretorischen Zellen bindet das Inositol-1,4,5-trisphosphate receptor binding protein released with IP_3 (IRBIT) kompetitiv an IP_3 -Rezeptoren (IP_3R) des endoplasmatischen Retikulums (ER) und inhibiert die IP_3R -vermittelte Freisetzung von Ca^{2+} , wenn kein zytoplasmatisches IP_3 vorhanden ist (12). Führt ein Agonist durch PIP_2 -Hydrolyse zur Generation von IP_3 , bindet es an die IP_3Rs , was eine Dissoziation von IRBIT, die Öffnung der IP_3Rs und die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER zur Folge hat (33, 236, 237, 326). Die Stimulation mit cAMP durch Forskolin führte PKA-abhängig zu einer Phosphorylierung der IP_3Rs , was eine schnellere Freisetzung von IRBIT und der Aktivierung von Transportern verursachte (270). IRBIT bindet daraufhin an den N-terminalen Rest 37-65 des NBCe1-B und rekrutiert die Protein Phosphatase 1 (PP1), welche durch Dephosphorylierung die Autoinhibition durch WNK/SPAK aufhebt, die Transportrate erhöht und eine verstärkte NBCe1-B und CFTR-Membranexpression bewirkt (157, 203, 326, 399, 400). Die Stimulation der Sekretion über IRBIT/PP1 agiert somit als Antagonist der WNK/SPAK medierten Autoinhibition (269, 399, 400). Von verschiedenen Arbeitsgruppen wurde bestätigt, dass IRBIT die Aktivität des NBCe1-B und NBCe1-C, jedoch nicht die der NBCe1-A Isoform erhöht (203, 326, 400). Dies liegt vermutlich an einer N-terminalen Bindungsstelle des NBCe1-B und NBCe1-C für IRBIT, die der NBCe1-A Isoform fehlt (326).

3.3.3 Regulation des Anionentransports durch IRBIT

IRBIT ist zwischen verschiedenen Spezies hoch konserviert und die humanen und murinen orthologen Gene stimmen zu 100% überein (13). IRBIT reguliert die Funktion des NBCe1-B (326), NHE3 (150), NKCC1 (351), CFTR (400) und erhöht die Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Kanals (157, 400).

Durch die Aktivierung von CFTR und NBCe1-B wird die luminale HCO_3^- -Sekretion durch eine verstärkte Aktivierung und Oberflächenexpression der Transporter erhöht (270, 326, 400). Allerdings zeigten Yang et al., dass die Aktivierung von NBCe1-B und CFTR unterschiedliche IRBIT-Domänen erfordert, was divergente Mechanismen der Regulation vermuten lässt (400). Die elektrogenen NBCe1-B/C, die elektroneutralen NBCn1, 2 und der Na^{2+} -abhängige $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austauscher (NDCBE; SLC4A8) haben N-terminale Bindungsstellen für IRBIT und werden z.T. durch IRBIT aktiviert (48, 157). Hong et al. zeigten, dass eine konservierte AS-Sequenz des NBCe1-B und die CFTR-R- und STAS-Domäne für dessen Aktivierung durch $\text{PIP}_2/\text{IRBIT}$ benötigt wird (157). IRBIT besitzt wiederum mehrere N-terminale Serin/Threonin-Phosphorylierungsstellen, die für die Interaktion von IRBIT mit den IP_3Rs (12) bzw. mit NBCe1-B (326) wichtig sind und die unterschiedliche regulatorische Spezifität von IRBIT erklären könnten. Allerdings ist über die phosphorylierenden Kinasen bisher wenig bekannt.

Park et al. zeigten in murinen sekretorischen Zellen, dass IRBIT cAMP- und Ca^{2+} -Signalwege synchronisiert, indem die cAMP-medierte Aktivierung der PKA die IP_3Rs phosphoryliert, wodurch IP_3 leichter an die IP_3Rs bindet, IRBIT von den Rezeptoren dissoziiert und die Ca^{2+} -Freisetzung durch die IP_3Rs erfolgen kann (270).

3.3.4 Regulation der Ca^{2+} -Freisetzung und von IRBIT durch PKC

Bisher wird die Regulation von Ionentransportern durch IRBIT als ein eigenständiger Signalweg angesehen und die Beteiligung der PKC innerhalb

dieser Signalkaskaden wird kaum beschrieben, obwohl schon früh gezeigt wurde, dass die während des IRBIT-Signalweges beteiligten IP₃-Rs durch die PKC phosphoryliert werden können (225, 369).

Cholinerge Stimulation bewirkt die Aktivierung G_q/G₁₁-gekoppelter M3 Rezeptoren in der Plasmamembran (50, 97). Die freigesetzte G_α-UE aktiviert die PLCβ, die PIP₂ zu DAG und IP₃ hydrolysiert (40, 388), woraufhin IP₃ durch die Bindung an die IP₃Rs des ER Ca²⁺ freisetzt (237).

Aber erst kürzlich wurde an HEK-Zellen festgestellt, dass eine PLC_ε-medierte DAG-Generation in der Plasmamembran des ER spezifisch die PKCα und PKCδ Isoformen aktiviert und eine PKC-mediated Phosphorylierung der IP₃Rs die Sensitivität von IP₃ zu den IP₃Rs des ER reguliert (161), was die Ca²⁺- und IRBIT-Freisetzung moduliert. Interessant ist dabei, dass durch Agonisten in der Plasmamembran der Zelle über freigesetzte G_{α_s}-Proteine membranständige ACs aktiviert werden können, wodurch lösliches cAMP generiert wird (161, 388). Das lösliche cAMP bindet an das exchange protein directly activated by cAMP (Epac) des endoplasmatischen Retikulums (125, 293), wodurch es aktiviert wird (279) und über Rap1, spezifisch die Aktivität der PLC_ε innerhalb der Membran des ER aktiviert (195, 259, 260). Carbachol aktiviert über mAChR M3 die PLCε (101). Im Gegensatz zu der Stimulation mit Forskolin würde Carbachol allerdings die PLCβ der Plasmamembran und die PLCε innerhalb der Membran des ER aktivieren. Damit erfolgt eine Kompartimentierung zwischen der DAG-Generation in der Plasmamembran der Zelle durch die Aktivierung der PLCβ und der Stimulation der PLCε des ER, was mit unterschiedlicher Intensität verschiedene PKC Isoformen stimulieren und insbesondere die Translokation von PKCδ an die Membran des ER und die PKCδ-vermittelte Phosphorylierung der IP₃Rs initiieren könnte (161).

PKCδ desensibilisiert die IP₃Rs für IP₃ und kann somit negativ die Ca²⁺-Freisetzung und Aktivierung von Ionentransportern durch IRBIT in HEK-Zellen

regulieren (161). Die biphasische stimulierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und den Mitochondrien, die vorerst sehr schnell und anschließend PKC-abhängig herunterreguliert wurde, konnte durch Inhibition der PKC verstärkt und Aktivierung der PKC inhibiert werden (241). Somit regulieren PKC Isoformen die Sensitivität der IP_3Rs für IP_3 und damit die IP_3R -medierte Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER und den Mitochondrien sowie die Freisetzung von IRBIT. IP_3Rs besitzen unterschiedliche PKA und PKC Phosphorylierungsstellen (367), weshalb die Freisetzung von IRBIT und dessen Modulation des NBCe1-B auch durch PKC-Isoformen reguliert wird.

Die Stimulation mit Carbachol könnte vorerst durch die $\text{PLC}\beta$ -vermittelte DAG- und IP_3 -Generation in der Plasmamembran und die folgende Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER eine schnelle PKC-abhängige Aktivierung des NBCe1-B u.a. Transporter verursachen. Allerdings könnte durch die simultane Stimulation des $\text{PLC}\epsilon$ -Signalweges des ER eine PKC-bedingte Phosphorylierung der IP_3Rs die Ca^{2+} -Freisetzung, Aktivität der PKC und die reduzierte Membranexpression von Transportern durch IRBIT auslösen. Hui et al. vermuten, dass konventionelle PKC Isoformen bei der $\text{PLC}\beta$ -Signalkaskade und insbesondere neue PKC Isoformen bei der Regulation des $\text{PLC}\epsilon/\text{IP}_3\text{R}$ -Signalweges beteiligt sind (161). Dies könnte erklären weshalb Carbachol, im Gegensatz zu Forskolin, die Funktionalität des NBCe1-B sowohl abhängig von konventionellen, als auch von neuen PKC Isoformen verändert (17) und insbesondere neue PKC Isoformen bei der Regulation der Transporterexpression beteiligt sind.

3.3.5 Regulation der Anionensekretion durch intrazellulärs Chlorid

Die Stimulation der HCO_3^- -Sekretion mit Forskolin und Carbachol unter Cl^- -freien Bedingungen zeigte, dass eine CFTR-medierte HCO_3^- -Sekretion innerhalb des murinen mittleren Kolon vorhanden ist, jedoch nur eine geringe durch Carbachol induzierte und CFTR-unabhängige HCO_3^- -Sekretion im distalen Kolon erfolgt (19). Als mögliche Ursache wird vermutet, dass die

Leitfähigkeit des CFTR-Kanals für HCO_3^- in Abwesenheit von Cl^- erhöht werden kann (19, 268, 322). Über die intrazelluläre Cl^- -Konzentration kann der WNK/SPAK-Signalweg reguliert werden, wodurch die CFTR-medierte HCO_3^- -Leitfähigkeit und -Sekretion aktiviert und der apikale $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ Austausch inhibiert werden kann (268). Eine Deaktivierung von WNK/SPAK führt zugleich zu einer erhöhten basolateralen NBCe1-B Membraninsertion und Aktivität (siehe 3.3.1), was durch den resultierenden verstärkten HCO_3^- -Import die CFTR-medierte HCO_3^- -Sekretion unterstützen würde. Neuere Untersuchungen zeigen zudem, dass die intrazelluläre Cl^- -Konzentration die Funktion des NBCe1-B, NBCe2-C und NBCe1-A zusätzlich steigern könnte (323). Der NBCe1-B wurde in HeLa-Zellen exprimiert und während des autoinhibitorischen Basalzustands nur geringfügig durch intrazelluläres Cl^- beeinflusst, wohingegen die Aktivität des durch IP_3 -Generation/IRBIT aktivierten NBCe1-B durch geringe intrazelluläre Cl^- -Konzentrationen zusätzlich gesteigert werden könnte (323). Dabei sind GXXXP-Motive innerhalb des N-Terminus der NBCe1-Isoformen für die Cl^- -Sensitivität verantwortlich, die auch bei CFTR, NKCC1 und vielen SLC26-Transportern vorhanden sind (323). Somit könnte zum Einen die Cl^- -Konzentration über WNK/SPAK die Leitfähigkeit des CFTR-Kanals für HCO_3^- erhöhen und die IRBIT-medierte Aktivität des NBCe1-B steigern und regulieren. Zum Anderen vermuten Shcheynikov et al., dass über die Cl^- -Sensitivität die Aktivität des IRBIT-regulierten NBCe1-B und des $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$ -Austausches synchronisiert werden könnte. Kürzlich publizierte Erkenntnisse in murinen Astrozyten zeigen, dass die Regulation der Transkription und Oberflächenexpression des NBCe1 ebenfalls durch die intrazelluläre Ionenkonzentration erfolgen kann (307).

Die Regulation von CFTR und des NBCe1-B durch intrazelluläres Cl^- und die PKC-abhängige Endozytose des NKCC1 könnte die nur kurzzeitig erhöhte Cl^- -Sekretion nach Stimulation mit Carbachol (404), die von einer verstärkten HCO_3^- -Sekretion gefolgt ist, erklären: Weil durch eine Carbachol-medierte

transiente Erhöhung der NKCC1 Aktivität der basolaterale Cl^- -Import steigt, erfolgt vorerst die CFTR-bedingte apikale Cl^- -Sekretion. Die schnell folgende PKC-abhängige Endozytose/Internalisierung des NKCC1 reduziert die intrazelluläre Verfügbarkeit von Cl^- . Parallel wird die NBCe1 Expression und -Aktivität durch Carbachol, den reduzierten NBCe1-B-inhibierenden WNK/SPAK-Signalweg und die geringere intrazelluläre Cl^- -Konzentration erhöht. Zudem wird die CFTR-Leitfähigkeit für HCO_3^- erhöht und dadurch verstärkt HCO_3^- apikal sezerniert.

Die Protein Kinase C beeinflusst neben der Regulation des NBCe1-B maßgeblich den Anionen- und Elektrolyttransport durch die Regulation und/oder die Interaktion beteiligter Transporter, was unter Anhang E, Anhang F und Anhang G beschrieben ist.

4 Fazit

Innerhalb des chronisch entzündeten proximalen Kolon von $\text{TNF}^{+/Δ\text{ARE}}$ Mäusen wurde eine erhöhte parazelluläre Durchlässigkeit des Kolonepitheliums festgestellt, was auf eine pathophysiologische Veränderung von Bestandteilen der Schlussleistenkomplexe und nicht auf einen dysregulierten Ionentransport zurück zu führen ist. Auf zellulärer Ebene zeigen die Ergebnisse eine Sekretagoga-induzierte, PKC-abhängige Modulation der Oberflächenexpression und Aktivität des murinen kolonischen NBCe1-B als wichtigen Regulationsmechanismus des basolateralen HCO_3^- -Transports und der apikalen HCO_3^- -Sekretion.

5 Therapeutische Anwendung

Die Regulation des elektrogenen NBC ist auch für die Aufrechterhaltung von extraintestinalen physiologischen Funktionen und die Signaltransduktion von essentieller Bedeutung. Deshalb werden nachfolgend einige Beispiele

aufgeführt, für die eine therapeutische Regulation der NBC Aktivität pathophysiologische Auswirkungen verringern könnte.

Hypertension

NBCe1-A mediiert ca. 80% der HCO_3^- -Reabsorption in der Niere und einen nicht unerheblichen Anteil der Na^+ -Reabsorption. Eine Reduktion der Na^+ Reabsorption der Niere reduziert das Volumen der extrazellulären Flüssigkeit, was den Blutdruck ebenfalls verringert (290). Eine moderate Inhibition des NBCe1-A könnte die Na^+ -Reabsorption soweit reduzieren, dass der Blutdruck verringert wird, wobei die ebenfalls geringere HCO_3^- -Reabsorption durch Protonenpumpen des distalen Nephrons kompensiert werden könnte, wodurch ein stabiler arterieller pH aufrechterhalten werden könnte.

Glaukom

Ein erhöhter Augeninnendruck ist einer der wichtigsten Risikofaktoren für ein Glaukom. Humane rezessive Mutationen des NBCe1 führen zu einer geringeren Proteinexpression und können ein bilaterales Glaukom verursachen (366), was mit einem erhöhten intraokkularen Druck assoziiert ist. Eine geringere Expression des NBCe1 in der Retina kann zudem die visuelle Funktion negativ beeinflussen (154). Eine therapeutische Aktivierung des NBCe1 im Auge könnte den Augeninnendruck senken und eine gestörte neuronale Signaltransduktion wiederherstellen.

Migräne

Es wurde eine mögliche Assoziation einer Basenpaardeletion auf dem C-Terminus des NBCe1 und Migräne beobachtet. Ein Verlust der NBCe1 Funktionalität in Astrozyten kann eine Dysregulation des synaptischen pH verursachen, wodurch Migräne entstehen kann (346). Der pathophysiologische Mechanismus von Migräne mit Aura könnte eine Hyperexzitabilität (des

zerebralen Cortex) darstellen (126). Neuronale Exzitation bewirkt eine Depolarisation von Gliazellen, die Säure sezernieren, woran der NBCe1 beteiligt ist (56). Normalerweise führt diese extrazelluläre Azidose zu einer geringeren Erregbarkeit benachbarter Neurone, da exzitatorische N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptoren durch Protonen blockiert werden (69). Es wird angenommen, dass eine defekte NBCe1 Expression zu einer NMDA-medierten, neuronalen Hyperaktivität führen kann, weil eine vollständige Depolarisation einer größeren Anzahl von Gehirnzellen erfolgt (320).

5.1 Ausblick

Innerhalb dieser Arbeit wurde auf zellulärer Ebene eine Forskolin- und Carbachol-induzierte erhöhte Phosphorylierung und Translokation konventioneller und neuer PKC Isoformen festgestellt. Die Agonist-induzierte Stimulation der PKCs reguliert wiederum die Aktivität und Oberflächenexpression des NBCe1-B und anderer basolateraler sowie apikaler Ionentransporter, die an der intestinalen Anionensekretion beteiligt sind. Dadurch haben die unterschiedlichen Isoformen der Protein Kinase C essentiellen regulatorischen Einfluss auf die intrazelluläre und luminale pH Homöostase und die Integrität der gastrointestinalen Epithelzellen.

Bei der PKC-abhängigen Regulation des NBCe1-B spielen die unterschiedlichen Mechanismen der PKC Phosphorylierung und Aktivierung eine entscheidende Rolle, weshalb die Regulation der PKC durch die mTOR Komplexe vermutlich essentiell ist. Obwohl für die initiale Aktivierung aller PKC Isoformen die PI3K als essentiell beschrieben worden ist und die Aktivierung des NBCe1-B PKC-abhängig erfolgt, fanden Yu et al heraus, dass eine PI3K-unabhängige gesteigerte NBCe1-B Oberflächenexpression durch Carbachol und Forskolin erfolgt und die Basalexpression des NBCe1-B durch den PI3K-Inhibitor LY294002 nur partiell verringert wurde (404).

Es existieren derzeit kaum Untersuchungen über den Einfluss der mTOR Komplexe auf die Regulation des Ionentransports im murinen Intestinaltrakt und ein Großteil der bisherigen Erkenntnisse über die mTOR Komplexe wurde anhand von Herzmuskelzellen gewonnen. Interessant wäre die Untersuchung der NBCe1-B Aktivität und Oberflächenexpression in Anwesenheit des mTORC1 Inhibitors Rapamycin und LY294002 in Kombination mit Inhibitoren konventioneller/neuer PKC Isoformen, um heraus zu finden welche PKC Isoformen mTORC1/2-abhängig die Aktivität und/oder die Expression des NBCe1-B in murinen Kolonkrypten regulieren. Die Verwendung des PKC β -spezifischen Inhibitors Enzastaurin könnte zeigen, ob durch die Inhibition der PKC β /III Isoformen die mTORC1-abhängige Phosphorylierung und Aktivierung neuer PKC Isoformen in murinen Kolonkrypten beeinflusst wird und ob das die NBCe1-B Aktivität und Expression verändert. Des Weiteren könnte unter Verwendung von mTOR/PKC- und PI3K-Inhibitoren in Ussing Kammer Experimenten dessen Einfluß auf die intestinale Anionen- und HCO₃⁻-Sekretion bestimmt werden.

Zudem könnten weitere Untersuchungen über die PKC-abhängige IRBIT-medierte Regulation des NBCe1-B klären, ob dieser Signalweg separat oder synchron zu der mTOR-abhängigen Aktivierung verschiedener PKC Isoformen verläuft.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aalkjaer C, Boedtkjer E, Choi I, Lee S.** Cation-coupled bicarbonate transporters. *Compr. Physiol.* 4: 1605–37, 2014.
2. **Abuladze N, Lee I, Newman D, Hwang J, Boorer K, Pushkin A, Kurtz I.** Molecular Cloning, Chromosomal Localization, Tissue Distribution, and Functional Expression of the Human Pancreatic Sodium Bicarbonate Cotransporter. *J. Biol. Chem.* 273: 17689–17695, 1998.
3. **Abuladze N, Song M, Pushkin A, Newman D, Lee I, Nicholas S, Kurtz I.** Structural organization of the human NBC1 gene: kNBC1 is transcribed from an alternative promoter in intron 3. *Gene* 251: 109–22, 2000.
4. **Agbor TA, Demma ZC, Mumy KL, Bien JD, McCormick BA.** The ERM protein, ezrin, regulates neutrophil transmigration by modulating the apical localization of MRP2 in response to the SipA effector protein during Salmonella Typhimurium infection. *Cell. Microbiol.* 13: 2007–21, 2011.
5. **Allen A, Flemström G.** Gastroduodenal mucus bicarbonate barrier: protection against acid and pepsin. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: 1–19, 2005.
6. **Alper SL, Rossmann H, Wilhelm S, Stuart-Tilley AK, Shmukler BE, Seidler U.** Expression of AE2 anion exchanger in mouse intestine. *Am. J. Physiol.* 277: G321–G332, 1999.
7. **Alpern RJ, Chambers M.** Basolateral Membrane Cl/HCO₃ Exchange in the Rat Proximal Convoluted Tubule. Na-dependent and -independent modes. *J. Gen. Physiol.* 89: 581–598, 1987.
8. **Alvarez B V, Loiselle FB, Supuran CT, Schwartz GJ, Casey JR.** Direct extracellular interaction between carbonic anhydrase IV and the human NBC1 sodium/bicarbonate co-transporter. *Biochemistry* 42: 12321–12329, 2003.
9. **Alvarez B V, Vilas GL, Casey JR.** Metabolon disruption: a mechanism that regulates bicarbonate transport. *EMBO J.* 24: 2499–511, 2005.
10. **Alzamora R, King JD, Hallows KR.** CFTR regulation by phosphorylation. *Methods Mol. Biol.* 741: 471–88, 2011.
11. **Ananthanarayanan B, Stahelin R V, Digman MA, Cho W.** Activation mechanisms of conventional protein kinase C isoforms are determined by the ligand affinity and conformational flexibility of their C1 domains. *J. Biol. Chem.* 278: 46886–94, 2003.
12. **Ando H, Mizutani A, Kiefer H, Tsuzurugi D, Michikawa T, Mikoshiba K.** IRBIT suppresses IP₃ receptor activity by competing with IP₃ for the common binding site on the IP₃ receptor. *Mol. Cell* 22: 795–806, 2006.
13. **Ando H, Mizutani A, Matsu-ura T, Mikoshiba K.** IRBIT, a novel inositol 1,4,5-trisphosphate (IP₃) receptor-binding protein, is released from the IP₃ receptor upon IP₃ binding to the receptor. *J. Biol. Chem.* 278: 10602–12, 2003.
14. **Auerbach M, Liedtke CM.** Role of the scaffold protein RACK1 in apical expression of CFTR. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 293: C294–304, 2007.

15. **Bachmann O, Heinzmann A, Mack A, Manns MP, Seidler U.** Mechanisms of secretion-associated shrinkage and volume recovery in cultured rabbit parietal cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 292: G711–G717, 2007.
16. **Bachmann O, Juric M, Seidler U, Manns MP, Yu H.** Basolateral ion transporters involved in colonic epithelial electrolyte absorption, anion secretion and cellular homeostasis. *Acta Physiol. (Oxf).* 201: 33–46, 2011.
17. **Bachmann O, Reichelt D, Tuo B, Manns M, Seidler U.** Carbachol increases Na⁺-HCO₃⁻-cotransport activity in murine colonic crypts in a M3-, Ca²⁺/calmodulin-, and PKC-dependent manner. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291: G650–G657, 2006.
18. **Bachmann O, Rossmann H, Berger U V, Colledge WH, Ratcliff R, Evans MJ, Gregor M, Seidler U.** cAMP-mediated regulation of murine intestinal/pancreatic Na⁺/HCO₃⁻-cotransporter subtype pNBC1. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 284: G37–45, 2003.
19. **Bachmann O, Seidler U.** News from the End of the Gut—How the Highly Segmental Pattern of Colonic HCO₃⁻ Transport Relates to Absorptive Function and Mucosal Integrity. *Biol. Pharm. Bull.* 34: 794–802, 2011.
20. **Bachmann O, Wüchner K, Rossmann H, Leipziger J, Osikowska B, Colledge W, Ratcliff R, Evans M, Gregor M, Seidler U.** Expression and regulation of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻-cotransporter NKCC1 in the normal and CFTR-deficient murine colon. *J. Physiol.* 549: 525–536, 2003.
21. **Bae YS, Cantley LG, Chen CS, Kim SR, Kwon KS, Rhee SG.** Activation of phospholipase C- γ by phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate. *J. Biol. Chem.* 273: 4465–9, 1998.
22. **Bailly C.** Transducing pathways involved in the control of NaCl reabsorption in the thick ascending limb of Henle's loop. *Kidney Int. Suppl.* 65: S29–35, 1998.
23. **Bajnath RB, van Hove MH, de Jonge HR, Groot JA.** Regulation of apical Cl⁻ conductance and basolateral K⁺ conductances by phorbol esters in HT-29cl.19A cells. *Am. J. Physiol.* 263: C759–66, 1992.
24. **Balendran A, Hare GR, Kieloch A, Williams MR, Alessi DR.** Further evidence that 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1 (PDK1) is required for the stability and phosphorylation of protein kinase C (PKC) isoforms. *FEBS Lett.* 484: 217–223, 2000.
25. **Bargon J, Trapnell BC, Yoshimura K, Dalemans W, Pavirani A, Lecocq JP, Crystal RG.** Expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene can be regulated by protein kinase C. *J. Biol. Chem.* 267: 16056–60, 1992.
26. **Barmeyer C, Harren M.** Mechanisms of diarrhea in the interleukin-2-deficient mouse model of colonic inflammation. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 286: G244–G252, 2004.
27. **Barmeyer C, Ye JH, Sidani S, Geibel J, Binder HJ, Rajendran VM.** Characteristics of rat downregulated in adenoma (rDRA) expressed in HEK 293 cells. *Pflugers Arch.* 454: 441–50, 2007.
28. **Barmeyer C, Ye JH, Soroka C, Geibel P, Hingsammer LM, Weitgasser L, Atway D, Geibel JP, Binder HJ, Rajendran VM.** Identification of functionally distinct Na-HCO₃ co-transporters in colon. *PLoS One* 8: e62864, 2013.

29. **Barragán M, de Frias M, Iglesias-Serret D, Campàs C, Castaño E, Santidrián AF, Coll-Mulet L, Cosialls AM, Domingo A, Pons G, Gil J.** Regulation of Akt/PKB by phosphatidylinositol 3-kinase-dependent and -independent pathways in B-cell chronic lymphocytic leukemia cells: role of protein kinase C β . *J. Leukoc. Biol.* 80: 1473–1479, 2006.
30. **Barrett KE, Keely SJ.** Chloride secretion by the intestinal epithelium: molecular basis and regulatory aspects. *Annu. Rev. Physiol.* 62: 535–572, 2000.
31. **Basso PJ, Fonseca MTC, Bonfá G, Alves VBF, Sales-Campos H, Nardini V, Cardoso CRB.** Association among genetic predisposition, gut microbiota, and host immune response in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 47: 727–737, 2014.
32. **Basu A, Sridharan S, Persaud S.** Regulation of protein kinase C delta downregulation by protein kinase C epsilon and mammalian target of rapamycin complex 2. *Cell. Signal.* 21: 1680–5, 2009.
33. **Bayascas JR.** PDK1: The Major Transducer of PI 3-Kinase Actions. In: *Phosphoinositide 3-kinase in Health and Disease*, edited by Rommel C, Vanhaesebroeck B, Vogt PK. Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 2010, p. 10–22.
34. **Becker HM, Deitmer JW.** Carbonic anhydrase II increases the activity of the human electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *J. Biol. Chem.* 282: 13508–13521, 2007.
35. **Becker KP, Hannun YA.** cPKC-dependent Sequestration of Membrane-recycling Components in a Subset of Recycling Endosomes. *J. Biol. Chem.* 278: 52747–52754, 2003.
36. **Becker KP, Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Bielawski J, Hannun YA.** Selective inhibition of juxtannuclear translocation of protein kinase C betaII by a negative feedback mechanism involving ceramide formed from the salvage pathway. *J. Biol. Chem.* 280: 2606–2612, 2005.
37. **Behn-Krappa A, Newton AC.** The hydrophobic phosphorylation motif of conventional protein kinase C is regulated by autophosphorylation. *Curr. Biol.* 9: 728–37, 1999.
38. **Di Benedetto G, Scalzotto E, Mongillo M, Pozzan T.** Mitochondrial Ca²⁺ uptake induces cyclic AMP generation in the matrix and modulates organelle ATP levels. *Cell Metab.* 17: 869–886, 2013.
39. **Van den Berghe N, Vaandrager AB, Bot AG, Parker PJ, de Jonge HR.** Dual role for protein kinase C alpha as a regulator of ion secretion in the HT29cl.19A human colonic cell line. *Biochem. J.* 285: 673–9, 1992.
40. **Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD.** The versatility and universality of calcium signalling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 1: 11–21, 2000.
41. **Bevensee MO, Schmitt BM, Choi I, Romero MF, Boron WF.** An electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (NBC) with a novel COOH-terminus, cloned from rat brain. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 278: C1200–C1211, 2000.
42. **Binder HJ, Foster ES, Budinger ME, Hayslett JP.** Mechanism of electroneutral sodium chloride absorption in distal colon of the rat. *Gastroenterology* 93: 449–55, 1987.

43. **Binder HJ, Sandle GI.** Electrolyte absorption and secretion in the mammalian colon. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by Johnson LR. New York: Raven, 1987, p. 1389–1418.
44. **Bleich M, Warth R.** The very small-conductance K⁺ channel KvLQT1 and epithelial function. *Pflugers Arch.* 440: 202–6, 2000.
45. **Boll M, Foltz M, Rubio-Aliaga I, Kottra G, Daniel H.** Functional characterization of two novel mammalian electrogenic proton-dependent amino acid cotransporters. *J. Biol. Chem.* 277: 22966–73, 2002.
46. **Borenshtein D, Schlieper KA, Rickman BH, Chapman JM, Schweinfest CW, Fox JG, Schauer DB.** Decreased Expression of Colonic Slc26a3 and Carbonic Anhydrase IV as a Cause of Fatal Infectious Diarrhea in Mice. *Infect. Immun.* 77: 3639–3650, 2009.
47. **Boron WF, Boulpaep EL.** Intracellular pH Regulation in the Renal Proximal Tubule of the Salamander. *J. Gen. Physiol.* 81: 53–94, 1983.
48. **Boron WF, Chen L, Parker MD.** Modular structure of sodium-coupled bicarbonate transporters. *J. Exp. Biol.* 212: 1697–1706, 2009.
49. **Boron WF.** Sodium-Coupled Bicarbonate Transporters. *JOP J. Pancreas* 2: 1481–1497, 2001.
50. **Boschero AC, Szpak-Glasman M, Carneiro EM, Bordin S, Paul I, Rojas E, Atwater I.** Oxotremorine-m potentiation of glucose-induced insulin release from rat islets involves M3 muscarinic receptors. *Am. J. Physiol.* 268: E336–42, 1995.
51. **Boulay G, Chrétien L, Richard DE, Guillemette G.** Short-term desensitization of the angiotensin II receptor of bovine adrenal glomerulosa cells corresponds to a shift from a high to a low affinity state. *Endocrinology* 135: 2130–6, 1994.
52. **Bourbon NA, Yun J, Kester M.** Ceramide Directly Activates Protein Kinase C ζ to Regulate a Stress-activated Protein Kinase Signaling Complex. *J. Biol. Chem.* 275: 35617–35623, 2000.
53. **Broere N, Chen M, Cinar A, Singh AK, Hillesheim J, Riederer B, Lünemann M, Rottinghaus I, Krabbenhöft A, Engelhardt R, Rausch B, Weinman EJ, Donowitz M, Hubbard A, Kocher O, de Jonge HR, Hogema BM, Seidler U.** Defective jejunal and colonic salt absorption and altered Na⁺/H⁺ exchanger 3 (NHE3) activity in NHE regulatory factor 1 (NHERF1) adaptor protein-deficient mice. *Pflugers Arch.* 457: 1079–91, 2009.
54. **Brose N, Rosenmund C.** Move over protein kinase C, you've got company: alternative cellular effectors of diacylglycerol and phorbol esters. *J. Cell Sci.* 115: 4399–4411, 2002.
55. **Broughman JR, Sun L, Umar S, Scott J, Sellin JH, Morris AP.** Chronic PKC-beta activation in HT-29 Cl.19a colonocytes prevents cAMP-mediated ion secretion by inhibiting apical membrane current generation. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 291: G318–30, 2006.
56. **Brune T, Fetzer S, Backus KH, Deitmer JW.** Evidence for electrogenic sodium-bicarbonate cotransport in cultured rat cerebellar astrocytes. *Pflügers Arch.* 429: 64–71, 1994.
57. **Canessa CM, Schild L, Buell G, Thorens B, Gautschi I, Horisberger JD, Rossier BC.** Amiloride-sensitive epithelial Na⁺ channel is made of three homologous subunits. *Nature* 367: 463–467, 1994.

58. **Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez H a, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, Fingar DC, Roux PP.** ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J. Biol. Chem.* 286: 567–77, 2011.
59. **Del Castillo IC, Fedor-Chaikin M, Song JC, Starlinger V, Yoo J, Matlin KS, Matthews JB.** Dynamic regulation of Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter surface expression by PKC-ε in Cl⁻-secretory epithelia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289: C1332–C1342, 2005.
60. **Cenni V, Döppler H, Sonnenburg ED, Maraldi N, Newton AC, Toker A.** Regulation of novel protein kinase C ε by phosphorylation. *Biochem. J.* 363: 537–545, 2002.
61. **Cerra MC, Imbrogno S.** Phospholamban and cardiac function: a comparative perspective in vertebrates. *Acta Physiol. (Oxf).* 205: 9–25, 2012.
62. **Chan TO, Rittenhouse SE, Tschlis PN.** AKT/PKB and other D3 phosphoinositide-regulated kinases: kinase activation by phosphoinositide-dependent phosphorylation. *Annu. Rev. Biochem.* 68: 965–1014, 1999.
63. **Chappe V, Hinkson DA, Howell LD, Evagelidis A, Liao J, Chang X-B, Riordan JR, Hanrahan JW.** Stimulatory and inhibitory protein kinase C consensus sequences regulate the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101: 390–5, 2004.
64. **Chappe V, Hinkson DA, Zhu T, Chang X-B, Riordan JR, Hanrahan JW.** Phosphorylation of protein kinase C sites in NBD1 and the R domain control CFTR channel activation by PKA. *J. Physiol.* 548: 39–52, 2003.
65. **Charney AN, Feldman GM.** Systemic acid-base disorders and intestinal electrolyte transport. *Am. J. Physiol.* 247: G1–12, 1984.
66. **Charoenphandhu N, Laohapitakworn S, Kraidith K, Nakkrasae L-I, Jongwattanapisan P, Tharabenjasin P, Krishnamra N.** Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ co-transporter-1 is essential for the parathyroid hormone-stimulated intestinal HCO₃⁻ secretion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 409: 775–9, 2011.
67. **Chen M, Praetorius J, Zheng W, Xiao F, Riederer B, Singh AK, Stieger N, Wang J, Shull GE, Aalkjaer C, Seidler U.** The electroneutral Na⁺: HCO₃⁻ cotransporter NBCn1 is a major pH_i regulator in murine duodenum. *J. Physiol.* 590: 3317–3333, 2012.
68. **Chen T, Kocinsky HS, Cha B, Murtazina R, Yang J, Tse CM, Singh V, Cole R, Aronson PS, de Jonge H, Sarker R, Donowitz M.** Cyclic GMP kinase II (cGKII) inhibits NHE3 by altering its trafficking and phosphorylating NHE3 at three required sites: identification of a multifunctional phosphorylation site. *J. Biol. Chem.* 290: 1952–65, 2015.
69. **Chesler M.** Regulation and modulation of pH in the brain. *Physiol. Rev.* 83: 1183–221, 2003.
70. **Chiu T, Rozengurt E.** PKD in intestinal epithelial cells: rapid activation by phorbol esters, LPA, and angiotensin through PKC. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 280: C929–42, 2001.
71. **Cho W.** Membrane Targeting by C1 and C2 Domains. *J. Biol. Chem.* 276: 32407–32410, 2001.

72. **Chou MM, Hou W, Johnson J, Graham LK, Lee MH, Chen CS, Newton AC, Schaffhausen BS, Toker A.** Regulation of protein kinase C zeta by PI 3-kinase and PDK-1. *Curr. Biol.* 8: 1069–77, 1998.
73. **Chung J, Grammer TC, Lemon KP, Kazlauskas A, Blenis J.** PDGF- and insulin-dependent pp70S6k activation mediated by phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature* 370: 71–5, 1994.
74. **Chung J, Kuo CJ, Crabtree GR, Blenis J.** Rapamycin-FKBP specifically blocks growth-dependent activation of and signaling by the 70 kd S6 protein kinases. *Cell* 69: 1227–1236, 1992.
75. **Clarke LL, Grubb BR, Gabriel SE, Smithies O, Koller BH, Boucher RC.** Defective epithelial chloride transport in a gene-targeted mouse model of cystic fibrosis. *Science* (80-). 257: 1125–1128, 1992.
76. **Clarke LL, Harline MC.** CFTR is required for cAMP inhibition of intestinal Na⁺ absorption in a cystic fibrosis mouse model. *Am. J. Physiol.* 270: G259–G267, 1996.
77. **Clarke LL, Stien X, Walker NM.** Intestinal bicarbonate secretion in cystic fibrosis mice. *JOP* 2: 263–267, 2001.
78. **Clarke LL.** A guide to Ussing chamber studies of mouse intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296: G1151–66, 2009.
79. **Codina J, Pressley TA, DuBose TD.** The colonic H⁺, K⁺-ATPase functions as a Na⁺-dependent K⁺ (NH₄⁺)-ATPase in apical membranes from rat distal colon. *J. Biol. Chem.* 274: 19693–19698, 1999.
80. **Cohen ME, Wesolek J, McCullen J, Rys-Sikora K, Pandol S, Rood RP, Sharp GW, Donowitz M.** Carbachol- and elevated Ca(2+)-induced translocation of functionally active protein kinase C to the brush border of rabbit ileal Na⁺ absorbing cells. *J. Clin. Invest.* 88: 855–63, 1991.
81. **Cosentino C, Di Domenico M, Porcellini A, Cuzzo C, De Gregorio G, Santillo MR, Agnese S, Di Stasio R, Feliciello A, Migliaccio A, Avvedimento E V.** p85 regulatory subunit of PI3K mediates cAMP-PKA and estrogens biological effects on growth and survival. *Oncogene* 26: 2095–103, 2007.
82. **Crawford I, Maloney P, Zeitlin P, Guggino W, Hyde S, Turley H, Gatter K, Harris A, Higgins C.** Immunocytochemical localization of the cystic fibrosis gene product CFTR. *PNAS* 88: 9262–9266, 1991.
83. **Currie RA, Walker KS, Gray A, Deak M, Casamayor A, Downes CP, Cohen P, Alessi DR, Lucocq J.** Role of phosphatidylinositol 3, 4, 5-trisphosphate in regulating the activity and localization of 3-phosphoinositide-dependent protein kinase-1. *Biochem. J.* 337: 575–583, 1999.
84. **Dagher PC, Egnor RW, Charney AN.** Effect of intracellular acidification on colonic NaCl absorption. *Am. J. Physiol.* 264: G569–75, 1993.
85. **Dagher PC, Rho JI, Charney AN.** Mechanism of bicarbonate secretion in rat (*Rattus rattus*) colon. *Comp. Biochem. Physiol. Comp. Physiol.* 105: 43–8, 1993.

86. **Damkier HH, Nielsen S, Praetorius J.** Molecular expression of SLC4-derived Na⁺-dependent anion transporters in selected human tissues. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 293: R2136–46, 2007.
87. **Davenport SE, Mergey M, Cherqui G, Boucher RC, Gespach C, Gabriel SE.** Deregulated expression and function of CFTR and Cl⁻ secretion after activation of the Ras and Src/PyMT pathways in Caco-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 229: 663–72, 1996.
88. **Debonnie JC, Phillips SF.** Capacity of the human colon to absorb fluid. *Gastroenterology* 74: 698–703, 1978.
89. **Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO.** Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 279: L429–38, 2000.
90. **Denizot J, Sivignon A, Barreau F, Darcha C, Chan CHF, Stanners CP, Hofman P, Darfeuille-Michaud A, Barnich N.** Adherent-Invasive Escherichia coli Induce Claudin-2 Expression and Barrier Defect in CEABAC10 Mice and Crohn's Disease Patients. *Inflamm. Bowel Dis.* 18: 294–304, 2012.
91. **Diener M.** Segmental differences along the crypt axis in the response of cell volume to secretagogues or hypotonic medium in the rat colon. *Pflügers Arch.* 426: 462–464, 1994.
92. **Donowitz M, Cheng HY, Sharp GW.** Effects of phorbol esters on sodium and chloride transport in rat colon. *Am. J. Physiol.* 251: G509–17, 1986.
93. **Donowitz M, Cohen ME, Gould M, Sharp GWG.** Elevated Intracellular Ca²⁺ Acts through Protein Kinase C to Regulate Rabbit Ileal NaCl Absorption. *J. Clin. Invest.* 83: 1953–1962, 1989.
94. **Donowitz M, Singh S, Singh P, Salahuddin FF, Chen Y, Chakraborty M, Murtazina R, Gucek M, Cole RN, Zachos NC, Kovbasnjuk O, Broere N, Smalley-Freed WG, Reynolds AB, Hubbard AL, Seidler U, Weinman E, de Jonge HR, Hogema BM, Li X.** Alterations in the proteome of the NHERF1 knockout mouse jejunal brush border membrane vesicles. *Physiol. Genomics* 42A: 200–10, 2010.
95. **Dries DR, Gallegos LL, Newton AC.** A single residue in the C1 domain sensitizes novel protein kinase C isoforms to cellular diacylglycerol production. *J. Biol. Chem.* 282: 826–30, 2007.
96. **Dutil EM, Toker A, Newton a C.** Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr. Biol.* 8: 1366–75, 1998.
97. **Duttaroy A, Zimlik CL, Gautam D, Cui Y, Mears D, Wess J.** Muscarinic stimulation of pancreatic insulin and glucagon release is abolished in m3 muscarinic acetylcholine receptor-deficient mice. *Diabetes* 53: 1714–20, 2004.
98. **Edelstein J, Hao T, Cao Q, Morales L, Rockwell P.** Crosstalk between VEGFR2 and muscarinic receptors regulates the mTOR pathway in serum starved SK-N-SH human neuroblastoma cells. *Cell. Signal.* 23: 239–248, 2011.
99. **Elias BC, Suzuki T, Seth A, Giorgianni F, Kale G, Shen L, Turner JR, Naren A, Desiderio DM, Rao R.** Phosphorylation of Tyr-398 and Tyr-402 in occludin prevents its interaction with ZO-1 and destabilizes its assembly at the tight junctions. *J. Biol. Chem.* 284: 1559–1569, 2009.

100. **El-Osta MA, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA.** Delayed phosphorylation of classical protein kinase C (PKC) substrates requires PKC internalization and formation of the pericentron in a phospholipase D (PLD)-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 286: 19340–53, 2011.
101. **Evellin S, Nolte J, Tysack K, vom Dorp F, Thiel M, Weernink PAO, Jakobs KH, Webb EJ, Lomasney JW, Schmidt M.** Stimulation of phospholipase C-epsilon by the M3 muscarinic acetylcholine receptor mediated by cyclic AMP and the GTPase Rap2B. *J. Biol. Chem.* 277: 16805–13, 2002.
102. **Facchinetti V, Ouyang W, Wei H, Soto N, Lazorchak A, Gould C, Lowry C, Newton AC, Mao Y, Miao RQ, Sessa WC, Qin J, Zhang P, Su B, Jacinto E.** The mammalian target of rapamycin complex 2 controls folding and stability of Akt and protein kinase C. *EMBO J.* 27: 1932–43, 2008.
103. **Falasca M, Logan SK, Lehto VP, Baccante G, Lemmon MA, Schlessinger J.** Activation of phospholipase C gamma by PI 3-kinase-induced PH domain-mediated membrane targeting. *EMBO J.* 17: 414–22, 1998.
104. **Fan S, Schultz M, Butt G.** Inflammation reduces the activity of the NaHCO₃ cotransporter, NBCe1, in the surface cells of the proximal colon of IL10 knockout mice. *FASEB J.* 28, 2014.
105. **Farokhzad OC, Sagar GD, Mun EC, Sicklick JK, Lotz M, Smith JA, Song JC, O'Brien TC, Sharma CP, Kinane TB, Hodin RA, Matthews JB.** Protein kinase C activation downregulates the expression and function of the basolateral Na⁺/K⁺/2Cl⁻ cotransporter. *J. Cell. Physiol.* 181: 489–98, 1999.
106. **Feil W, Klimesch S, Karner P, Wenzl E, Starlinger M, Lacy ER, Schiessel R.** Importance of an alkaline microenvironment for rapid restitution of the rabbit duodenal mucosa in vitro. *Gastroenterology* 97: 112–22, 1989.
107. **Field FJ, Chen H, Born E, Dixon B, Mathur S.** Release of ceramide after membrane sphingomyelin hydrolysis decreases the basolateral secretion of triacylglycerol and apolipoprotein B in cultured human intestinal cells. *J. Clin. Invest.* 92: 2609–2619, 1993.
108. **Field M.** Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. *J. Clin. Invest.* 111: 931–43, 2003.
109. **Flagella M, Clarke LL, Miller ML, Erway LC, Giannella RA, Andringa A, Gawenis LR, Kramer J, J DJ, Doetschman T, Lorenz JN, Yamoah EN, Cardell E Lou, Shull GE.** Mice lacking the basolateral Na-K-2Cl cotransporter have impaired epithelial chloride secretion and are profoundly deaf. *J. Biol. Chem.* 274: 26946–26955, 1999.
110. **Fleming RE, Parkkila S, Parkkila AK, Rajaniemi H, Waheed A, Sly WS.** Carbonic anhydrase IV expression in rat and human gastrointestinal tract regional, cellular, and subcellular localization. *J. Clin. Invest.* 96: 2907–13, 1995.
111. **Fonseca BD, Lee VH-Y, Proud CG.** The binding of PRAS40 to 14-3-3 proteins is not required for activation of mTORC1 signalling by phorbol esters/ERK. *Biochem. J.* 411: 141–9, 2008.
112. **Fornés A, Núñez E, Alonso-Torres P, Aragon C, Lopez-Corcuera B.** Trafficking properties and activity regulation of the neuronal glycine transporter GLYT2 by protein kinase C. *Biochem. J.* 412: 495–506, 2008.

113. **Frank DN, Robertson CE, Hamm CM, Kpadeh Z, Zhang T, Chen H, Zhu W, Sartor RB, Boedeker EC, Harpaz N, Pace NR, Li E.** Disease phenotype and genotype are associated with shifts in intestinal-associated microbiota in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 17: 179–184, 2011.
114. **Frödin M, Antal TL, Dümmler BA, Jensen CJ, Deak M, Gammeltoft S, Biondi RM.** A phosphoserine/threonine-binding pocket in AGC kinases and PDK1 mediates activation by hydrophobic motif phosphorylation. *EMBO J.* 21: 5396–5407, 2002.
115. **Furuse M, Hirase T, Itoh M, Nagafuchi A, Yonemura S, Tsukita S.** Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J. Cell Biol.* 123: 1777–88, 1993.
116. **Gao Y, Zou J, Geng S, Zheng J, Yang J.** Role of protein kinase C in the activation of store-operated Ca(2+) entry in airway smooth muscle cells. *J. Huazhong Univ. Sci. Technolog. Med. Sci.* 32: 303–10, 2012.
117. **Garcia MAS, Yang N, Quinton PM.** Normal mouse intestinal mucus release requires cystic fibrosis transmembrane regulator-dependent bicarbonate secretion. *J. Clin. Invest.* 119: 2613–2622, 2009.
118. **Gawenis LR, Bradford EM, Alper SL, Prasad V, Shull GE.** AE2 Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger is required for normal cAMP-stimulated anion secretion in murine proximal colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 298: G493–503, 2010.
119. **Gawenis LR, Bradford EM, Prasad V, Lorenz JN, Simpson JE, Clarke LL, Woo AL, Grisham C, Sanford LP, Doetschman T, Miller ML, Shull GE.** Colonic anion secretory defects and metabolic acidosis in mice lacking the NBC1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter. *J. Biol. Chem.* 282: 9042–52, 2007.
120. **Geibel JP.** Secretion and absorption by colonic crypts. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 471–490, 2005.
121. **Genz AK, v Engelhardt W, Busche R.** Maintenance and regulation of the pH microclimate at the luminal surface of the distal colon of guinea-pig. *J. Physiol.* 517 (Pt 2): 507–19, 1999.
122. **Gill RK, Saksena S, Tyagi S, Alrefai W a., Malakooti J, Sarwar Z, Turner JR, Ramaswamy K, Dudeja PK.** Serotonin Inhibits Na⁺/H⁺ exchange Activity via 5-HT₄ Receptors and Activation of PKC α in Human Intestinal Epithelial Cells. *Gastroenterology* 128: 962–974, 2005.
123. **Giorgione JR, Lin J-H, McCammon JA, Newton AC.** Increased membrane affinity of the C1 domain of protein kinase Cdelta compensates for the lack of involvement of its C2 domain in membrane recruitment. *J. Biol. Chem.* 50: 1660–9, 2006.
124. **Gitter AH, Bendfeldt K, Schulzke JD, Fromm M.** Trans/paracellular, surface/crypt, and epithelial/subepithelial resistances of mammalian colonic epithelia. *Pflügers Arch.* 439: 477–482, 2000.
125. **Gloerich M, Bos JL.** Epac: defining a new mechanism for cAMP action. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 50: 355–75, 2010.
126. **Goadsby PJ.** Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends Mol. Med.* 13: 39–44, 2007.

127. **Goldfarb DS, Egnor RW, Charney AN.** Effects of acid-base variables on ion transport in rat colon. *J. Clin. Invest.* 81: 1903–10, 1988.
128. **Goldfarb DS, Sly WS, Waheed A, Charney AN.** Acid-base effects on electrolyte transport in CA II-deficient mouse colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278: G409–15, 2000.
129. **Golin-Bisello F, Bradbury N, Ameen N.** STa and cGMP stimulate CFTR translocation to the surface of villus enterocytes in rat jejunum and is regulated by protein kinase G. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 289: C708–16, 2005.
130. **Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ.** Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-kinase through the protein kinase PDK1. *Science* 281: 2042–5, 1998.
131. **Goswami P, Das P, Verma AK, Prakash S, Das TK, Nag TC, Ahuja V, Gupta SD, Makharia GK.** Are alterations of tight junctions at molecular and ultrastructural level different in duodenal biopsies of patients with celiac disease and Crohn's disease? *Virchows Arch.* 465: 521–30, 2014.
132. **Greger R, Bleich M, Leipziger J, Ecke D, Mall M, Kunzelmann K.** Regulation of ion transport in colonic crypts. *Physiology* 12: 62–66, 1997.
133. **Greig ER, Boot-Handford RP, Mani V, Sandle GI.** Decreased expression of apical Na⁺ channels and basolateral Na⁺, K⁺-ATPase in ulcerative colitis. *J. Pathol.* 204: 84–92, 2004.
134. **Grichtchenko II, Choi I, Zhong X, Bray-Ward P, Russell JM, Boron WF.** Cloning, characterization, and chromosomal mapping of a human electroneutral Na⁺-driven Cl-HCO₃ exchanger. *J. Biol. Chem.* 276: 8358–8363, 2001.
135. **Gross E, Fedotoff O, Pushkin A, Abuladze N, Newman D, Kurtz I.** Phosphorylation-induced modulation of pNBC1 function: distinct roles for the amino- and carboxy-termini. *J. Physiol.* 549: 673–682, 2003.
136. **Gross E, Hawkins K, Abuladze N, Pushkin A, Cotton CU, Hopfer U, Kurtz I.** The stoichiometry of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter NBC1 is cell-type dependent. *J. Physiol.* 531: 597–603, 2001.
137. **Gross E, Hawkins K, Pushkin A, Sassani P, Dukkipati R, Abuladze N, Hopfer U, Kurtz I.** Phosphorylation of Ser(982) in the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 shifts the HCO₃(-) : Na(+) stoichiometry from 3 : 1 to 2 : 1 in murine proximal tubule cells. *J. Physiol.* 537: 659–665, 2001.
138. **Gross E, Kurtz I.** Structural determinants and significance of regulation of electrogenic Na(+) - HCO₃(-) cotransporter stoichiometry. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 283: F876–87, 2002.
139. **Gross E, Pushkin A, Abuladze N, Fedotoff O, Kurtz I.** Regulation of the sodium bicarbonate cotransporter kNBC1 function: role of Asp986, Asp988 and kNBC1-carbonic anhydrase II binding. *J. Physiol.* 544: 679–685, 2002.
140. **Grubb B, Lee E, Pace A, Koller B, Boucher R.** Intestinal ion transport in NKCC1-deficient mice. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 279: G707–G718, 2000.

141. **Gysin S, Imber R.** Replacement of Ser657 of protein kinase C- α by alanine leads to premature down regulation after phorbol-ester-induced translocation to the membrane. *Eur. J. Biochem.* 240: 747–750, 1996.
142. **Gysin S, Imber R.** Phorbol-ester-activated protein kinase C- α lacking phosphorylation at Ser657 is down-regulated by a mechanism involving dephosphorylation. *Eur. J. Biochem.* 249: 156–60, 1997.
143. **Vander Haar E, Lee S-I, Bandhakavi S, Griffin TJ, Kim D-H.** Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9: 316–23, 2007.
144. **Halls ML, Cooper DMF.** Regulation by Ca²⁺-signaling pathways of adenylyl cyclases. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: a004143, 2011.
145. **Hansra G, Garcia-Paramio P, Prevostel C, Whelan RD, Bornancin F, Parker PJ.** Multisite dephosphorylation and desensitization of conventional protein kinase C isotypes. *Biochem. J.* 342 (Pt 2: 337–44, 1999.
146. **Hara K, Maruki Y, Long X, Yoshino K, Oshiro N, Hidayat S, Tokunaga C, Avruch J, Yonezawa K.** Raptor, a binding partner of target of rapamycin (TOR), mediates TOR action. *Cell* 110: 177–89, 2002.
147. **Hartwig JH, Thelen M, Rosen A, Janmey PA, Nairn AC, Aderem A.** MARCKS is an actin filament crosslinking protein regulated by protein kinase C and calcium-calmodulin. *Nature* 356: 618–22, 1992.
148. **Hasselblatt P, Warth R, Schulz-Baldes A, Greger R, Bleich M.** pH regulation in isolated in vitro perfused rat colonic crypts. *Pflugers Arch.* 441: 118–24, 2000.
149. **Hauge C, Antal TL, Hirschberg D, Doehn U, Thorup K, Idrissova L, Hansen K, Jensen ON, Jorgensen TJ, Biondi RM, Frödin M.** Mechanism for activation of the growth factor-activated AGC kinases by turn motif phosphorylation. *EMBO J.* 26: 2251–2261, 2007.
150. **He P, Zhang H, Yun CC.** IRBIT, inositol 1,4,5-triphosphate (IP₃) receptor-binding protein released with IP₃, binds Na⁺/H⁺ exchanger NHE3 and activates NHE3 activity in response to calcium. *J. Biol. Chem.* 283: 33544–33553, 2008.
151. **Hegyí P, Rakonczay Z, Tizslavicz L, Varró A, Tóth A, Rácz G, Varga G, Gray MA, Argent BE.** Protein kinase C mediates the inhibitory effect of substance P on HCO₃⁻ secretion from guinea pig pancreatic ducts. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: C1030–41, 2005.
152. **Herbert TP, Kilhams GR, Batty IH, Proud CG.** Distinct signalling pathways mediate insulin and phorbol ester-stimulated eukaryotic initiation factor 4F assembly and protein synthesis in HEK 293 cells. *J. Biol. Chem.* 275: 11249–56, 2000.
153. **Hilfiker S, Pieribone VA, Nordstedt C, Greengard P, Czernik AJ.** Regulation of synaptotagmin I phosphorylation by multiple protein kinases. *J. Neurochem.* 73: 921–32, 1999.
154. **Hilgen G, Huebner AK, Tanimoto N, Sothilingam V, Seide C, Garrido MG, Schmidt K-F, Seeliger MW, Löwel S, Weiler R, Hübner CA, Dedek K.** Lack of the sodium-driven chloride bicarbonate exchanger NCBE impairs visual function in the mouse retina. *PLoS One* 7: e46155, 2012.

155. **Hofmann J.** The potential for isoenzyme-selective modulation of protein kinase C. *FASEB J.* 11: 649–669, 1997.
156. **Höglund P, Haila S, Socha J, Tomaszewski L, Saarialho-Kere U, Karjalainen-Lindsberg ML, Airola K, Holmberg C, de la Chapelle A, Kere J.** Mutations of the Down-regulated in adenoma (DRA) gene cause congenital chloride diarrhoea. *Nat. Genet.* 14: 316–319, 1996.
157. **Hong JH, Yang D, Shcheynikov N, Ohana E, Shin DM, Muallem S.** Convergence of IRBIT, phosphatidylinositol (4,5) biphosphate, and WNK/SPAK kinases in regulation of the Na⁺-HCO₃⁻ cotransporters family. *PNAS* 110: 4105–10, 2013.
158. **House C, Kemp BE.** Protein kinase C contains a pseudosubstrate prototope in its regulatory domain. *Science (80-).* 238: 1726–1728, 1987.
159. **Hu T, Exton JH.** Mechanisms of regulation of phospholipase D1 by protein kinase Calpha. *J. Biol. Chem.* 278: 2348–55, 2003.
160. **Hu T, Exton JH.** Protein kinase Calpha translocates to the perinuclear region to activate phospholipase D1. *J. Biol. Chem.* 279: 35702–35708, 2004.
161. **Hui X, Reither G, Kaestner L, Lipp P.** Targeted activation of conventional and novel protein kinases C through differential translocation patterns. *Mol. Cell. Biol.* 34: 2370–2381, 2014.
162. **Hurley JH, Newton AC, Parker PJ, Blumberg PM, Nishizuka Y.** Taxonomy and function of C1 protein kinase C homology domains. *Protein Sci.* 6: 477–80, 1997.
163. **Huynh H, Hao H-X, Chan SL, Chen D, Ong R, Soo KC, Pochanard P, Yang D, Ruddy DA, Liu M, Derti A, Balak MN, Palmer MR, Wang Y, Lee BH, Sellami D, Zhu AX, Schlegel R, Huang A.** Loss of Tuberous Sclerosis Complex 2 (TSC2) is Frequent in Hepatocellular Carcinoma and Predicts Response to mTORC1 Inhibitor Everolimus. *Mol. Cancer Ther.* (February 27, 2015). doi: 10.1158/1535-7163.MCT-14-0768.
164. **Iijima Y, Laser M, Shiraishi H, Willey CD, Sundaravadivel B, Xu L, McDermott PJ, Kuppuswamy D.** c-Raf/MEK/ERK pathway controls protein kinase C-mediated p70S6K activation in adult cardiac muscle cells. *J. Biol. Chem.* 277: 24610–24619, 2002.
165. **Ikenoue T, Inoki K, Yang Q, Zhou X, Guan K-L.** Essential function of TORC2 in PKC and Akt turn motif phosphorylation, maturation and signalling. *EMBO J.* 27: 1919–31, 2008.
166. **Ikuma M, Kashgarian M, Binder HJ, Rajendran VM.** Differential regulation of NHE isoforms by sodium depletion in proximal and distal segments of rat colon. *Am. J. Physiol.* 276: G539–49, 1999.
167. **Inoki K, Li Y, Zhu T, Wu J, Guan K-L.** TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nat. Cell Biol.* 4: 648–57, 2002.
168. **Isenberg JI, Ljungström M, Säfsten B, Flemström G.** Proximal duodenal enterocyte transport: evidence for Na⁺-H⁺ and Cl⁻-HCO₃⁻ exchange and NaHCO₃ cotransport. *Am. J. Physiol.* 265: G677–G685, 1993.
169. **Ishiguro H, Steward MC, Lindsay ARG, Case RM.** Accumulation of intracellular HCO₃⁻ by Na⁺-HCO₃⁻ cotransport in interlobular ducts from guinea-pig pancreas. *J. Physiol.* 495: 169–178, 1996.

170. **Ivey RA, Sajan MP, Farese R V.** Requirements for pseudosubstrate arginine residues during autoinhibition and phosphatidylinositol 3,4,5-(PO₄)₃-dependent activation of atypical PKC. *J. Biol. Chem.* 289: 25021–30, 2014.
171. **Jacob P, Christiani S, Rossmann H, Lamprecht G, Vieillard-Baron D, Müller R, Gregor M, Seidler U.** Role of Na(+)/HCO₃(-) cotransporter NBC1, Na(+)/H(+) exchanger NHE1, and carbonic anhydrase in rabbit duodenal bicarbonate secretion. *Gastroenterology* 119: 406–19, 2000.
172. **Jacob P, Christiani S, Rossmann H, Lamprecht G, Vieillard-Baron D, Müller R, Gregor M, Seidler U.** Role of Na⁺ HCO₃⁻ cotransporter NBC1, Na⁺/H⁺ exchanger NHE1, and carbonic anhydrase in rabbit duodenal bicarbonate secretion. *Gastroenterology* 119: 406–419, 2000.
173. **Jain S, Suzuki T, Seth A, Samak G, Rao R.** Protein kinase C ζ phosphorylates occludin and promotes assembly of epithelial tight junctions. *Biochem. J.* 437: 13205–13208, 2011.
174. **Jakab RL, Collaco AM, Ameen NA.** Physiological relevance of cell-specific distribution patterns of CFTR, NKCC1, NBCe1, and NHE3 along the crypt-villus axis in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 300: G82–G98, 2011.
175. **Jakab RL, Collaco AM, Ameen NA.** Cell-specific effects of luminal acid, bicarbonate, cAMP, and carbachol on transporter trafficking in the intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 303: G937–50, 2012.
176. **Johansson ME V, Gustafsson JK, Sjöberg KE, Petersson J, Holm L, Sjövall H, Hansson GC.** Bacteria penetrate the inner mucus layer before inflammation in the dextran sulfate colitis model. *PLoS One* 5: e12238, 2010.
177. **Kato A, Romero M.** Regulation of electroneutral NaCl absorption by the small intestine. *Annu. Rev. Physiol.* 73: 261–281, 2011.
178. **Kawakami Y, Nishimoto H, Kitaura J, Maeda-Yamamoto M, Kato RM, Littman DR, Leitges M, Rawlings DJ, Kawakami T.** Protein kinase C betaII regulates Akt phosphorylation on Ser-473 in a cell type- and stimulus-specific fashion. *J. Biol. Chem.* 279: 47720–5, 2004.
179. **Keranen LM, Dutil EM, Newton AC.** Protein kinase C is regulated in vivo by three functionally distinct phosphorylations. *Curr. Biol.* 5: 1394–1403, 1995.
180. **Keranen LM, Newton AC.** Ca²⁺ differentially regulates conventional protein kinase Cs' membrane interaction and activation. *J. Biol. Chem.* 272: 25959–67, 1997.
181. **Kerman DH, Deshpande AR.** Gut microbiota and inflammatory bowel disease: the role of antibiotics in disease management. *Postgrad. Med.* 126: 7–19, 2014.
182. **Khorrami BM, Nowik M, Wagner C.** The distribution of intestinal and acid-base transporters of the Slc4, Slc9 and Slc26 gene families. *Acta Physiol.* 189: P11–L1–05, 2007.
183. **Kim HW, Ha SH, Lee MN, Huston E, Kim D-H, Jang SK, Suh P-G, Houslay MD, Ryu SH.** Cyclic AMP controls mTOR through regulation of the dynamic interaction between Rheb and phosphodiesterase 4D. *Mol. Cell. Biol.* 30: 5406–20, 2010.

184. **King JD, Fitch AC, Lee JK, McCane JE, Mak D-OD, Foskett JK, Hallows KR.** AMP-activated protein kinase phosphorylation of the R domain inhibits PKA stimulation of CFTR. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297: C94–101, 2009.
185. **Kirk KL, Halm DR, Dawson DC.** Active sodium transport by turtle colon via an electrogenic Na-K exchange pump. *Nature* 287: 237–239, 1980.
186. **Kitatani K, Idkowiak-Baldys J, Hannun YA.** Mechanism of Inhibition of Sequestration of Protein Kinase C α/β II by Ceramide. *J. Biol. Chem.* 282: 20647–20656, 2007.
187. **Ko SB, Zeng W, Dorwart MR, Luo X, Kim KH, Millen L, Goto H, Naruse S, Soyombo A, Thomas PJ, Muallem S.** Gating of CFTR by the STAS domain of SLC26 transporters. *Nat. Cell Biol.* 6: 343–350, 2004.
188. **Köckerling A, Sorgenfrei D, Fromm M.** Electrogenic Na⁺ absorption of rat distal colon is confined to surface epithelium: a voltage-scanning study. *Am. J. Physiol.* 264: C1285–C1293, 1993.
189. **Kolesnick RN, Clegg S.** 1,2-Diacylglycerols, but Not Phorbol Esters, Activate a Potential Inhibitory Pathway for Protein Kinase C in GH3 Pituitary Cells. *J. Biol. Chem.* 263: 6534–6537, 1988.
190. **Komander D, Kular G, Deak M, Alessi DR, van Aalten DMF.** Role of T-loop phosphorylation in PDK1 activation, stability, and substrate binding. *J. Biol. Chem.* 280: 18797–18802, 2005.
191. **Krug SM, Günzel D, Conrad MP, Lee I-FM, Amasheh S, Fromm M, Yu ASL.** Charge-selective claudin channels. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1257: 20–8, 2012.
192. **Krug SM, Schulzke JD, Fromm M.** Tight junction, selective permeability, and related diseases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 36C: 166–176, 2014.
193. **Kunzelmann K, Mall M.** Electrolyte transport in the mammalian colon: mechanisms and implications for disease. *Physiol. Rev.* 82: 245–89, 2002.
194. **Kurtz I, Petrasek D, Tatishchev S.** Molecular Mechanisms of Electrogenic Sodium Bicarbonate Cotransport: Structural and Equilibrium Thermodynamic Considerations. *J. Membr. Biol.* 197: 77–90, 2004.
195. **Lacabaratz-Porret C, Corvazier E, Kovàcs T, Bobe R, Bredoux R, Launay S, Papp B, Enouf J.** Platelet sarco/endoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase isoform 3b and Rap 1b: interrelation and regulation in physiopathology. *Biochem. J.* 332 (Pt 1): 173–81, 1998.
196. **Lamprecht G, Gaco V, Turner JR, Natour D, Gregor M.** Regulation of the intestinal anion exchanger DRA (downregulated in adenoma). *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1165: 261–6, 2009.
197. **Laplanche M, Sabatini DM.** mTOR signaling at a glance. *J. Cell Sci.* 122: 3589–94, 2009.
198. **Laplanche M, Sabatini DM.** An emerging role of mTOR in lipid biosynthesis. *Curr. Biol.* 19: R1046–52, 2009.
199. **Laplanche M, Sabatini DM.** mTOR signaling in growth control and disease. *Cell* 149: 274–93, 2012.

200. **Lee HW, Smith L, Pettit GR, Bingham Smith J.** Dephosphorylation of activated protein kinase C contributes to downregulation by bryostatin. *Am. J. Physiol.* 271: C304–C311, 1996.
201. **Lee JY, Chiu Y-H, Asara J, Cantley LC.** Inhibition of PI3K binding to activators by serine phosphorylation of PI3K regulatory subunit p85alpha Src homology-2 domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108: 14157–62, 2011.
202. **Lee MG, Ohana E, Park HW, Yang D, Muallem S.** Molecular mechanism of pancreatic and salivary gland fluid and HCO₃ secretion. *Physiol. Rev.* 92: 39–74, 2012.
203. **Lee S-K, Boron WF, Parker MD.** Relief of autoinhibition of the electrogenic Na-HCO₃ cotransporter NBCe1-B: role of IRBIT vs. amino-terminal truncation. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 302: C518–C526, 2012.
204. **Lee-Kwon W, Kim JH, Choi JW, Kawano K, Cha B, Dartt DA, Zoukhri D, Donowitz M.** Ca²⁺-dependent inhibition of NHE3 requires PKC alpha which binds to E3KARP to decrease surface NHE3 containing plasma membrane complexes. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 285: C1527–C1536, 2003.
205. **Leontieva O V, Black JD.** Identification of two distinct pathways of protein kinase Calpha down-regulation in intestinal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 279: 5788–801, 2004.
206. **Leppilampi M, Parkkila S, Karttunen T, Gut MO, Gros G, Sjöblom M.** Carbonic anhydrase isozyme-II-deficient mice lack the duodenal bicarbonate secretory response to prostaglandin E₂. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 15247–52, 2005.
207. **Leslie NR, Biondi RM, Alessi DR.** Phosphoinositide-regulated kinases and phosphoinositide phosphatases. *Chem. Rev.* 101: 2365–80, 2001.
208. **Li S, Zhang Q, You G.** Three ubiquitination sites of organic anion transporter-1 synergistically mediate protein kinase C-dependent endocytosis of the transporter. *Mol. Pharmacol.* 84: 139–46, 2013.
209. **Liedtke CM, Cole TS.** Antisense oligonucleotide to PKC-epsilon alters cAMP-dependent stimulation of CFTR in Calu-3 cells. *Am. J. Physiol. Physiol.* 275: C1357–C1364, 1998.
210. **Liedtke CM, Yun CHC, Kyle N, Wang D.** Protein kinase C epsilon-dependent regulation of cystic fibrosis transmembrane regulator involves binding to a receptor for activated C kinase (RACK1) and RACK1 binding to Na⁺/H⁺ exchange regulatory factor. *J. Biol. Chem.* 277: 22925–33, 2002.
211. **Lissner S, Hsieh C-J, Nold L, Bannert K, Bodammer P, Sultan A, Seidler U, Graeve L, Lamprecht G.** The PDZ-interaction of the intestinal anion exchanger downregulated in adenoma (DRA; SLC26A3) facilitates its movement into Rab11a-positive recycling endosomes. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 304: G980–90, 2013.
212. **Liu Y, Xu J-Y, Wang D-K, Wang L, Chen L-M.** Cloning and identification of two novel NBCe1 splice variants from mouse reproductive tract tissues: a comparative study of NCBT genes. *Genomics* 98: 112–9, 2011.
213. **Long X, Lin Y, Ortiz-Vega S, Yonezawa K, Avruch J.** Rheb binds and regulates the mTOR kinase. *Curr. Biol.* 15: 702–13, 2005.

214. **Lu J, Daly CM, Parker MD, Gill HS, Piermarini PM, Pelletier MF, Boron WF.** Effect of human carbonic anhydrase II on the activity of the human electrogenic Na/HCO₃ cotransporter NBCe1-A in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. ...* 281: 19241–19250, 2006.
215. **Lu Z, Ding L, Lu Q, Chen Y-H.** Claudins in intestines: Distribution and functional significance in health and diseases. *Tissue barriers* 1: e24978, 2013.
216. **Lu Z, Liu D, Hornia A, Devonish W, Pagano M, Foster DA.** Activation of Protein Kinase C Triggers Its Ubiquitination and Degradation. *Mol. Cell. Biol.* 18: 839–845, 1998.
217. **Lum MA, Pundt KE, Paluch BE, Black AR, Black JD.** Agonist-induced down-regulation of endogenous protein kinase c α through an endolysosomal mechanism. *J. Biol. Chem.* 288: 385–393, 2013.
218. **Majumdar D, Maunsbach A, Shacka J.** Localization of electrogenic Na/bicarbonate cotransporter NBCe1 variants in rat brain. *Neuroscience* 155: 818–832, 2008.
219. **Majumdar D, Maunsbach AB, Shacka JJ, Williams JB, Berger U V, Schultz KP, Harkins LE, Boron WF, Roth KA, Bevenssee MO.** Localization of electrogenic Na/bicarbonate cotransporter NBCe1 variants in rat brain. *Neuroscience* 155: 818–32, 2008.
220. **Mall M, Bleich M, Kuehr J, Brandis M, Greger R, Kunzelmann K.** CFTR-mediated inhibition of epithelial Na⁺ conductance in human colon is defective in cystic fibrosis. *Am. J. Physiol.* 277: G709–G716, 1999.
221. **Manning BD, Tee AR, Logsdon MN, Blenis J, Cantley LC.** Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/akt pathway. *Mol. Cell* 10: 151–62, 2002.
222. **Manokas T, Fromkes JJ, Sundaram U.** Effect of chronic inflammation on ileal short-chain fatty acid/bicarbonate exchange. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278: G585–90, 2000.
223. **Martinez-Augustin O, Romero-Calvo I, Suarez MD, Zarzuelo A, de Medina FS.** Molecular bases of impaired water and ion movements in inflammatory bowel diseases. *Inflamm. Bowel Dis.* 15: 114–127, 2009.
224. **Matsumoto R, Wang D, Blonska M, Li H, Kobayashi M, Pappu B, Chen Y, Wang D, Lin X.** Phosphorylation of CARMA1 plays a critical role in T Cell receptor-mediated NF-kappaB activation. *Immunity* 23: 575–85, 2005.
225. **Matter N, Ritz MF, Freyermuth S, Rogue P, Malviya AN.** Stimulation of nuclear protein kinase C leads to phosphorylation of nuclear inositol 1,4,5-trisphosphate receptor and accelerated calcium release by inositol 1,4,5-trisphosphate from isolated rat liver nuclei. *J. Biol. Chem.* 268: 732–6, 1993.
226. **Matthews JB, Awtrey CS, Hecht G, Tally KJ, Thompson RS, Madara JL.** Phorbol ester sequentially downregulates cAMP-regulated basolateral and apical Cl⁻ transport pathways in T84 cells. *Am. J. Physiol.* 265: C1109–17, 1993.
227. **Matthews JB, Smith JA, Hrnjez BJ.** Effects of F-actin stabilization or disassembly on epithelial Cl⁻ secretion and Na-K-2Cl cotransport. *Am. J. Physiol.* 272: C254–C262, 1997.

228. **Matthews JB, Smith JA, Nguyen H, Soybel D, Jordan ML.** Modulation of intestinal chloride secretion at basolateral transport sites: Opposing effects of cyclic adenosine monophosphate and phorbol ester. *Surgery* 118: 147–153, 1995.
229. **Mattiazzi A, Mundiña-Weilenmann C, Guoxiang C, Vittone L, Kranias E.** Role of phospholamban phosphorylation on Thr17 in cardiac physiological and pathological conditions. *Cardiovasc. Res.* 68: 366–75, 2005.
230. **McAlear SD, Liu X, Williams JB, McNicholas-Bevensee CM, Bevensee MO.** Electrogenic Na/HCO₃ cotransporter (NBCe1) variants expressed in *Xenopus* oocytes: functional comparison and roles of the amino and carboxy termini. *J. Gen. Physiol.* 127: 639–58, 2006.
231. **McMurtrie HL, Cleary HJ, Alvarez B V, Loiselle FB, Sterling D, Morgan PE, Johnson DE, Casey JR.** The bicarbonate transport metabolon. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 19: 231–6, 2004.
232. **Medvetz D, Priolo C, Henske EP.** Therapeutic targeting of cellular metabolism in cells with hyperactive mTORC1: A paradigm shift. *Mol. Cancer Res.* (October 8, 2014). doi: 10.1158/1541-7786.MCR-14-0343.
233. **Melnikov S, Sagi-Eisenberg R.** Down-regulating protein kinase C alpha: functional cooperation between the proteasome and the endocytic system. *Cell. Signal.* 21: 1607–1619, 2009.
234. **Melvin JE, Park K, Richardson L, Schultheis PJ, Shull GE.** Mouse down-regulated in adenoma (DRA) is an intestinal Cl⁻/HCO₃⁻ exchanger and is up-regulated in colon of mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem.* 274: 22855–22861, 1999.
235. **Mikoshiba K.** IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J. Neurochem.* 102: 1426–1446, 2007.
236. **Mikoshiba K.** IP₃ receptor/Ca²⁺ channel: from discovery to new signaling concepts. *J. Neurochem.* 102: 1426–1446, 2007.
237. **Mikoshiba K.** Role of IP₃ receptor signaling in cell functions and diseases. *Adv. Biol. Regul.* 57: 217–27, 2015.
238. **Mizumori M, Meyerowitz J, Takeuchi T, Lim S, Lee P, Supuran CT, Guth PH, Engel E, Kaunitz JD, Akiba Y.** Epithelial carbonic anhydrases facilitate PCO₂ and pH regulation in rat duodenal mucosa. *J. Physiol.* 573: 827–842, 2006.
239. **Mochly-Rosen D, Das K, Grimes K V.** Protein kinase C, an elusive therapeutic target? *Nat. Rev. Drug Discov.* 11: 937–57, 2012.
240. **Monfar M, Lemon KP, Grammer TC, Cheatham L, Chung J, Vlahos CJ, Blenis J.** Activation of pp70/85 S6 kinases in interleukin-2-responsive lymphoid cells is mediated by phosphatidylinositol 3-kinase and inhibited by cyclic AMP. *Mol. Cell. Biol.* 15: 326–37, 1995.
241. **Montero M, Lobatón CD, Gutierrez-Fernández S, Moreno A, Alvarez J.** Modulation of histamine-induced Ca²⁺ release by protein kinase C. Effects on cytosolic and mitochondrial [Ca²⁺] peaks. *J. Biol. Chem.* 278: 49972–9, 2003.
242. **Mora A, Komander D, van Aalten DMF, Alessi DR.** PDK1, the master regulator of AGC kinase signal transduction. *Semin. Cell Dev. Biol.* 15: 161–170, 2004.

243. **Moschella PC, McKillop J, Pleasant DL, Harston RK, Balasubramanian S, Kuppuswamy D.** mTOR complex 2 mediates Akt phosphorylation that requires PKC ϵ in adult cardiac muscle cells. *Cell. Signal.* 25: 1904–12, 2013.
244. **Moschella PC, Rao VU, McDermott PJ, Kuppuswamy D.** Regulation of mTOR and S6K1 activation by the nPKC isoforms, PKC ϵ and PKC δ , in adult cardiac muscle cells. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 43: 754–766, 2007.
245. **Moschetta M, Reale A, Marasco C, Vacca A, Carratù MR.** Therapeutic targeting of the mTOR-signalling pathway in cancer: benefits and limitations. *Br. J. Pharmacol.* 171: 3801–13, 2014.
246. **Müller-Berger S, Ducoudret O, Diakov A, Frömter E.** The renal Na-HCO₃-cotransporter expressed in *Xenopus laevis* oocytes: change in stoichiometry in response to elevation of cytosolic Ca²⁺ concentration. *Pflügers Arch.* 442: 718–728, 2001.
247. **Musch MW, Arvans DL, Wu GD, Chang EB.** Functional coupling of the downregulated in adenoma Cl⁻/base exchanger DRA and the apical Na⁺/H⁺ exchangers NHE2 and NHE3. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 296: G259–70, 2009.
248. **Musch MW, Bookstein C, Xie Y, Sellin JH, Chang EB.** SCFA increase intestinal Na absorption by induction of NHE3 in rat colon and human intestinal C2/bbe cells. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G687–93, 2001.
249. **Musch MW, Li YC, Chang EB.** Angiotensin II directly regulates intestinal epithelial NHE3 in Caco2BBE cells. *BMC Physiol.* 9: 5, 2009.
250. **Mykoniatis A, Shen L, Fedor-Chaikin M, Tang J, Tang X, Worrell RT, Delpire E, Turner JR, Matlin KS, Bouyer P, Matthews JB.** Phorbol 12-myristate 13-acetate-induced endocytosis of the Na-K-2Cl cotransporter in MDCK cells is associated with a clathrin-dependent pathway. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 298: C85–97, 2010.
251. **Nagahama K, Ogawa A, Shirane K, Shimomura Y, Sugimoto K, Mizoguchi A.** Protein kinase C theta plays a fundamental role in different types of chronic colitis. *Gastroenterology* 134: 459–469, 2008.
252. **Nagy G, Kim JH, Pang ZP, Matti U, Rettig J, Südhof TC, Sørensen JB.** Different effects on fast exocytosis induced by synaptotagmin 1 and 2 isoforms and abundance but not by phosphorylation. *J. Neurosci.* 26: 632–43, 2006.
253. **Nakano T, Sekine S, Ito K, Horie T.** Correlation between apical localization of Abcc2/Mrp2 and phosphorylation status of ezrin in rat intestine. *Drug Metab. Dispos.* 37: 1521–7, 2009.
254. **Navé BT, Ouwens M, Withers DJ, Alessi DR, Shepherd PR.** Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem. J.* 344 Pt 2: 427–31, 1999.
255. **Newton AC.** Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem. J.* 370: 361–71, 2003.
256. **Newton AC.** Lipid activation of protein kinases. *J. Biol. Chem.* 50: S266–71, 2009.

257. **Ni Y, Sinnett-Smith J, Young SH, Rozengurt E.** PKD1 mediates negative feedback of PI3K/Akt activation in response to G protein-coupled receptors. *PLoS One* 8: e73149, 2013.
258. **O'Brien TG, Diamond L.** Metabolism of tritium-labeled 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate by cells in culture. *Cancer Res.* 38: 2562–6, 1978.
259. **Oestreich EA, Wang H, Malik S, Kaproth-Joslin KA, Blaxall BC, Kelley GG, Dirksen RT, Smrcka A V.** Epac-mediated activation of phospholipase C(epsilon) plays a critical role in beta-adrenergic receptor-dependent enhancement of Ca²⁺ mobilization in cardiac myocytes. *J. Biol. Chem.* 282: 5488–95, 2007.
260. **Ohba Y, Kurokawa K, Matsuda M.** Mechanism of the spatio-temporal regulation of Ras and Rap1. *EMBO J.* 22: 859–69, 2003.
261. **Okhrimenko H, Lu W, Xiang C, Hamburger N, Kazimirsky G, Brodie C.** Protein kinase C-epsilon regulates the apoptosis and survival of glioma cells. *Cancer Res.* 65: 7301–9, 2005.
262. **Olala LO, Shapiro BA, Merchen TC, Wynn JJ, Bollag WB.** Protein kinase C and Src family kinases mediate angiotensin II-induced protein kinase D activation and acute aldosterone production. *Mol. Cell. Endocrinol.* 392: 173–81, 2014.
263. **Orlowski A, De Giusti VC, Morgan PE, Aiello EA, Alvarez B V.** Binding of carbonic anhydrase IX to extracellular loop 4 of the NBCe1 Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter enhances NBCe1-mediated HCO₃⁻ influx in the rat heart. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 303: C69–80, 2012.
264. **Orsenigo MN, Tosco M, Baroni MD, Bazzini C, Laforenza U, Faelli A.** Protein kinase C regulation of rat jejunal transport systems: mechanisms involved in bicarbonate absorption. *Exp. Physiol.* 87: 299–309, 2002.
265. **El Osta M, Liu M, Adada M, Senkal CE, Idkowiak-Baldys J, Obeid LM, Clarke CJ, Hannun Y a.** Sustained PKCβII activity confers oncogenic properties in a phospholipase D- and mTOR-dependent manner. *FASEB J.* 28: 495–505, 2014.
266. **Parekh D, Ziegler W, Yonezawa K, Hara K, Parker PJ.** Mammalian TOR Controls One of Two Kinase Pathways Acting upon nPKCδ and nPKCε. *J. Biol. Chem.* 274: 34758–34764, 1999.
267. **Parekh DB, Ziegler W, Parker PJ.** Multiple pathways control protein kinase C phosphorylation. *EMBO J.* 19: 496–503, 2000.
268. **Park HW, Nam JH, Kim JY, Namkung W, Yoon JS, Lee J-S, Kim KS, Venglovecz V, Gray MA, Kim KH, Lee MG.** Dynamic regulation of CFTR bicarbonate permeability by [Cl⁻]_i and its role in pancreatic bicarbonate secretion. *Gastroenterology* 139: 620–631, 2010.
269. **Park S, Hong JH, Ohana E, Muallem S.** The WNK/SPAK and IRBIT/PP1 pathways in epithelial fluid and electrolyte transport. *Physiology* 27: 291–9, 2012.
270. **Park S, Shcheynikov N, Hong JH, Zheng C, Suh SH, Kawaai K, Ando H, Mizutani A, Abe T, Kiyonari H, Seki G, Yule D, Mikoshiba K, Muallem S.** Irbit mediates synergy between ca(2+) and cAMP signaling pathways during epithelial transport in mice. *Gastroenterology* 145: 232–41, 2013.

271. **Parker MD, Boron WF.** The divergence, actions, roles, and relatives of sodium-coupled bicarbonate transporters. *Physiol. Rev.* 93: 803–959, 2013.
272. **Pearce LR, Komander D, Alessi DR.** The nuts and bolts of AGC protein kinases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 11: 9–22, 2010.
273. **Peng H, Liu J, Sun Q, Chen R, Wang Y, Duan J, Li C, Li B, Jing Y, Chen X, Mao Q, Xu K-F, Walker CL, Li J, Wang J, Zhang H.** mTORC1 enhancement of STIM1-mediated store-operated Ca²⁺ entry constrains tuberous sclerosis complex-related tumor development. *Oncogene* 32: 4702–11, 2013.
274. **Perry C, Baker OJ, Reyland ME, Grichtchenko II.** PKC $\alpha\beta\gamma$ - and PKC δ -dependent endocytosis of NBCe1-A and NBCe1-B in salivary parotid acinar cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 297: C1409–C1423, 2009.
275. **Perry C, Blaine J, Le H, Grichtchenko II.** PMA- and ANG II-induced PKC regulation of the renal Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter (hkNBCe1). *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 290: F417–27, 2006.
276. **Perry C, Le H, Grichtchenko II.** ANG II and calmodulin/CaMKII regulate surface expression and functional activity of NBCe1 via separate means. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 293: F68–F77, 2007.
277. **Perry C, Quissell DO, Reyland ME, Grichtchenko II.** Electrogenic NBCe1 (SLC4A4), but not electroneutral NBCn1 (SLC4A7), cotransporter undergoes cholinergic-stimulated endocytosis in salivary ParC5 cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295: C1385–C1398, 2008.
278. **Peterson RT, Schreiber SL.** Kinase phosphorylation: Keeping it all in the family. *Curr. Biol.* 9: R521–4, 1999.
279. **Ponsioen B, Zhao J, Riedl J, Zwartkruis F, van der Krogt G, Zaccolo M, Moolenaar WH, Bos JL, Jalink K.** Detecting cAMP-induced Epac activation by fluorescence resonance energy transfer: Epac as a novel cAMP indicator. *EMBO Rep.* 5: 1176–80, 2004.
280. **Potter GD, Burlingame SM.** Ion transport by neonatal rabbit distal colon. *Am. J. Physiol.* 250: G754–9, 1986.
281. **Praetorius J, Hager H, Nielsen S, Aalkjaer C, Friis UG, Ainsworth MA, Johansen T.** Molecular and functional evidence for electrogenic and electroneutral Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporters in murine duodenum. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 280: G332–43, 2001.
282. **Price DJ, Grove JR, Calvo V, Avruch J, Bierer BE.** Rapamycin-induced inhibition of the 70-kilodalton S6 protein kinase. *Science* 257: 973–7, 1992.
283. **Rajendran VM, Binder HJ.** Distribution and regulation of apical Cl⁻/anion exchanges in surface and crypt cells of rat distal colon. *Am. J. Physiol.* 276: G132–7, 1999.
284. **Rajendran VM, Binder HJ.** Characterization and molecular localization of anion transporters in colonic epithelial cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915: 15–29, 2000.
285. **Rajendran VM, Kashgarian M, Binder HJ.** Aldosterone induction of electrogenic sodium transport in the apical membrane vesicles of rat distal colon. *J. Biol. Chem.* 264: 18638–44, 1989.

286. **Reynolds A, Parris A, Evans L a, Lindqvist S, Sharp P, Lewis M, Tighe R, Williams MR.** Dynamic and differential regulation of NKCC1 by calcium and cAMP in the native human colonic epithelium. *J. Physiol.* 582: 507–24, 2007.
287. **Rhee SG.** Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 281–312, 2001.
288. **Roggero CM, Tomes CN, De Blas GA, Castillo J, Michaut MA, Fukuda M, Mayorga LS.** Protein kinase C-mediated phosphorylation of the two polybasic regions of synaptotagmin VI regulates their function in acrosomal exocytosis. *Dev. Biol.* 285: 422–35, 2005.
289. **Romero MF, Boron WF.** Electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporters: cloning and physiology. *Annu. Rev. Physiol.* 61: 699–723, 1999.
290. **Romero MF, Chen A-P, Parker MD, Boron WF.** The SLC4 family of bicarbonate (HCO₃⁻) transporters. *Mol. Aspects Med.* 34: 159–82, 2013.
291. **Romero MF, Fong P, Berger U V, Hediger MA, Boron WF.** Cloning and functional expression of rNBC, an electrogenic Na(+)-HCO₃⁻ cotransporter from rat kidney. *Am. J. Physiol.* 274: F425–F432, 1998.
292. **Romero MF, Fulton CM, Boron WF.** The SLC4 family of HCO₃⁻ transporters. *Pflügers Arch.* 447: 495–509, 2004.
293. **De Rooij J, Zwartkruis FJ, Verheijen MH, Cool RH, Nijman SM, Wittinghofer A, Bos JL.** Epac is a Rap1 guanine-nucleotide-exchange factor directly activated by cyclic AMP. *Nature* 396: 474–7, 1998.
294. **Ross IN, Turnberg LA.** Studies of the “mucus-bicarbonate” barrier on rat fundic mucosa: the effects of luminal pH and a stable prostaglandin analogue. *Gut* 24: 1030–3, 1983.
295. **Rozengurt E, Rey O, Waldron RT.** Protein kinase D signaling. *J. Biol. Chem.* 280: 13205–13208, 2005.
296. **Ruiz OS, Arruda JA.** Regulation of the renal Na-HCO₃ cotransporter by cAMP and Ca-dependent protein kinases. *Am. J. Physiol.* 262: F560–5, 1992.
297. **Rybin VO, Sabri A, Short J, Braz JC, Molkentin JD, Steinberg SF.** Cross-regulation of novel protein kinase C (PKC) isoform function in cardiomyocytes. Role of PKC epsilon in activation loop phosphorylations and PKC delta in hydrophobic motif phosphorylations. *J. Biol. Chem.* 278: 14555–64, 2003.
298. **Sabatini DM, Erdjument-Bromage H, Lui M, Tempst P, Snyder SH.** RAFT1: A mammalian protein that binds to FKBP12 in a rapamycin-dependent fashion and is homologous to yeast TORs. *Cell* 78: 35–43, 1994.
299. **Saksena S, Gill RK, Syed I a, Tyagi S, Alrefai W a, Ramaswamy K, Dudeja PK.** Inhibition of apical Cl⁻/OH⁻ exchange activity in Caco-2 cells by phorbol esters is mediated by PKCepsilon. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: C1492–500, 2002.
300. **Saleh SN, Albert AP, Large WA.** Activation of native TRPC1/C5/C6 channels by endothelin-1 is mediated by both PIP₃ and PIP₂ in rabbit coronary artery myocytes. *J. Physiol.* 587: 5361–75, 2009.

301. **Sandle GI, Higgs N, Crowe P, Marsh MN, Venkatesan S, Peters TJ.** Cellular basis for defective electrolyte transport in inflamed human colon. *Gastroenterology* 99: 97–105, 1990.
302. **Sandle GI.** Pathogenesis of diarrhea in ulcerative colitis: new views on an old problem. *J. Clin. Gastroenterol.* 39: S49–52, 2005.
303. **Sarbassov D, Ali S, Kim D, Guertin D, Latek R, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Sabatini D.** Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr. Biol.* 14: 1296–1302, 2004.
304. **Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM.** Growing roles for the mTOR pathway. *Curr. Opin. Cell Biol.* 17: 596–603, 2005.
305. **Schmitz H, Barmeyer C, Fromm M, Runkel N, Foss HD, Bentzel CJ, Riecken EO, Schulzke JD.** Altered tight junction structure contributes to the impaired epithelial barrier function in ulcerative colitis. *Gastroenterology* 116: 301–9, 1999.
306. **Schmitz H, Barmeyer C, Gitter AH, Wullstein F, Bentzel CJ, Fromm M, Riecken EO, Schulzke JD.** Epithelial Barrier and Transport Function of the Colon in Ulcerative Colitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915: 312–326, 2000.
307. **Schrödl-Häußel M, Theparambil SM, Deitmer JW, Roussa E.** Regulation of functional expression of the electrogenic sodium bicarbonate cotransporter 1, NBCe1 (SLC4A4), in mouse astrocytes. *Glia* 63: 1226–39, 2015.
308. **Schueler C, Becker HM, McKenna R, Deitmer JW.** Transport activity of the sodium bicarbonate cotransporter NBCe1 is enhanced by different isoforms of carbonic anhydrase. *PLoS One* 6: e27167, 2011.
309. **Schultheis PJ, Clarke LL, Meneton P, Miller ML, Soleimani M, Gawenis LR, Riddle TM, Duffy JJ, Doetschman T, Wang T, Giebisch G, Aronson PS, Lorenz JN, Shull GE.** Renal and intestinal absorptive defects in mice lacking the NHE3 Na⁺/H⁺ exchanger. *Nat. Genet.* 19: 282–285, 1998.
310. **Schweinfest CW, Spyropoulos DD, Henderson KW, Kim J-H, Chapman JM, Barone S, Worrell RT, Wang Z, Soleimani M.** Slc26a3 (Dra)-deficient Mice Display Chloride-Losing Diarrhea, Enhanced Colonic Proliferation, and Distinct Up-regulation of Ion Transporters in the Colon. *J. Biol. Chem.* 281: 37962–37971, 2006.
311. **Seavilleklein G, Amer N, Evagelidis A, Chappe F, Irvine T, Hanrahan JW, Chappe V.** PKC phosphorylation modulates PKA-dependent binding of the R domain to other domains of CFTR. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 295: C1366–75, 2008.
312. **Seidler U, Bachmann O.** Molekulare Mechanismen des intestinalen Wasser- und Elektrolyttransportes und der Barrierefunktion. In: *Infektiologie des Gastrointestinaltraktes*, edited by Caspary W, Kist M, Stein J. Springer Berlin Heidelberg, p. 11–30.
313. **Seidler U, Blumenstein I, Kretz A, Viellard-Baron D, Rossmann H, Colledge W, Evans M, Ratcliff R, Gregor M.** A functional CFTR protein is required for mouse intestinal cAMP-, cGMP- and Ca²⁺-dependent HCO₃⁻ secretion. *J. Physiol.* 505: 411–423, 1997.
314. **Seidler U, Lenzen H, Cinar A, Tessema T, Bleich A, Riederer B.** Molecular mechanisms of disturbed electrolyte transport in intestinal inflammation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1072: 262–275, 2006.

315. **Seidler U, Rossmann H, Jacob P, Bachmann O, Christiani S, Lamprecht G, Gregor M.** Expression and function of Na⁺HCO₃⁻ cotransporters in the gastrointestinal tract. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 915: 1–14, 2000.
316. **Seidler U, Sjöblom M.** Gastroduodenal bicarbonate secretion. In: *Physiology of the Gastrointestinal Tract*, edited by Johnson LR, Gishan FK, Kaunitz JD, Merchant JL, Said HM, Wood JD. Elsevier Academic Press, 2012.
317. **Seidler UE.** Gastrointestinal HCO₃⁻ transport and epithelial protection in the gut: New techniques, transport pathways and regulatory pathways. *Curr. Opin. Pharmacol.* 13: 900–908, 2013.
318. **Seki G, Coppola S, Yoshitomi K, Burckhardt BC, Samarzija I, Müller-Berger S, Frömter E.** On the mechanism of bicarbonate exit from renal proximal tubular cells. *Kidney Int.* 49: 1671–1677, 1996.
319. **Seki G, Horita S, Suzuki M, Yamazaki O, Usui T, Nakamura M, Yamada H.** Molecular mechanisms of renal and extrarenal manifestations caused by inactivation of the electrogenic Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter NBCe1. *Front. Physiol.* 4: 270, 2013.
320. **Seki G.** Physiological and pathophysiological roles of the electrogenic Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCe1. *Open J. Mol. Integr. Physiol.* 01: 9–16, 2011.
321. **Sharma AK, Rigby AC, Alper SL.** STAS domain structure and function. *Cell. Physiol. Biochem.* 28: 407–22, 2011.
322. **Shcheynikov N, Kim KH, Kim K-M, Dorwart MR, Ko SBH, Goto H, Naruse S, Thomas PJ, Muallem S.** Dynamic control of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁽⁻⁾/HCO₃⁽⁻⁾ selectivity by external Cl⁽⁻⁾. *J. Biol. Chem.* 279: 21857–65, 2004.
323. **Shcheynikov N, Son A, Hong JH, Yamazaki O, Ohana E, Kurtz I, Shin DM, Muallem S.** Intracellular Cl⁻ as a signaling ion that potently regulates Na⁺/HCO₃⁻ transporters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* (January 5, 2015). doi: 10.1073/pnas.1415673112.
324. **Shen BQ, Barthelson RA, Skach W, Gruenert DC, Sigal E, Mrsny RJ, Widdicombe JH.** Mechanism of inhibition of cAMP-dependent epithelial chloride secretion by phorbol esters. *J. Biol. Chem.* 268: 19070–5, 1993.
325. **Shen JX, Wachten S, Halls ML, Everett KL, Cooper DMF.** Muscarinic receptors stimulate AC2 by novel phosphorylation sites, whereas Gβγ subunits exert opposing effects depending on the G-protein source. *Biochem. J.* 447: 393–405, 2012.
326. **Shirakabe K, Priori G, Yamada H, Ando H, Horita S, Fujita T, Fujimoto I, Mizutani A, Seki G, Mikoshiba K.** IRBIT, an inositol 1,4,5-trisphosphate receptor-binding protein, specifically binds to and activates pancreas-type Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter 1 (pNBC1). *PNAS* 103: 9542–9547, 2006.
327. **Singh A, Xia W, Riederer B, Juric M, Li J, Zheng W, Cinar A, Xiao F, Bachmann O, Song P, Praetorius J, Aalkjaer C, Seidler U.** Essential role of the electroneutral Na⁺-HCO₃⁻ cotransporter NBCn1 in murine duodenal acid–base balance and colonic mucus layer build-up in vivo. *J. Physiol.* 591: 2189–2204, 2013.
328. **Singh AK, Sjöblom M, Zheng W, Krabbenhöft A, Riederer B, Rausch B, Manns MP, Soleimani M, Seidler U.** CFTR and its key role in in vivo resting and luminal acid-induced duodenal HCO₃⁻ secretion. *Acta Physiol.* 193: 357–365, 2008.

329. **Singh SK, Binder HJ, Boron WF, Geibel JP.** Fluid absorption in isolated perfused colonic crypts. *J. Clin. Invest.* 96: 2373–9, 1995.
330. **Slack BE, Blusztajn JK.** Differential regulation of mTOR-dependent S6 phosphorylation by muscarinic acetylcholine receptor subtypes. *J. Cell. Biochem.* 104: 1818–1831, 2008.
331. **Söderholm JD, Peterson KH, Olaison G, Franzén LE, Weström B, Magnusson KE, Sjö Dahl R.** Epithelial permeability to proteins in the noninflamed ileum of Crohn's disease? *Gastroenterology* 117: 65–72, 1999.
332. **Soleimani M, Burnham CE.** Physiologic and molecular aspects of the Na⁺:HCO₃⁻ cotransporter in health and disease processes. *Kidney Int.* 57: 371–84, 2000.
333. **Soleimani M, Greeley T, Petrovic S, Wang Z, Amlal H, Kopp P, Burnham CE.** Pendrin: an apical Cl⁻/OH⁻/HCO₃⁻ exchanger in the kidney cortex. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 280: F356–F364, 2001.
334. **Song JC, Hanson CM, Vance T, Farokhzad OC, Lotz M, Matthews JB.** Regulation of epithelial transport and barrier function by distinct protein kinase C isoforms. *Am. J. Physiol.* ... 281: C649–C661, 2001.
335. **Song JC, Hrnjez BJ, Farokhzad OC, Matthews JB.** PKC-ε regulates basolateral endocytosis in human T84 intestinal epithelia: role of F-actin and MARCKS. *Am. J. Physiol.* 277: C1239–C1249, 1999.
336. **Song JC, Rangachari PK, Matthews JB.** Opposing effects of PKCα and PKCε on basolateral membrane dynamics in intestinal epithelia. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: C1548–56, 2002.
337. **Sorkina T, Hoover BR, Zahniser NR, Sorkin A.** Constitutive and protein kinase C-induced internalization of the dopamine transporter is mediated by a clathrin-dependent mechanism. *Traffic* 6: 157–170, 2005.
338. **Srivastava J, Procyk K, Iturrioz X, Parker PJ.** Phosphorylation is required for PMA- and cell-cycle-induced degradation of protein kinase Cδ. *Biochem. J.* 368: 349–355, 2002.
339. **Stahelin R V, Digman MA, Medkova M, Ananthanarayanan B, Melowic HR, Rafter JD, Cho W.** Diacylglycerol-induced membrane targeting and activation of protein kinase Cε: mechanistic differences between protein kinases Cδ and Cε. *J. Biol. Chem.* 280: 19784–19793, 2005.
340. **Stahelin R V, Digman MA, Medkova M, Ananthanarayanan B, Rafter JD, Melowic HR, Cho W.** Mechanism of Diacylglycerol-induced Membrane Targeting and Activation of Protein Kinase Cδ. *J. Biol. Chem.* 279: 29501–29512, 2004.
341. **Steinberg SF.** Structural Basis of Protein Kinase C Isoform Function. *Physiol. Rev.* 88: 1341–1378, 2008.
342. **Stephens LR, Jackson TR, Hawkins PT.** Agonist-stimulated synthesis of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate: a new intracellular signalling system? *Biochim. Biophys. Acta* 1179: 27–75, 1993.

343. **Sterling D, Brown NJD, Supuran CT, Casey JR.** The functional and physical relationship between the DRA bicarbonate transporter and carbonic anhydrase II. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 283: C1522–9, 2002.
344. **Sullivan S, Alex P, Dassopoulos T, Zachos NC, Iacobuzio-Donahue C, Donowitz M, Brant SR, Cuffari C, Harris ML, Datta LW, Conklin L, Chen Y, Li X.** Downregulation of sodium transporters and NHERF proteins in IBD patients and mouse colitis models: potential contributors to IBD-associated diarrhea. *Inflamm. Bowel Dis.* 15: 261–74, 2009.
345. **Sundaram U, West AB.** Effect of chronic inflammation on electrolyte transport in rabbit ileal villus and crypt cells. *Am. J. Physiol.* 272: G732–41, 1997.
346. **Suzuki M, Van Paesschen W, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, Legius E, Riant F, De Jonghe P, Li Y, Sekine T, Igarashi T, Fujimoto I, Mikoshiba K, Shimadzu M, Shiohara M, Braverman N, Al-Gazali L, Fujita T, Seki G.** Defective membrane expression of the Na(+)-HCO₃(-) cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. *PNAS* 107: 15963–8, 2010.
347. **Suzuki Y, Kaneko K.** Acid secretion in isolated guinea pig colon. *Am. J. Physiol.* 253: G155–G164, 1987.
348. **Talbot C, Lytle C.** Segregation of Na/H exchanger-3 and Cl/HCO₃ exchanger SLC26A3 (DRA) in rodent cecum and colon. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299: G358–67, 2010.
349. **Tang J, Bouyer P, Mykoniatis A, Buschmann M, Matlin KS, Matthews JB.** Activated PKC{delta} and PKC{epsilon} inhibit epithelial chloride secretion response to cAMP via inducing internalization of the Na⁺-K⁺-2Cl⁻ cotransporter NKCC1. *J. Biol. Chem.* 285: 34072–85, 2010.
350. **Tepperman BL, Soper BD, Chang Q.** Effect of protein kinase C activation on intracellular Ca₂⁺ signaling and integrity of intestinal epithelial cells. *Eur. J. Pharmacol.* 518: 1–9, 2005.
351. **Thastrup JO, Rafiqi FH, Vitari AC, Pozo-Guisado E, Deak M, Mehellou Y, Alessi DR.** SPAK/OSR1 regulate NKCC1 and WNK activity: analysis of WNK isoform interactions and activation by T-loop trans-autophosphorylation. *Biochem. J.* 441: 325–37, 2012.
352. **Toker A, Newton AC.** Cellular signaling: pivoting around PDK-1. *Cell* 103: 185–8, 2000.
353. **Tosco M, Orsenigo MN, Gastaldi G, Faelli A.** Protein kinase C regulation of rat jejunal transport system: mechanisms involved in lactate movement. *Exp. Physiol.* 87: 653–662, 2002.
354. **Trapnell BC, Zeitlin PL, Chu CS, Yoshimura K, Nakamura H, Guggino WB, Bargon J, Banks TC, Dalemans W, Pavirani A.** Down-regulation of cystic fibrosis gene mRNA transcript levels and induction of the cystic fibrosis chloride secretory phenotype in epithelial cells by phorbol ester. *J. Biol. Chem.* 266: 10319–23, 1991.
355. **Tresguerres M, Levin LR, Buck J.** Intracellular cAMP signaling by soluble adenylyl cyclase. *Kidney Int.* 79: 1277–1288, 2011.
356. **Treize AE, Buchwald M.** In vivo cell-specific expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Nature* 353: 434–437, 1991.

357. **Tsuchiya A, Kanno T, Nishizaki T.** Diacylglycerol promotes GLUT4 translocation to the cell surface in a PKC ϵ -dependent and PKC λ 1 and - ζ -independent manner. *Life Sci.* 93: 240–6, 2013.
358. **Tuo B-G, Chow JY, Barrett KE, Isenberg JI.** Protein kinase C potentiates cAMP-stimulated mouse duodenal mucosal bicarbonate secretion in vitro. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286: G814–G821, 2004.
359. **Turnamian SG, Binder HJ.** Regulation of active sodium and potassium transport in the distal colon of the rat. Role of the aldosterone and glucocorticoid receptors. *J. Clin. Invest.* 84: 1924–1929, 1989.
360. **Turnamian SG, Binder HJ.** Aldosterone and glucocorticoid receptor-specific agonists regulate ion transport in rat proximal colon. *Am. J. Physiol.* 258: G492–8, 1990.
361. **Turnberg LA, Bieberdorf FA, Morawski SG, Fordtran JS.** Interrelationships of chloride, bicarbonate, sodium, and hydrogen transport in the human ileum. *J. Clin. Invest.* 49: 557–67, 1970.
362. **Turnheim K, Frizzell RA, Schultz SG.** Effects of anions on amiloride-sensitive, active sodium transport across rabbit colon, in vitro. Evidence for “trans-inhibition” of the Na entry mechanism. *J. Membr. Biol.* 37: 63–84, 1977.
363. **Uberall F, Giselbrecht S, Hellbert K, Fresser F, Bauer B, Gschwendt M, Grunicke HH, Baier G.** Conventional PKC-alpha, novel PKC-epsilon and PKC-theta, but not atypical PKC-lambda are MARCKS kinases in intact NIH 3T3 fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 272: 4072–8, 1997.
364. **Umar S, Sellin JH, Morris AP.** Murine colonic mucosa hyperproliferation. II. PKC-beta activation and cPKC-mediated cellular CFTR overexpression. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 278: G765–74, 2000.
365. **Umesaki Y, Yajima T, Yokokura T, Mutai M.** Effect of organic acid absorption on bicarbonate transport in rat colon. *Pflugers Arch.* 379: 43–7, 1979.
366. **Usui T, Hara M, Satoh H, Moriyama N, Kagaya H, Amano S, Oshika T, Ishii Y, Ibaraki N, Hara C, Kunimi M, Noiri E, Tsukamoto K, Inatomi J, Kawakami H, Endou H, Igarashi T, Goto A, Fujita T, Araie M, Seki G.** Molecular basis of ocular abnormalities associated with proximal renal tubular acidosis. *J. Clin. Invest.* 108: 107–15, 2001.
367. **Vanderheyden V, Devogelaere B, Missiaen L, De Smedt H, Bultynck G, Parys JB.** Regulation of inositol 1,4,5-trisphosphate-induced Ca²⁺ release by reversible phosphorylation and dephosphorylation. *Biochim. Biophys. Acta* 1793: 959–70, 2009.
368. **Vanhaesebroeck B, Alessi DR.** The PI3K-PDK1 connection: more than just a road to PKB. *Biochem. J.* 346 Pt 3: 561–576, 2000.
369. **Vermassen E, Fissore RA, Nadif Kasri N, Vanderheyden V, Callewaert G, Missiaen L, Parys JB, De Smedt H.** Regulation of the phosphorylation of the inositol 1,4,5-trisphosphate receptor by protein kinase C. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319: 888–93, 2004.
370. **Vetrano S, Rescigno M, Cera MR, Correale C, Rumio C, Doni A, Fantini M, Sturm A, Borroni E, Repici A, Locati M, Malesci A, Dejana E, Danese S.** Unique role of junctional adhesion molecule-a in maintaining mucosal homeostasis in inflammatory bowel disease. *Gastroenterology* 135: 173–84, 2008.

371. **Vidyasagar S, Barmeyer C, Geibel J, Binder HJ, Rajendran VM.** Role of short-chain fatty acids in colonic HCO₃ secretion. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288: 1217–1226, 2005.
372. **Vidyasagar S, Rajendran VM, Binder HJ.** Three distinct mechanisms of HCO₃⁻ secretion in rat distal colon. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 287: C612–21, 2004.
373. **Vina-Vilaseca A, Bender-Sigel J, Sorkina T, Closs EI, Sorkin A.** Protein kinase C-dependent ubiquitination and clathrin-mediated endocytosis of the cationic amino acid transporter CAT-1. *J. Biol. Chem.* 286: 8697–706, 2011.
374. **Wald FA, Oriolo AS, Mashukova A, Fregien NL, Langshaw AH, Salas PJ.** Atypical Protein Kinase C (iota) mediates local ezrin activation in the apical domain of intestinal epithelial cells. *J. Cell Sci.* 121: 644–654, 2008.
375. **Waldron RT, Innamorati G, Torres-Marquez ME, Sinnott-Smith J, Rozengurt E.** Differential PKC-dependent and -independent PKD activation by G protein α subunits of the Gq family: selective stimulation of PKD Ser⁷⁴⁸ autophosphorylation by G α q. *Cell. Signal.* 24: 914–21, 2012.
376. **Waldron RT, Rey O, Iglesias T, Tugal T, Cantrell D, Rozengurt E.** Activation loop Ser744 and Ser748 in protein kinase D are transphosphorylated in vivo. *J. Biol. Chem.* 276: 32606–15, 2001.
377. **Walker NM, Flagella M, Gawenis LR, Shull GE, Clarke LL.** An alternate pathway of cAMP-stimulated Cl⁻ secretion across the NKCC1-null murine duodenum. *Gastroenterology* 123: 531–541, 2002.
378. **Wang B, Means CK, Yang Y, Mamonova T, Bisello A, Altschuler DL, Scott JD, Friedman PA.** Ezrin-anchored protein kinase A coordinates phosphorylation-dependent disassembly of a NHERF1 ternary complex to regulate hormone-sensitive phosphate transport. *J. Biol. Chem.* 287: 24148–63, 2012.
379. **Wang L, Harris TE, Roth RA, Lawrence JC.** PRAS40 regulates mTORC1 kinase activity by functioning as a direct inhibitor of substrate binding. *J. Biol. Chem.* 282: 20036–44, 2007.
380. **Wang Z, Petrovic S, Mann E, Soleimani M.** Identification of an apical Cl^{(-)/HCO₃(-)} exchanger in the small intestine. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 282: G573–9, 2002.
381. **Wang Z, Wang T, Petrovic S, Tuo B, Riederer B, Barone S, Lorenz JN, Seidler U, Aronson PS, Soleimani M.** Renal and intestinal transport defects in Slc26a6-null mice. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 288: C957–65, 2005.
382. **Warth R, Riedemann N, Bleich M, Van Driessche W, Busch AE, Greger R.** The cAMP-regulated and 293B-inhibited K⁺ conductance of rat colonic crypt base cells. *Pflügers Arch.* 432: 81–88, 1996.
383. **Wedenoja S, Pekansaari E, Höglund P, Mäkelä S, Holmberg C, Kere J.** Update on SLC26A3 mutations in congenital chloride diarrhea. *Hum. Mutat.* 32: 715–22, 2011.
384. **Weikel CS, Sando JJ, Guerrant RL.** Stimulation of porcine jejunal ion secretion in vivo by protein kinase-C activators. *J. Clin. Invest.* 76: 2430–5, 1985.

385. **Weinman EJ, Steplock D, Wang Y, Shenolikar S.** Characterization of a protein cofactor that mediates protein kinase A regulation of the renal brush border membrane Na(+)-H+ exchanger. *J. Clin. Invest.* 95: 2143–9, 1995.
386. **Welsh MJ, Smith PL, Fromm M, Frizzell RA.** Crypts are the site of intestinal fluid and electrolyte secretion. *Science (80-).* 218: 1219–1221, 1982.
387. **Welsh MJ.** Electrolyte transport by airway epithelia. *Physiol. Rev.* 67: 1143–84, 1987.
388. **Wettschureck N, Offermanns S.** Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiol. Rev.* 85: 1159–204, 2005.
389. **Williams RL, Katan M.** Structural views of phosphoinositide-specific phospholipase C: signalling the way ahead. *Structure* 4: 1387–94, 1996.
390. **Winpenny JP, McAlroy HL, Gray MA, Argent BE.** Protein kinase C regulates the magnitude and stability of CFTR currents in pancreatic duct cells. *Am. J. Physiol.* 268: C823–8, 1995.
391. **Wu L-G, Hamid E, Shin W, Chiang H-C.** Exocytosis and endocytosis: modes, functions, and coupling mechanisms. *Annu. Rev. Physiol.* 76: 301–331, 2014.
392. **Wymann MP, Pirola L.** Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 127–50, 1998.
393. **Xia W, Yu Q, Riederer B, Singh AK, Engelhardt R, Yeruva S, Song P, Tian D-A, Soleiman M, Seidler U.** The distinct roles of anion transporters Slc26a3 (DRA) and Slc26a6 (PAT-1) in fluid and electrolyte absorption in the murine small intestine. *Pflugers Arch.* 466: 1541–56, 2014.
394. **Xiao F, Juric M, Li J, Riederer B, Yeruva S, Singh AK, Zheng L, Glage S, Kollias G, Dudeja P, Tian D-A, Xu G, Zhu J, Bachmann O, Seidler U.** Loss of downregulated in adenoma (DRA) impairs mucosal HCO₃⁻ secretion in murine ileocolonic inflammation. *Inflamm. Bowel Dis.* 18: 101–11, 2012.
395. **Xiao F, Li J, Singh AK, Riederer B, Wang J, Sultan A, Park H, Lee MG, Lamprecht G, Scholte BJ, De Jonge HR, Seidler U.** Rescue of epithelial HCO₃⁻ secretion in murine intestine by apical membrane expression of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mutant F508del. *J. Physiol.* 590: 5317–5334, 2012.
396. **Xiao F, Yu Q, Li J, Johansson ME V, Singh AK, Xia W, Riederer B, Engelhardt R, Montrose M, Soleimani M, Tian DA, Xu G, Hansson GC, Seidler U.** Slc26a3 deficiency is associated with loss of colonic HCO₃⁻ secretion, absence of a firm mucus layer and barrier impairment in mice. *Acta Physiol.* 211: 161–175, 2014.
397. **Xue H, Tian YM, Yan M, Yang N, Chen X, Xing Y, Zhu JX.** Appearance of segmental discrepancy of anion transport in rat distal colon. *Biol. Pharm. Bull.* 30: 1407–11, 2007.
398. **Yamada H, Yamazaki S, Moriyama N, Hara C, Horita S, Enomoto Y, Kudo A, Kawakami H, Tanaka Y, Fujita T, Seki G.** Localization of NBC-1 variants in human kidney and renal cell carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310: 1213–1218, 2003.

399. **Yang D, Li Q, So I, Huang C-L, Ando H, Mizutani A, Seki G, Mikoshiba K, Thomas PJ, Muallem S.** IRBIT governs epithelial secretion in mice by antagonizing the WNK/SPAK kinase pathway. *J. Clin. Invest.* 121: 956–965, 2011.
400. **Yang D, Shcheynikov N, Zeng W, Ohana E, So I, Ando H, Mizutani A, Mikoshiba K, Muallem S.** IRBIT coordinates epithelial fluid and HCO₃⁻ secretion by stimulating the transporters pNBC1 and CFTR in the murine pancreatic duct. *J. Clin. Invest.* 119: 193–202, 2009.
401. **Yang H, Rudge DG, Koos JD, Vaidialingam B, Yang HJ, Pavletich NP.** mTOR kinase structure, mechanism and regulation. *Nature* 497: 217–23, 2013.
402. **Yau WM, Makhlof GM.** Comparison of transport mechanisms in isolated ascending and descending rat colon. *Am. J. Physiol.* 228: 191–195, 1975.
403. **Young SH, Rey O, Sinnott-Smith J, Rozengurt E.** Intracellular Ca²⁺ oscillations generated via the Ca²⁺-sensing receptor are mediated by negative feedback by PKC α at Thr888. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 306: C298–306, 2014.
404. **Yu H, Riederer B, Stieger N, Boron WF, Shull GE, Manns MP, Seidler UE, Bachmann O.** Secretagogue stimulation enhances NBCe1 (electrogenic Na⁺/HCO₃⁻ cotransporter) surface expression in murine colonic crypts. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297: G1223–G1231, 2009.
405. **Zachos NC, Lee LJ, Kovbasnjuk O, Li X, Donowitz M.** PLC- γ directly binds activated c-Src, which is necessary for carbachol-mediated inhibition of NHE3 activity in Caco-2/BBe cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 305: C266–C275, 2013.
406. **Zachos NC, Tse M, Donowitz M.** Molecular physiology of intestinal Na⁺/H⁺ exchange. *Annu. Rev. Physiol.* 67: 411–443, 2005.
407. **Zeissig S, Bergann T, Fromm A, Bojarski C, Heller F, Guenther U, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J-D.** Altered ENaC expression leads to impaired sodium absorption in the noninflamed intestine in Crohn's disease. *Gastroenterology* 134: 1436–1447, 2008.
408. **Zeissig S, Bürgel N, Günzel D, Richter J, Mankertz J, Wahnschaffe U, Kroesen AJ, Zeitz M, Fromm M, Schulzke J-D.** Changes in expression and distribution of claudin 2, 5 and 8 lead to discontinuous tight junctions and barrier dysfunction in active Crohn's disease. *Gut* 56: 61–72, 2007.
409. **Zhang GH, Zhu JX, Xue H, Fan J, Chen X, Tsang LL, Chung YW, Xing Y, Chan HC.** Dopamine stimulates Cl⁻ absorption coupled with HCO₃⁻ secretion in rat late distal colon. *Eur. J. Pharmacol.* 570: 188–195, 2007.
410. **Zhang Q, Suh W, Pan Z, You G.** Short-term and long-term effects of protein kinase C on the trafficking and stability of human organic anion transporter 3. *Int. J. Biochem. Mol. Biol.* 3: 242–9, 2012.
411. **Zhang Y, Gao X, Saucedo LJ, Ru B, Edgar BA, Pan D.** Rheb is a direct target of the tuberous sclerosis tumour suppressor proteins. *Nat. Cell Biol.* 5: 578–81, 2003.
412. **Zhang Y, Nicholatos J, Dreier JR, Ricoult SJH, Widenmaier SB, Hotamisligil GS, Kwiatkowski DJ, Manning BD.** Coordinated regulation of protein synthesis and degradation by mTORC1. *Nature* 513: 440–443, 2014.

413. **Ziegler WH, Parekh DB, Le Good J a, Whelan RD, Kelly JJ, Frech M, Hemmings B a, Parker PJ.** Rapamycin-sensitive phosphorylation of PKC on a carboxy-terminal site by an atypical PKC complex. *Curr. Biol.* 9: 522–529, 1999.

Anhang A Material

Geräte

Ag/AgCl Elektroden EP05	World Precision Instruments, Inc., Berlin, Germany
Automatic temperature controller TC-344B	Warner Instruments, Hamden, CT, USA
Binokular Leica wild M32	Zeiss, Germany
Einschweißgerät ES 3001	GEHO Pack Service GmbH, Germany
Elektrophorese Kammer	Bio-Rad, Germany
Feinwaage Kern ABS	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Germany
Fine Science Tool Dumont # 7, Vannas Scissors	World Precision Instruments, Inc., Berlin, Germany
Fine Science Tool No 11051-0	World Precision Instruments, Inc., Berlin, Germany
GeneAmp PCR System 2400	Applied Biosystems GmbH, Germany
Heizbad Typ 1002	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Germany
Heizrührer MR 3001 K	Heidolph Instruments, Germany
Kamera Coolsnap ES	Roper Scientific, Ottobrunn, Germany

Mikroskop Zeiss Axiovert 200	Visitron Systems, Germany
Mini Trans-Blot Cell	Bio-Rad, Germany
pH Meter PHM92	Radiometer Copenhagen, DK
PowerPac Basic für Elektrophoresekammer	Bio-Rad, Germany
Protein transfer membrane Amersham Hybond-P	GE Healthcare, Germany
Reagenzglasschüttler IKA Vortex	Omnilab, Germany
Reagenzglasschüttler Promax 1020	Heidolph Instruments, Germany
Roller mixer SRT9D	Bibby Scientific Limited, UK
Rotilabor Silikonschlauch 3 mm	ROTH, Germany
Schüttler Roto-Shake Genie Model SI-S 1102	Scientific Industries, USA
Thermomixer 5437	Eppendorf, Germany
Thermomixer comfort	Eppendorf, Germany
TIM 854 Titration Manager	Radiometer Analytical, Hach Lange, Germany
Tischstativ STH 650	Omnilab, Germany
Tissue Lyser LT	Quiagen, Germany
Tragbares pH Meter pH 330i	WTW GmbH, Germany
Umwälzpumpe Pump P-1	Pharmacia Biotech, UK
Visichrome High Speed Polychromator System	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany

Visichrome Lamp Power Supply	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany
Visichrome Power Module	Visitron Systems GmbH, Puchheim, Germany
Vortex Mixer Model 7-2020	Neolab, Germany
Waage Kern 572-35	Gottl. Kern & Sohn GmbH, Germany
Wasserbad Model ED-5	Julabo Labortechnik GmbH, Seelbach, Germany
Zentrifuge 5415 D	Eppendorf, Germany
Zentrifuge Centrifuge MC 6	Sarstedt, Germany
Zentrifuge Hermle Z 233 M-Z	Hermle Labortechnik, Germany
Zentrifuge universal 16R	Hettich Zentrifugen, Germany
Verbrauchsmaterial	
Amersham ECL Western	GE Healthcare, Germany
Blotting Detection Reagent	
Amersham Hyperfilm ECL	GE Healthcare, Germany
DAPI 32670	Invitrogen
DMA	Sigma Aldrich
DNA-Exitus-Plus	Applichem
Einwegspritzen 1 / 2 / 10 ml	Braun

Eppi Caps 0,5 / 1,5 / 2 ml	Eppendorf
Falcon-Tube 50 / 15ml	Sarstedt
Gummiringe Ø 0,625 cm ²	Zentrale Forschungswerkstätten, MHH
Latex Handschuhe, Labortücher	Kimberly-Clarke
Menzel Deckgläser 24 x 32mm	Menzel Gläser
Menzel Gläser Superfrost Plus	Thermo Scientific
NeutrAvidin Agarose Resin	Thermo Scientific, Germany
Nigericin Natrium Salz	Applichem
Page Ruler	Fermentas
pH Elektrode PHC 3006-9 Lange, Germany	Radiometer Analytical, Hach
Pipettenspitzen 1µl, 10 µl, 100 µl, 1 ml, 5 ml	Sarstedt, Eppendorf, ROTH
Polycarbonate Membrane 3,0 µm, 25 mm	GE Water & Process Technologies
RNA-Later	Sigma
Serologische Pipetten 1 / 5 / 10 / 20 ml	Sarstedt
Taq DNA Polymerase	Quiagen
Tube 14 ml	Grainer bio-one
Bariumhydroxid	Merck
Bovine-serum-albumin (BSA)	Sigma Aldrich
Bromphenolblau	Sigma Aldrich

Ca-Glukonat	Applichem
Chemikalien	
DMA	Sigma Aldrich
DTT	Applichem
EDTA	Applichem
Essigsäure 100%	ROTH
Ethanol 100%	J.T. Baker
Forskolin	Sigma Aldrich
Glukose	Applichem
Glycin	Applichem
Gö 6850 / Gö 6976	Calbiochem
HEPES	Applichem
Histoacryl	Braun
IUPAC Pufferlösung pH 4,0 / 7,0	Hach Lange
K_2HPO_4	Merck
KCl	Applichem
KCl.Ag-30	Hach Lange
K-Glukonat	Applichem
KH_2PO_4	Merck
Methanol 100%	ROTH
$MgCl_2$ -Hexahydrat	Applichem

MgSO ₄ Heptahydrat	Applichem
NaCl	Applichem
NaHCO ₃ ⁻	Sigma Aldrich
Na-Pyruvat	Sigma Aldrich
Salzsäure 100% / 25%	ROTH
SDS	ROTH
S1611	Sanofi-Aventis Deutschland GmbH
Tetrodotoxin	ToCRIS Bioscience
TMA-Cl	Applichem
TRIS HCL pH 6,8	Ultra Pure
TRIS	Applichem
Tween 20	Sigma Aldrich
β-Mercaptoethanol	Applichem

Anhang B Puffer und Lösungen

Lösungen für die Fluorometrie

Tabelle 1: Verwendete Puffer für die Fluorometrie. Die Osmolarität aller Lösungen betrug 290-300 mOsm/l bei einem pH von 7,4. TMA: Tetramethylammonium, HEPES: (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), TRIS: Tris(hydroxymethyl)-aminomethane, BSA: Bovine serum albumin. Konzentrationsangaben in mM/l.

	EDTA Puffer	Puffer A	Puffer B	Puffer C	Puffer C
NaCl	127	120	100	60	0
Na-HCO ₃ ⁻	0	0	20	20	0
Choline-HCO ₃ ⁻	0	0	0	0	20
NH ₄ Cl	0	0	0	40	0
TMA-Cl	0	0	0	0	100
HEPES	10	14	14	14	14
TRIS	0	7	7	7	7
KH ₂ PO ₄	0	3	3	3	3
K ₂ HPO ₄	0	2	2	2	2
MgSO ₄	0	1,2	1,2	1,2	1,2
Ca ²⁺ -gluconate	0	1,2	1,2	1,2	1,2
Glukose	5	20	20	20	20
KCl	5	0	0	0	0
MgCl ₂	1	0	0	0	0
Natrium-Pyruvat	5	0	0	0	0
EDTA	5	0	0	0	0
BSA	1%	0	0	0	0
Begast mit	100% O ₂	100% O ₂	95% O ₂ /5% CO ₂	95% O ₂ /5% CO ₂	95% O ₂ /5% CO ₂

Lösungen für die Immunhistochemie

Tabelle 2: Verwendete Antikörper für die Immunhistochemie.

Antikörper	Quelle
Rabbit anti-NBCe1 (K1A)	Walter Boron
Rabbit anti-PKC α (C-20): sc-208	Santa Cruz Biotechnology, inc.
PKC α Blocking Peptide (C-20): sc-208 P	Santa Cruz Biotechnology, inc.
Mouse anti-PKC δ (G-9): sc-8402	Santa Cruz Biotechnology, inc.
PKC δ Blocking Peptide (G-9): sc-8402 P	Santa Cruz Biotechnology, inc.
Rabbit anti-PKC ϵ (C-15): sc-214	Santa Cruz Biotechnology, inc.
Alexa Fluor 488 goat anti rabbit	Invitrogen
Alexa Fluor 488 goat anti mouse	Invitrogen
Anti- β -Actin / Anti-Villin	Abcam

Lösungen für die Oberflächenbiotinylierung

Tabelle 3: Verwendete Puffer für die Oberflächenbiotinylierung. Der N⁺ Puffer enthielt zusätzlich folgende Protease-Inhibitoren: Leupeptin (40µg/ml), Pepstatin A (20µg/ml), DTT (1mM), Benzamidin (4mM), Antipain (10µg/ml). Konzentrationsangaben in M/l.

	Borat Puffer	Quenching Puffer	N ⁺ Puffer	Sample Puffer	Blot Puffer	Running Puffer
NaCl	0,154 (154mM)	0,12 (120mM)	0,154 (154mM)			
borate	0,010 (10mM)					
KCl	0,0072 (7,2mM)		0,003 (3mM)			
CaCl ₂	0,0018 (1,8mM)	0,00108 (1,08mM)				
TRIS		0,025 (25mM)			0,048 (48mM)	0,025 (25mM)
TRIS pH 6,8				1,5		
HEPES			0,06 (60mM)			
Na ₃ EDTA			0,005 (5mM)			
EGTA			0,005 (5mM)			
SDS			0,1%	12%	10%	0,1%
Triton X-100			1%			
Glycerin				60%		
Glycin					0,039 (39mM)	0,25 (250mM)
Bromphenolblau				0,06%		
Methanol					20%	

Anhang C Methoden

Präparation muriner Kolonkrypten

Nach Narkose der Maus mit CO₂ und folgender zervikaler Dislokation wurde ein 4-5 cm langes Stück des proximalen Kolon herausgeschnitten, invertiert und mit auf 37°C vorgewärmter und 100% O₂ begaster EDTA-Pufferlösung gefüllt. Das so präparierte Gewebestück wurde in einem 10 ml Falcon-Tube, das ebenfalls EDTA-Pufferlösung enthielt, für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Durch leichtes Schwenken wurden anschließend die Krypten separiert und jeweils 1 ml der Kryptensuspension in Eppendorf-Caps überführt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die EDTA-Pufferlösung durch eiskalten Puffer (Fluorometrie: Puffer A, Oberflächenbiotinylierung: Puffer B) ersetzt, die Krypten resuspendiert und für die weitere Verwendung auf Eis gelegt.

Oberflächenbiotinylierung

Murine Kolonkrypten wurden wie oben beschrieben isoliert und in Puffer B bei 37°C mit den Sekretagoga Forskolin, Carbachol und PMA für 20 Minuten inkubiert. Anschließend wurden die Krypten zweimal mit eiskaltem PBS (enthält 0,1 mM CaCl₂ und 0,1 mM MgCl₂) und einmal mit Borate Puffer (154 mM NaCl, 10 mM borate, 7,2 mM KCl und 1,8 mM CaCl₂, pH 9,0) gewaschen. Es folgte eine 30-minütige Inkubation mit Biotinylierungspuffer (1 mg sulfosuccinimidyl-2-(biotinamido)ethyl-1,3-dithiopropionate (Sulfo-NHS-SS-Biotin; Pierce Biotechnology, Rockford, IL) in Borate Puffer) auf Eis, wobei der Puffer nach 15 Minuten durch frischen ersetzt worden ist. Nach der Biotinylierung wurde die Integrität der Krypten mit Trypan blau getestet und die verbleibenden Krypten mit eiskaltem Quenching Puffer (25 mM TRIS, 120 mM NaCl und 1,08 mM CaCl₂, pH 7,4) gewaschen. Nach zwei Waschschrinen mit eiskaltem PBS erfolgte eine 5-minütigen Lyse durch Inkubation der Krypten in N⁺ Puffer (60 mM HEPES, 154 mM NaCl, 3 mM KCl, 5 mM Na₃EDTA und 3 mM EGTA, pH 7,4) mit 0,1% SDS, 1% Triton X-100, 40 µg/ml

Phenylmethylsulfonylfluorid, 20 µg/ml Leupeptin, 20 µg/ml Pepstatin A, 20 µg/ml Antipain, 1 mM DTT und 4 mM Benzamidin bei 4°C auf einem Orbital Schüttler (Eppendorf, Hamburg, Germany). Nach Zentrifugation bei 10.000g für 10 Minuten wurden 50µl des Überstandes als Lysat-Fraktion abgenommen und der Rest zweimal mit jeweils 200µl Streptavidin Beads (NeutrAvidin, Pierce) für jeweils eine Stunde inkubiert, um eine optimale Biotinylierung des NBCe1 zu erreichen. Nachfolgend wurden die Beads durch eine zweiminütige Zentrifugation bei 2500g von dem Überstand getrennt, dreimal kurz mit N⁺ Puffer gewaschen und über Nacht bei -80°C eingefroren. Für die Vorbereitung der Beads-Fraktion für das Immunoblotting wurden diese in 200 µl Sample Puffer für 5 Minuten auf 95°C erhitzt und geschüttelt, damit sich die Beads ablösen. Für die Separation der Proteine von den Beads erfolgte eine 5-minütige Zentrifugation bei 500 rpm. Der Überstand der beiden Beads-Fraktionen wurde anschließend zusammengeführt.

Vorbereitung des Sammel- und Trenngels

Die Auftrennung der gewonnenen Proteine erfolgte auf 10% Acrylamid Sammel- bzw. Trenngelen, die mit Hilfe von Gelkammern (Bio-Rad, Germany) zwischen zwei Glasplatten gegossen wurden. Für das Trenngel wurden 7,9 ml H₂O, 6,7 ml 30 prozentiges Acrylamid, 5 ml 1,5 M TRIS-HCL pH 8,8, 0,2 ml 10% SDS und 0,2 ml 10% Ammoniumpersulfat gemischt und durch die Zugabe von 8µl TEMED polymerisiert, woraufhin das Trenngel schnell in die Gelkammer pipettiert wurde. Um ein Austrocknen des Trenngels während der weiteren Schritte zu verhindern, wurde das gegossene, auspolymerisierte Trenngel mit 100% Isopropanol überschichtet. Anschließend wurde das Sammelgel mit folgender Zusammensetzung vorbereitet: 4,1 ml H₂O, 1 ml 30% Acrylamid, 0,75 ml 1M TRIS-HCL pH 6,8, 60 µl 10% SDS, 60 µl 10% Ammoniumpersulfat und 6 µl TEMED. Die Isopropanolschicht des Trenngels wurde durch Spülen mit Wasser entfernt. Nach der Zugabe von TEMED wurde das Sammelgel mit einer Pipette auf das Trenngel aufgetragen und der Kamm

für die 10 Probestaschen vorsichtig in das noch flüssige Sammelgel gedrückt. Nach Polymerisation des Sammelgels wurde der Kamm entfernt und das fertige Gel mit H₂O überschichtet. Vor Beginn der Elektrophorese wurden die Gele in die Elektrophoresekammer (Bio-Rad, Germany) gebracht und mit Running Puffer bedeckt.

Vor der Auftrennung der Proteine wurden 5 µl der Lysat-Fraktion mit 20 µl H₂O und 25 µl Sample Puffer gemischt, die Beads-Fraktion 1:1 mit Sample Puffer versetzt und alle Proben für 10 Minuten bei 37°C inkubiert, damit die Proteine während der Elektrophorese besser durch die Gelmatrix laufen. Anschließend wurden 5 µl der Lysat-Fraktionen und 50 µl der Beads-Fraktionen in die Taschen des Sammelgels pipettiert. In die beiden äußeren Taschen des Gels wurden 5 µl Bandenmarker gegeben, damit die molekulare Größe der enthaltenen Proteine durch die folgende Auftrennung bestimmt werden konnte.

Bei der anschließenden denaturierenden Gelelektrophorese dissoziieren die aufgetragenen Proteine in ihre Untereinheiten und das Detergenz SDS bildet einen negativ geladenen Proteinkomplex mit den Proteinmolekülen, wodurch die in der Probe enthaltenen Proteine entsprechend ihrer molekularen Größe aufgrund der angelegten Spannung durch das Polyacrylamidgel in Richtung der Anode wandern und so aufgetrennt werden können. Vorerst erfolgte die Elektrophorese mit einer angelegten Spannung von 70 Volt für ca. 25 Minuten, bis die Proteinbanden das Sammelgel durchlaufen hatten, woraufhin die Auftrennung mit 100 Volt für eine Stunde vorgesetzt wurde. Weil die angelegte Spannung den verwendeten Running Puffer stark erwärmte, wurde die gesamte Elektrophorese bei 4°C im Kühlraum durchgeführt.

Immunoblotting

Nach der Auftrennung der Proteine wurden diese durch eine weitere Elektrophorese horizontal auf eine Nitrozellulose-Membran (Amersham Hybond, GE Healthcare, Germany) transferiert, die zuvor mit Methanol aktiviert worden ist. Hierfür wurden das Trenngel und die Nitrozellulose-Membran mit

folgender Anordnung in einer Kunststoffarretierung fixiert: Schwamm / 3 Filterpapiere / Gel / Membran / 3 Filterpapiere / Schwamm. Die Halterung wurde in die Blottingkammer gestellt, mit Blotpuffer bedeckt und der Proteintransfer bei 150mA für 1,75 Stunden bei 4°C auf einem Magnetrührer durchgeführt. Anschließend wurde die Membran zweimal für 5 Minuten in PBS (+ 0,1% Tween 20) gewaschen, für eine Stunde mit 5% Milchpulverlösung (in PBST) bei Raumtemperatur blockiert und erneut zweimal für 5 Minuten in PBST gewaschen. Für die Inkubation mit dem primären Antikörper rabbit anti NBCe1 (K1A, Konzentration 1:500 in PBST) wurde die Membran in Plastikfolie eingeschweißt und auf einem Schüttler (Roto-Shake Genie, Model SI-S 1102, Scientific Industries, USA) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die überschüssige Antikörperlösung wurde durch Waschen in PBST (6 x 5 Minuten) entfernt und mit dem sekundären Antikörper (goat anti-rabbit IgG konjugiert mit Horseradish Peroxidase, KPL, Gaithersburg, MD, USA, Verdünnung 1:10.000 in PBST) für eine Stunde bei Raumtemperatur bei völliger Dunkelheit inkubiert. Nach sechs weiteren Waschschritten für jeweils fünf Minuten in PBST folgte die Inkubation der Membran für eine Minute in Entwicklungslösung (Amersham ECL Western Blotting detection Reagent, GE Healthcare, Germany) in einer Dunkelkammer. Nach Abtupfen der Entwicklungslösung wurde die Membran auf ein gleich großes Stück Filmfolie (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare, Germany) gelegt, für eine Minute in einer lichtundurchlässigen Kassette belassen und der Antigen-Antikörper-Komplex mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht.

Für die Quantifizierung des biotinylierten NBCe1 in der Beads- und Membranfraktion wurden nur Experimente herangezogen, in denen die Summe der beiden Beadsfraktionen und des Überstandes einen prozentualen Anteil des Lysates von 85 – 115% betrug. Um die Biotinylierung intrazellulärer Proteine zu bestimmen, wurden Anti-β-Aktin (1:15000 in PBST) und Anti-Villin (1:10000 in PBST) als Referenzproteine detektiert.

Immunhistochemie

Präparationen des proximalen Kolon von C57Bl/6 Mäusen wurden in Paraffin eingebettet, mit einem Mikrotom (Microm HM 335E Microtom, Walldorf, Germany) in 2 µm dicke Sektionen geschnitten und auf Objektträger aufgebracht. Die Schnitte wurden anschließend deparaffiniert (2 x 5 Minuten in 100% Xylol, 1 x 5 Minuten in 96% Ethanol (ETOH), 1 x 5 Minuten in 70% ETOH, 1 x 5 Minuten in 50% ETOH) und für 10 Minuten in H₂O gestellt. Um eine verbesserte Bindung der verwendeten Antikörper (AK) zu gewährleisten, wurden alle Schnitte in DAKO Target Retrieval Solution bei einem pH von 9 bei 96°C 20 Minuten lang gekocht. Nach einem Waschschrift von 5 x 4 Minuten in Phosphat buffered saline + 20% Tween 20 (PBST) erfolgte eine 6 stündige Inkubation mit 10% goat serum in PBST, um unspezifische AK-Bindungen zu vermeiden. Die Objektträger wurden anschließend mit den primären Antikörpern anti-PKC α, δ, ε (Verdünnung 1:100 in 5% goat serum in TBST) und anti-NBCe1 (K1A, Verdünnung 1:250 in 5% goat serum in TBST) für 24 Stunden bei 4°C inkubiert und nochmals 5 x 4 Minuten lang in PBST gewaschen, um ungebundene AK zu entfernen. Die Inkubation mit den sekundären AK (Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG und Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse, jeweils 1:1000 in 4',6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)-Lösung (1µg/ml in 5% goat oder donkey serum in PBS) verdünnt) erfolgte für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach einem letzten Waschschrift (5 x 4 Minuten in TBST) wurden die Objektträger mit DAKO Mountain Medium (Invitrogen) eingedeckelt und bei 4°C gelagert. Die optische Auswertung erfolgte mit einem Olympus BX 60 Mikroskop und einer Olympus CX 50 Kamera. Die Bildbearbeitung wurde mit der Software ImageJ (NIH, Bethesda, MD; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) durchgeführt.

Fluorometrie

Die Messung des intrazellulären pH wurde mit dem Fluoreszenzfarbstoff (2',7-Bis-(2-Carboxyethyl)-5-(and-6)-Carboxyfluorescein) BCECF Acetoxymethylester (AM) durchgeführt. Dieser gelangt durch Diffusion in die Zellen, wo Esterasen das Acetoxymethylester abspalten, wodurch der Farbstoff BCECF freigesetzt wird und vitale Zellen nicht verlassen kann. 1ml der isolierten Kryptensuspension wurde mit einer Konzentration von 10µM BCECF für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden ca. 30µl Kryptensuspension auf einen Glasobjektträger pipettiert und nach einer Minute so viel wie möglich von der Flüssigkeit abgesaugt. Die Krypten wurden anschließend mit einer Polykarbonatmembran (25mm Durchmesser, 3µm Porengröße, Osmonics, Minnetonka, MN) in einer spezialangefertigten Perfusionskammer (Zentrale Forschungswerkstätten der medizinischen Hochschule Hannover, Hannover, Germany) auf dem Glasobjektträger fixiert und auf einer beheizbaren Vorrichtung eines inversen, trinokularen Mikroskops (Zeiss Axiovert 200, Carl Zeiss, Jena, Germany) montiert. Die Perfusion der Kolonkrypten erfolgte mit auf 37°C vorgewärmten Lösungen, die mit Ausnahme der Kalibrationslösungen entweder mit 95% O₂ / 5% CO₂ oder 100% O₂ begast wurden. Über eine auf das Mikroskop aufgeschraubte Kamera (CoolSnap ES, Roper Scientific, Ottobrunn, Germany) wurden alle 2-10 Sekunden Bilder der Kolonkrypten während der abwechselnden Exzitation mit 440nm und 490nm Licht von einem Monochromator (Visichrome, Visitron Systems, Puchheim, Germany) mittels Metafluor Software (Universal Imaging, Downington, PA) digitalisiert. Die pH Kalibration von 6,6 und 7,4 erfolgte am Ende jedes Experiments mit der „high K⁺-nigericin“ Methode. Nigericin ist ein kanalbildendes Ionophor was dazu führte, dass der intrazelluläre pH der Kolonkrypten den pH der Perfusionslösung annimmt. Über den genau definierten pH der verwendeten Kalibrationslösungen konnte der pH während des gesamten Experimentes anhand der gespeicherten 440- 490-nm Ratio

berechnet werden. Im Vorfeld jedes Experimentes wurden hierfür mit Hilfe der Metafluor Software Regionen der Kolonkrypten markiert und deren pH-Veränderung nach Subtraktion des Hintergrundes gespeichert.

Nachdem die Perfusionskammer mit den fixierten Kolonkrypten auf dem Mikroskop montiert worden war, erfolgte eine ca. 10 minütige Equilibrationsphase während der Perfusion mit Na^+Cl^- . Dies sorgte für ein Auswaschen von überschüssigem BCECF-AM und einer Adaption der Kolonkrypten. Anschließend wurden die Krypten mit der „ammonium prepulse“ Technik azidifiziert, wobei nach der Equilibrationsphase für ca. 5 Minuten eine Perfusion mit Ammoniumchlorid (NH_4Cl^-) erfolgte. Durch die Aufnahme von Ammoniak (NH_3) in die Zellen erfolgte vorerst eine transiente Alkalisierung der Kolonkrypten durch die Bindung intrazellulärer Protonen an NH_3 , wodurch der Anteil von Hydroxidionen (OH^-) kurzzeitig steigt. Der folgende Wechsel auf die Perfusion mit ammoniumfreier Lösung bewirkte einen raschen Ausstrom von NH_3 , wobei Protonen intrazellulär freigesetzt werden, was zu einer raschen intrazellulären Ansäuerung der Kolonkrypten führte. Je nach Experiment wurde nach der Azidifikation mit NH_4Cl die Erholung des pH durch die Perfusion mit CO_2 oder O_2 begaster NaCl Lösung gemessen, die $700\mu\text{m}$ 5-(N, N-Dimethyl)amilorid (DMA) enthielt. DMA inhibiert die Na^+/H^+ Austauscher (NHE) und die Erholung des intrazellulären pH ist in Anwesenheit von CO_2 auf die Aktivität der $\text{Na}^+/\text{HCO}_3^-$ Kcotransporter NBCe1 zurück zu führen. In mit O_2 begaster Na^+Cl^- Lösung kann sich hingegen kein HCO_3^- innerhalb der Lösung bilden, woraufhin die Transportaktivität der NBCe1 durch die Abwesenheit von HCO_3^- blockiert ist.

Ussing Kammer

Die Methode der Ussing Kammer wurde von Hans H. Ussing entwickelt und ermöglicht die Messung des aktiven Ionentransports bei vitalen Epithelien. Sie besteht aus zwei Kammern, zwischen denen das Gewebe nach der Präparation zwischen zwei Plexiglashälften eingespannt wird. Die über Schläuche mit den

Plexiglashälften verbundenen Reservoirs repräsentieren die luminal, bzw. serosale Seite des Gewebes. Die Reservoirs bestehen aus Doppelwandgefäßen, die mit einem Wasserbad verbunden waren, wodurch die Temperatur der Ringerlösungen auf 37°C erwärmt wurde. Beide Kammern verfügten über eine separate Gaszufuhr, die serosal zu 95% aus O₂ und 5% CO₂ (Karbogen) und luminal aus 100% O₂ bestand. Durch die Begasung der Lösungen erfolgte eine stetige Zirkulation der Lösungen, wobei der entstehende hydrostatische Druck in beiden Kammerhälften gleich sein musste. Durch den Ionentransport über das Epithel entsteht ein transepitheliales Spannungspotential (V_t) das über Silberchlorid (AgCl) Elektroden, die auf beiden Seiten des Epithels über Kaliumchlorid (KCl) Agarbrücken mit der Ringerlösung verbunden waren, als Potentialdifferenz gemessen werden konnte. Über ein weiteres Elektrodenpaar, das so weit wie möglich vom Epithel entfernt angebracht wird, konnte ein Kurzschlussstrom (I_{sc}) appliziert werden (Amplitude 50µA; Impulsdauer 100ms), der die Potentialdifferenz über dem Gewebe kurzzeitig ausgeglichen hat, wodurch der transepitheliale Widerstand (R_t) mittels des Ohmschen Gesetz berechnet werden konnte. Der gemessene Kurzschlussstrom (I_{sc}) entspricht dem elektrogenen Ionentransport (= Summe der Ionenströme von I_{Na+} + I_{K+} + I_{Cl-} + I_{HCO₃-} - I_{K+}) und liegt bei Mäusen ca. bei -30µA/cm² (78). Der gemessene Stromfluss, die transepitheliale Potentialdifferenz, sowie der Widerstand des Gewebes wurde durch eine Voltage/Current Clamp (K. Mussler, Aachen, Germany) in Kombination mit einer computergestützten Software (Clamp, Version 9.10, K. Mussler, Aachen) angezeigt und aufgezeichnet. Bei der Aufzeichnung der Parameter im Messmodus „Open Circuit“ wurde die Potentialdifferenz nicht beeinflusst, sondern kontinuierlich gemessen. Mittels pH-Titration wurde innerhalb der Ussing Kammer die luminal HCO₃⁻-Sekretion des eingespannten Gewebes gemessen. Mittels einer pH-Elektrode konnte die luminal Alkalisierung der Kammerflüssigkeit registriert, durch Gegenditration von Schwefelsäure (H₂SO₄) ausgeglichen und dadurch der

luminale pH auf 7,4 gehalten werden. Der Kurzschlussstrom (I_{sc}) wurde durch den transepithelialen Gewebewiderstand (R_t) und die Potentialdifferenz (PD) berechnet, die alle 2 Minuten gemessen worden sind.

Präparation des proximalen Kolon

Nach Betäubung der Maus mit 100% CO_2 und folgender zervikaler Dislokation wurde das proximale Kolon (Länge ca. 2-3 cm) entfernt und sofort in eiskalte, mit O_2 begaste Ringerlösung gegeben. Das Entfernen der seromuskulären Schicht beschädigt die Submukosa und führt zur Prostaglandinsynthese, was die intrazelluläre Freisetzung von cAMP und Ca^{2+} stimulieren und die Messungen beeinflussen kann. Die verwendete Ringerlösung für die Präparation enthielt deshalb $1\mu M$ Indometacin, was als Cyclooxygenasehemmer den initiierenden Schritt der Prostaglandinsynthese inhibiert. Mit Hilfe eines Stereomikroskops wurde das Segment längs aufgeschnitten und mit der mukosalen Seite nach unten aufgespannt. Während der folgenden Dissektion der seromuskulären Schicht erfolgte eine stetige Kühlung mit Eis. Nachdem die seromuskulären Schichten entfernt worden sind, wurde das Gewebestück um Quetschungen zu vermeiden mit Gewebekleber (Tissuetek) auf einem Gummiring (Durchmesser 0,528cm) fixiert und zwischen zwei Plexiglaskammern in der Ussing Kammer eingespannt.

Messung der HCO_3^- -Sekretion unter Cl^- -freien Bedingungen

Die luminale Seite des eingespannten proximalen Kolon wurde vorerst mit 154 mM Na^+Cl^- -Lösung, begast mit 100% O_2 , und die serosale Seite des Gewebes mit modifizierter Ringerlösung ([mM] 108 NaCl, 25 $NaHCO_3$, 3 KCL, 1,3 $MgSO_4$, 2 $CaCl_2$, 2,25 $KH_2PO_4^-$, 8,9 Glukose, 10 Natriumpyruvat), begast mit Karbogen (95% O_2 / 5% CO_2), umspült. Um den Einfluss verbleibender Neurone auf das Messergebnis zu eliminieren und die Epithelintegrität zu erhalten, enthielt die serosale Lösung 10^{-5} M Tetrodotoxin, 3×10^{-5} M Indomethacin und 10 mM Pyruvat. Nach einer 30-minütigen

Equilibrationsphase wurde die basale HCO_3^- Sekretion für 30 Minuten durch ein pH-stat System (Titramaster 85, Hach Lange, Germany) bei einem luminalen pH von 7,4 gemessen. Um die HCO_3^- -Sekretion unter Cl^- -freien Bedingungen in Anwesenheit des NHE3 Inhibitors S1611 zu messen, wurde nach der Bestimmung der basalen HCO_3^- -Sekretion die luminale 154 mM Na^+Cl^- -Lösung durch 154 mM Na^+ -Glukonat-Lösung ersetzt, mit 10 μM des NHE3 Inhibitors S1611 versetzt und nach einer 20 minütigen Equilibrationsphase die HCO_3^- -Sekretion erneut gemessen. Während des gesamten Versuchs wurde 2,5 mM Schwefelsäure (H_2SO_4) als Titrant verwendet.

Anhang D Regulation der PKC

Die Regulation resorptiver und sekretorischer Prozesse und der beteiligten Ionentransporter ist mannigfaltig und komplex. Sekundäre Botenstoffe, Phosphorylierungen, subzelluläre Umverteilung der Transporter, Regulation von Transkription bzw. Expression und die Regulation über Protein-Protein-Interaktionen sind mögliche Mechanismen (59, 139, 227, 228, 312). Die Regulation unterschiedlicher Isoformen der Protein Kinase C bietet ein enormes Potential der Modulation und wird wiederum durch verschiedene intrazelluläre Signalwege reguliert. Es ist größtenteils noch unklar, welche Signalkaskaden dabei beteiligt sind und ob diese additiv, gegenläufig oder synchron verlaufen. Weil die diversen Mechanismen der PKC-Phosphorylierung und Aktivierung den intestinalen Anionentransport über eine regulierte Funktion des NBCe1-B und anderer Transporter modulieren könnten, werden folgend die regulatorischen Funktionen beteiligter Proteine und Signalwege auf die Protein Kinase C und deren Einfluss auf relevante Signalwege ausführlich beschrieben.

Anhang D. 1. Enzymatische Aktivierung der PKC Isoformen

Für die initiale Aktivierung konventioneller, neuer und atypischer PKC Isoformen wird die Phosphorylierung eines Threonin- oder Serinrestes der C-terminalen Aktivierungsschleife durch PDK1 angenommen (24, 62, 72, 96, 130, 278). Alle PKC Isoformen können einen Komplex mit PDK1 bilden (130) und die Untersuchung von PDK1^{-/-} Zellen zeigte, dass PDK1 die Stabilität von konventionellen, neuen und atypischen PKC Isoformen reguliert (24). PDK1 gehört ebenfalls zur Familie der Protein Kinasen und besteht aus der N-terminalen Serin/Threonin Kinase Domäne und der C-terminalen Pleckstrin homology (PH) Domäne, welche eine hohe Affinität zu Phosphoinositiden aufweist (83, 242), weshalb der Bestandteil der Phospholipiddoppelschicht Phosphatidylinositol für eine Aktivierung der meisten PKC Isoformen wichtig ist. Neben der C-terminalen Phosphorylierung der Aktivierungsschleife sind

zwei weitere Phosphorylierungsstellen bei der Regulation der Aktivität von PKC Isoformen involviert (272). Das hydrophobe Motiv ist in der nicht katalytischen Region lokalisiert (272) und einige Kinasen enthalten als dritte Phosphorylierungsstelle das Turn Motiv, welches die Proteinkonformation stabilisiert, indem es das hydrophobe Motiv vor Dephosphorylierung schützt (149, 266, 413). Dabei formt die α C-Helix eine hydrophobe „Tasche“ die für die Interaktion der Aktivierungsschleife mit dem hydrophoben Motiv wichtig ist und ebenfalls die Konformation des Proteins stabilisiert (114). Für konventionelle und die neue PKC ϵ Isoform wird nach der Phosphorylierung durch PDK1 eine Autophosphorylierung der hydrophoben Region als möglicher Mechanismus angenommen, damit die Proteine aktiviert werden (37, 60, 96, 207, 255, 267, 352). Bei konventionellen und neuen PKC Isoformen wird angenommen, dass neben der Phosphorylierung der Aktivierungsschleife durch PDK1 zwei mammalian target of rapamicin Komplexe (mTORC1/2) für die Phosphorylierung des hydrophoben und des Turn Motiv verantwortlich sind (60, 165, 244, 266, 267, 303, 413). Eine mTOR-abhängige Phosphorylierung des Turn Motiv könnte die Autophosphorylierung des hydrophoben Motiv auslösen (256).

Die unterschiedlichen Phosphorylierungen aktivieren und stabilisieren die enzymatische Kinaseaktivität der PKC Isoformen. Damit die Kinasen ihre Zielproteine phosphorylieren können, reicht die Aktivierung und Stabilisierung allerdings nicht aus, da die PKC Isoformen durch die Bindung eines Pseudosubstrates bis zur Aktivierung durch Phospholipide inaktiv bleiben (158). Es wird vermutet, dass bei der Rekrutierung der neuen PKC Isoformen erst die Bindung von DAG oder Phorbol ester an der C1A/B-Domäne (54) das Pseudosubstrat freigibt (255, 256). Konventionelle PKC Isoformen benötigen für diese Konformationsänderung additional die Ca^{2+} -abhängige Bindung der C2-Domäne mit Membranphospholipiden (71, 89), damit die Freisetzung des Pseudosubstrates aus der Substrat-bindenden katalytischen Region erfolgt, was

die vollständige Aktivierung von PKC Isoformen verursacht (255, 341). Die Phosphorylierungen der Kinasen sind somit für die katalytische Kompetenz der Enzyme essentiell (96), aber erst die nachfolgende Bindung von DAG und/oder Ca^{2+} an der Membran aktiviert die Kinasen, weshalb dessen Translokation ebenfalls entscheidend ist (158, 179).

Anhang D. 2. Phosphorylierung der PKC durch mTOR

In den frühen 90er Jahren wurde eine Inhibition der Phosphorylierung und Aktivierung einiger Kinasen durch das Immunsuppressivum Rapamycin beobachtet (74, 282). Als Ursache wurde die durch Rapamycin inhibierte Funktion des mammalian target of rapamycin complex 1 (mTORC1) als Serin/Threonin Kinase hydrophober Proteinregionen nachgewiesen (146, 298). Der mTORC1 spielt bei der Regulation konventioneller und neuer PKC Isoformen als Kinase der hydrophoben Region eine wichtige Rolle, weil die Phosphorylierung der PKC α (Ser⁶⁵⁷), PKC δ (Ser⁶⁶²) und PKC ϵ (Ser⁷²⁹) Isoform Rapamycin-sensitiv ist (266, 413). Die Phosphorylierung von PKC δ (Ser⁶⁶²) war zudem von der atypischen PKC ζ Isoform abhängig (413). Die Phosphorylierung hydrophober Regionen erwies sich allerdings z.T. als nicht sensitiv gegenüber Rapamycin. Es wurde daraufhin gezeigt, dass ein Rapamycin-insensitiver mTOR Komplex 2, bestehend aus der dem mTORC1 fehlenden Rictor- und anderen Komponenten, existiert (303). Dieser mTORC2 phosphoryliert das hydrophobe und das Turn Motiv konventioneller PKC α (Thr⁶³⁸) und β II (Thr⁶⁴¹) Isoformen, der Protein Kinase B (PKB/Akt) (S⁴⁷³) (102, 165, 303) und reguliert das Aktin-Zytoskelett (245, 303). Es wurde gezeigt, dass mTORC2 jedoch ebenfalls PKC ϵ (S⁷²⁹) phosphoryliert und die PKC ϵ Isoform zugleich Bestandteil der mTORC2-Komponente Rictor ist (165, 243, 303, 304). Erstaunlicherweise führte ein Knockdown der essentiellen mTORC2 Komponente Rictor zu einer verringerten Phosphorylierung der PKC α , β I, β II und ϵ Isoform (165).

Anhang D. 3. Regulation und Interaktion der mTOR Komplexe

Der PI3K/PDK1-Signalweg reguliert neben der Aktivierung unterschiedlicher PKC Isoformen die Serin/Threonin Kinase Akt (Protein Kinase B; PKB), welche die Phosphorylierung (Ser²⁴⁴⁸) und Aktivierung des mTORC1 beeinflusst (164, 199, 254, 256). Für die maximale Aktivierung ist eine weitere Phosphorylierung von Akt notwendig, was durch mTORC2 PKC ϵ -abhängig erfolgt (165, 243, 303). Die Aktivität von mTORC1 wird durch Akt reguliert, indem Akt das proline-rich Akt/PKB Substrate 40kDa (PRAS40) phosphoryliert und dessen inhibierenden Effekt auf die Kinase-Domäne des mTORC1 aufhebt (143, 379). Okhrimenko et al. zeigten, dass auch die Expression von Akt von der PKC ϵ Isoform abhängig ist (261), die wiederum durch mTORC2 phosphoryliert und aktiviert wird (243). Neben der modulierten Kinaseaktivität des mTORC1 über PRAS40 reguliert Akt die Phosphorylierung des Tuberösen Sklerose Komplex 2 (TSC2), wodurch dessen inhibitorischer Effekt auf den mTORC1, aufgehoben wird (167, 213, 221, 411). Ein hereditärer Funktionsverlust des inhibitorischen TSC2 führt aufgrund einer Hyperaktivität des mTORC1 zu tuberöser Sklerose, potenziert die Ca²⁺-Freisetzung durch Ca²⁺-Kanäle des ER und ist mit der Kanzerogenese assoziiert (163, 232, 273).

In Lymphozyten wurde unter Basalbedingungen eine z.T. PKC-abhängige Phosphorylierung von Akt (Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸) beobachtet, die Stimulation mit PMA führte hingegen zu einer PKC β -spezifischen Phosphorylierung von Akt (Ser⁴⁷³/Thr³⁰⁸) (29). Die PKC β Isoform kann Akt zelltypabhängig direkt phosphorylieren (Ser⁴⁷³) und aktivieren (178). Carriere et al. zeigten die PMA/PKC β -induzierte Phosphorylierung der mTORC1-Komponente Raptor (58). In humanen Nierenzellen konnte die Aktivierung des mTORC1 durch PMA ebenfalls PKC-abhängig aber unabhängig von Akt erfolgen (111, 152). Die Regulation der PKC β Isoform spielt bei der Regulation der mTORC1-Aktivität eine wichtige Rolle, weil neueste Untersuchungen zeigen, dass eine anhaltende Aktivierung konventioneller PKC Isoformen den mTORC1-

Signalweg aktiviert und eine dysregulierte Überexpression von PKC β die Tumorgenese begünstigt (265).

Anhang D. 4. Interaktion der PKC mit Karboanhydrasen

Einen weiteren Modulationsmechanismus des HCO₃⁻-Transportes könnte die Interaktion von Bikarbonattransportern mit Karboanhydrasen (CA) darstellen. Neben der Expression von DRA ist die Expression der apikalen CA IV und der zytoplasmatischen CA I und CA II für den intestinalen Austausch von Cl⁻ und HCO₃⁻ im murinen Kolon wichtig (46, 108, 156). HCO₃⁻-Transporter können Komplexe mit CAs bilden, was als „Bikarbonat-Transportmetabolon“ bezeichnet wird und für den AE1, PAT1, NBCe1, NBCn1, jedoch nicht für DRA nachgewiesen worden ist (231). Es wurde gezeigt, dass PKC die Interaktion des Anionenaustauschers PAT1, der stark innerhalb des Dünndarms, aber nur geringfügig im Kolon exprimiert wird (45, 380, 381), mit der CA II inhibieren und die HCO₃⁻-Transportrate von PAT1 verringern kann (9). Dabei phosphoryliert PKC die Sulfate transporter and anti-sigma factor antagonist (STAS)-Domäne von PAT1, wodurch die CA II nicht mehr binden kann und ins Zytoplasma diffundiert. Dadurch wird die lokale HCO₃⁻-Konzentration in unmittelbarer Nähe von PAT1 verringert und dessen Transportrate gesenkt. Nahezu alle Mitglieder der SLC26 Familie verfügen über die STAS-Domäne (321), weshalb eine PKC-medierte Phosphorylierung auch andere lösliche Membranproteine regulieren könnte. Die NBCe1A-C Varianten besitzen ebenfalls zwei Abschnitte innerhalb ihrer Primärstruktur, die CA binden können (139). Mehrere Arbeiten mit Oozyten von Fröschen zeigten, dass die Transportkapazität des NBCe1 bei Koexpression mit einer katalytisch aktiven CA I, II und III erhöht war (8, 34, 308). Von Bachmann et al. wurde gezeigt, dass CAs bei der cholinergen Stimulation des NBCe1-B beteiligt sind (17). Die CA II hatte jedoch keinen Effekt auf den NBCe1-A (214). Die an der extrazellulären Oberfläche gebundene CA IV hat ebenfalls Einfluss auf den

Ionen- und Wassertransport, wird stark im Dickdarm von Nagetieren exprimiert (110) und schon frühe Untersuchungen zeigten, dass die Na^+Cl^- -Absorption bei Nagetieren sensitiv gegenüber dem CA-Inhibitor Acetazolamid ist (42). Es wurde zudem beobachtet, dass CO_2 die Na^+Cl^- -Absorption stimuliert, was ebenfalls durch die Inhibition der CA blockiert worden ist (42, 65, 84, 361). Vermutlich bildet die luminale CAIV aus den durch NHE3 und DRA exportierten Protonen und HCO_3^- Kohlensäure, die zu CO_2 und H_2O dissoziiert und von den Zellen aufgenommen wird. Das intrazelluläre CO_2 wird wiederum durch die CAII zu HCO_3^- und H^+ hydratisiert, über NHE3 und DRA sezerniert und stimuliert darüber die Na^+Cl^- -Absorption. Weil das extrazelluläre Bikarbonat durch die CAIV zu CO_2 und H_2O gespalten wird, sinkt die osmotische Konzentration im Darmlumen, was neben der Na^+Cl^- -Absorption die Wasseraufnahme in die Darmmucosa erleichtert. Wenige Arbeiten zeigten an murinen Zellen, dass auch die Bindung der extrazellulären CAIX an den NBCe1 dessen Aktivität erhöht (263) und die CAIX bei intestinaler Entzündung herunterreguliert ist (46). Des Weiteren wurde die murine duodenale HCO_3^- -Basalsekretion durch inhibierte CAs verringert (238) und die stimulierte HCO_3^- -Sekretion im Duodenum ist zum Teil von der CAII abhängig (206).

Anhang D. 5. Einfluss der PKC auf Ca^{2+} - und cAMP-Signalwege

Die Stimulation der Zelle mit Carbachol und Forskolin hat unterschiedliche Auswirkungen bei der Aktivierung der PKC. Allerdings sind die Signalkaskaden des Ca^{2+} -freisetzenden Sekretagoga Carbachol bzw. der cAMP-Generation durch Forskolin nicht voneinander getrennt und beteiligte Mechanismen sind z.T. wiederum PKC-abhängig, was die Untersuchung beider Botenstoffe bei der Regulation der PKC erschwert. Der Ca^{2+} /cAMP Signalweg aktiviert PKC Isoformen, die wiederum sowohl inhibitorische, als auch stimulierende Effekte auf die unterschiedlichen Adenylylcyclasen (AC) haben können (144). Shen et al. zeigten 2012, dass nach cholinergischer Stimulation M3-Rezeptor-abhängig

PKC-medierte Phosphorylierungen der AC2 erfolgen, diese aktivieren und den cAMP-Level erhöhen (325). Eine AC2-medierte cAMP-Generation wurde von derselben Arbeitsgruppe auch durch den PKC Aktivator PMA beobachtet und bei intestinalen Epithelzellen von Ratten wurde festgestellt, dass PMA eine Steigerung des intrazellulären Ca^{2+} -Levels verursachte, die durch den PKC δ -spezifischen Inhibitor Rottlerin abgeschwächt wurde (350). Die Freisetzung von Ca^{2+} aus dem ER aktiviert Ca^{2+} -Kanäle in der Plasmamembran, was den intrazellulären Ca^{2+} -Level zusätzlich steigert. Bei schwacher Stimulation wiederholen sich diese Mechanismen, was eine Ca^{2+} -Oszillation bewirkt, wohingegen durch starke Stimulation ein erhöhter intrazellulärer Ca^{2+} -Level verursacht wird.

Die partielle Beseitigung des intrazellulären Ca^{2+} im Herzmuskel wird durch die sarkoplasmatische Retikulum (SR) Ca^{2+} -ATPase (SERCA2) bewerkstelligt, die durch das Transmembranprotein Phospholamban reguliert wird (229). Phospholamban besitzt N-terminale Phosphorylierungsstellen, die durch die PKC, PKA und die Ca^{2+} /Calmodulin-aktivierte Kinase II (CaMKII) phosphoryliert werden können und eine Aktivierung der Ca^{2+} -Pumpe auslösen, wodurch die intrazelluläre Ca^{2+} Konzentration fällt (61). Eine neue Studie zeigt, dass die zelluläre Ca^{2+} -Oszillation von der PKC α -medierten Phosphorylierung der Ca^{2+} -Rezeptoren abhängig ist (403). Untersuchungen über store-operated Ca^{2+} channels (SOCs) der Plasmamembran, die durch die Entleerung intrazellulärer Ca^{2+} -Speicher in glatten Muskelzellen aktiviert werden, zeigte, dass die PKC δ Isoform spezifisch an dessen Aktivierung beteiligt ist (116).

Es wird angenommen, dass sowohl Endozytose, als auch Exozytose über die Freisetzung von intrazellulärem Ca^{2+} gesteuert wird, wobei Calmodulin (CaM) und Synaptotagmin als Ca^{2+} -Sensoren fungieren (252, 391). Die Regulation von verschiedenen Synaptotagmin-Isoformen über deren direkte PKC-vermittelte Phosphorylierung wurde nachgewiesen (153, 288). Dies zeigt, dass PKC Isoformen sowohl direkten, als auch indirekten Einfluss auf die Regulation des

zellulären Ca^{2+} - und cAMP-Levels haben können, was wiederum die eigene Aktivierung beeinflusst.

Anhang D. 6. Regulation der PKC durch PMA

Es bestehen stark divergente Forschungsergebnisse über die Auswirkungen aktivierter PKC Isoformen. Insbesondere bei konventionellen PKC Isoformen kann eine verlängerte oder starke Stimulation mit Phorbolestern die Degradation auslösen (55). Song et al. fanden heraus, dass bei intestinalen Epithelzellen eine geringe PMA-Konzentration (10nM) die basolaterale Endozytose zeitabhängig erhöhte und ein Maximum nach 60 Minuten erreicht wurde, während eine erhöhte PMA-Konzentration (100nM) eine maximal verstärkte Endozytose schon nach 30 Minuten ausgelöst hat (335). Eine wichtige Beobachtung war zudem, dass der langsame Metabolismus künstlicher Phorbolster, wie der des häufig verwendeten 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA) (258) und die sehr hohe Affinität von PMA zu der C1-Domäne der PKC (339) im Vergleich mit DAG eine unterschiedliche Aktivierung von PKC α und PKC δ verhinderte (161). Messungen der Kinaseaktivitäten zeigten erstaunlicherweise, dass eine signifikante Stimulation der humanen PKC α bzw. PKC ϵ Isoform erst zwei Stunden bzw. 30 Minuten nach der Behandlung mit PMA messbar war (334). 1 μ M PMA stimulierte die Endozytose der NBCe1-A und NBCe1-B Isoformen in Speicheldrüsenzellen (274). In *Xenopus* Oozyten wurde dagegen beobachtet, dass 10nM PMA die Aktivität des exprimierten NBCe1-A inhibierte, ohne dessen Oberflächenexpression zu verändern (275). Carbachol verursachte wie PMA in Speicheldrüsenzellen die PKC α , β , γ und δ abhängige Endozytose des NBCe1-A und NBCe1-B (274), die Endozytose des NBCe1-A in *Xenopus* Oozyten fand allerdings PKC ϵ -vermittelt statt (276).

Verschiedene Studien zeigen, dass diverse Mechanismen die Phosphorylierung und Dephosphorylierung von PKC Isoformen beeinflussen können. PMA und DAG aktivieren die Sphingomyelinase, die durch die Hydrolyse von

Sphingomyelin in der Membran intrazelluläres Ceramid akkumuliert (107, 186, 189). Ceramid und die ebenfalls durch Phorbolster-aktivierte Phospholipase D (PLD) wurden als inhibitorische Regulatoren der PKC α und β Isoform identifiziert (35, 36). Bei aktivierter Ceramid-Synthese wurden Phosphorylierung der PKC α und PKC β II Isoformen teilweise aufgehoben (186), wohingegen Ceramid die atypische PKC ζ Isoform direkt aktiviert (52). Gysin et al. beschreiben zudem, dass eine Aktivierung der PKC α Isoform durch Phorbolster eine Konversion von Ser⁶⁵⁷ verursachen kann und dieses hydrophobe Motiv teilweise nicht phosphoryliert wird (141, 142). Allerdings können die verschiedenen PKC Isoformen auch untereinander Einfluss auf die gegenseitige Phosphorylierung haben. Die Phosphorylierung neuer PKC Isoformen wird zum Beispiel durch atypische PKC(ζ) Isoformen kontrolliert (413) und es wurde auch eine direkte Phosphorylierung atypischer PKC Isoformen durch PKC ϵ gezeigt (295). Beobachtungen von Rybin et al. zeigten jedoch auch, dass die Phosphorylierung des hydrophoben Motiv von PKC ϵ wiederum von der Kinasefunktion von PKC δ abhängig war (297).

Bei der Untersuchung der PMA-vermittelten Endozytose und Degradation der PKC sowie der Aktivierung verschiedener PKC Isoformen werden unterschiedliche Phorbolster in wechselnden Konzentrationen verwendet, die mit der Verwendung diverser Zelllinien und Expressionsmodellen divergente und z.T. gegenläufige Ergebnisse liefern. Viele Erkenntnisse über die Degradation der PKC Isoformen wurden anhand von PKC-überexprimierenden Zellen gewonnen, was allerdings zu alternativen Mechanismen der PKC-Inaktivierung führen kann (217).

Anhang D. 7. Negative Rückkopplung der PKC

Lee et al. beobachteten 2011, dass die persistente Stimulation mit PMA die PI3K-Aktivität über die Phosphorylierung der regulatorischen PI3K-p85 α -UE durch die Protein Kinase D (PKD1) inhibiert wird (201). In intestinalen

Epithelzellen wird PKD1 PMA- und Angiotensin II (ANGII)-vermittelt durch PKC Isoformen phosphoryliert (Ser⁷⁴⁴/Ser⁷⁴⁸) und aktiviert (70, 375, 376). Interessant ist dabei die Entdeckung von Perry et al., wobei die Aktivität und Expression des NBCe1-A durch geringe Konzentrationen (10⁻⁶M) des Ca²⁺-freisetzenden Peptidhormons ANGII PKCε-abhängig reduziert worden ist, allerdings höhere Konzentrationen (10⁻¹⁰M) die Aktivität des NBCe1-A gesteigert haben (275, 276). Die Agonist-medierte Inhibition der PI3K durch PKD1 ist somit PKC-sensitiv. Ni et al. zeigten, dass auch die Stimulation G-Protein gekoppelter Rezeptoren in intestinalen Epithelzellen die PKD1 aktiviert und den PI3K/Akt-Signalweg negativ regulieren kann (257). Dabei wurde beobachtet, dass eine Inhibition der PKC-aktivierten PKD1 die Phosphorylierung von Akt durch den Gq-Protein gekoppelten Rezeptor Agonist ANGII stark erhöhte und zudem eine verlängerte Aktivierung von Akt durch PI3K-Aktivierung/PIP₃-Generation verursacht wurde (257). Dies zeigt, dass durch starke und/oder konstante Stimulation der PKC eine negative Regulation von PI3K/Akt über die PKC-aktivierte PKD1 erfolgt. Die reduzierte PDK1-Aktivität durch Inhibition der PI3K könnte eine PKC-abhängige negative Rückkopplung darstellen und eine persistente Aktivierung der PKC verhindern. Neben der Agonist-induzierten Degradation bereits aktivierter PKC Isoformen könnte eine verringerte initiale Phosphorylierung der PKC durch PKD1-Inhibition des PI3K/Akt/PDK1-Signalweges die weitere Aktivierung der PKC reduzieren. Dies könnte wiederum die Oberflächenexpression und Aktivität des NBCe1-B, und anderer an der luminalen HCO₃⁻-Sekretion beteiligten Anionentransporter beeinflussen.

Anhang E Regulation der Anionensekretion durch PKC

Einige Studien beschreiben die Inhibition der cAMP-stimulierten Anionensekretion durch die PMA-aktivierten neuen PKCε und PKCδ Isoformen

mit z.T. gegenläufigen Effekten der konventionellen PKC Isoformen (55, 334, 349).

Die unterschiedliche Regulation von Ionentransportern und der PKC durch Forskolin, Carbachol und PMA haben ebenfalls verschiedene Auswirkungen auf die apikale Anionensekretion. Sowohl cAMP, als auch Carbachol verursachen eine erhöhte apikale Membranexpression von CFTR bei parallel verringerter NHE3-Expression und verstärkte Rekrutierung der Anionentransporter NKCC1 und NBCe1 in der basolateralen Membran (175). Forskolin erhöht den intrazellulären cAMP Level, was die apikale Cl⁻-Leitfähigkeit durch CFTR und parallel die basolaterale Leitfähigkeit für K⁺ im Kolon erhöht (132, 382). K⁺ Kanäle, die durch Ca²⁺ und cAMP aktiviert werden, hyperpolarisieren die basolaterale Membran durch Extrusion von K⁺, was die Triebkraft für die luminale Cl⁻-Sekretion durch CFTR ermöglicht (44). Forskolin verursacht eine konstante Anionensekretion, wohingegen Carbachol nur eine transiente Erhöhung des I_{sc} auslöst (286). Die beobachtete unterschiedliche Regulation des basolateralen NKCC1 nach der Stimulation mit Forskolin, Carbachol und PMA ist PKC-abhängig, mit der Aktivierung neuer PKC Isoformen und einer erhöhten basolateralen Endozytose korreliert (59, 105, 250, 349).

Anhand von humanen Kolonozyten wurde bereits Anfang der 90er Jahre beobachtet, dass eine Vorinkubation mit dem PKC Aktivator PMA die Carbachol- und cAMP-stimulierte Anionensekretion PKC-anhängig verringerte (39, 382). Die Stimulation mit Phorbol ester führte nach einer kurzzeitigen Erhöhung der intestinalen Cl⁻-Sekretion zu einer verlängerten Inhibition (55, 59, 92, 384). Weitere Untersuchungen zeigten, dass PMA die cAMP-stimulierte apikale Cl⁻-Sekretion intestinaler Epithelzellen durch eine gesenkte basolaterale PKC-abhängige K⁺-Leitfähigkeit (23), verringerte Funktion und Expression des NKCC1 (226, 228) und über eine erhöhte PKC-abhängige basolaterale Endozytose und Internalisierung des NKCC1 inhibiert (250, 349). Zudem ist die

PKA-mediierte Aktivierung von CFTR von der Phosphorylierung der PKC abhängig (10, 210, 311, 390).

Vermutlich sind neben konventionellen und neuen PKC Isoformen auch atypische Isoenzyme bei der Modulation der Transporterexpression beteiligt. PKC ζ phosphoryliert und aktiviert das zytosolische Protein Ezrin in intestinalen Epithelzellen, woraufhin Ezrin als Gerüstprotein Actinfilamente mit Membranproteinen verbindet und die Protein Kinase A rekrutiert (374). Die Aktivierung konventioneller PKC Isoformen ist ebenfalls mit der Phosphorylierung von Ezrin korreliert (4, 253). Die Endozytose und Degradation von anderen organischen Anionen- und Glukosetransportern war ebenfalls von der DAG-induzierten Translokation der neuen PKC ϵ Isoformen abhängig (208, 357, 410).

Anhang F PKC-abhängige Interaktion von CFTR, DRA und NHE3

Viele Arbeiten bestätigen den Cl $^-$ /HCO $_3^-$ Austauscher DRA und den CFTR-Kanal als hauptsächliche Mediatoren der apikalen Anionensekretion (19, 30, 193, 372, 394, 396). Die indirekte Regulation der CFTR-mediierten Anionensekretion durch PMA-aktivierte PKC Isoformen wurde Mitte der 90er Jahre bestätigt (25, 209, 324, 354, 364). Frühe Untersuchungen an kolonischen Epithelzellen zeigten, dass die Überexprimierung von PKC α die Expression von CFTR, sowie die cAMP- und Ca $^{2+}$ -induzierte Cl $^-$ -Sekretion verhinderte (87) und eine PKC-abhängige Regulation der Leitfähigkeit und Stabilität des CFTR-Kanals in pankreatischen Zellen stattfindet (390).

DRA interagiert mit dem CFTR-Kanal über Gerüstproteine (PDZ-Domänen) und die Bindung der STAS-Domäne von DRA an die CFTR-R-Domäne, was die Öffnungswahrscheinlichkeit des CFTR-Kanals um das 6-fache erhöht (187). Die dadurch gesteigerte apikale Cl $^-$ -Sekretion durch den CFTR-Kanal sorgt für die Bereitstellung von lumenalem Chlorid, was den Cl $^-$ /HCO $_3^-$ Austausch durch

DRA unterstützt. Die Bindung zwischen DRA und CFTR wird durch eine PKA-medierte Phosphorylierung der CFTR-R-Domäne reguliert, die wiederum von PKC-abhängigen Phosphorylierungen der regulatorischen CFTR-R-Domäne abhängig ist und über PKA-induzierte Phosphorylierungen die Bindung der regulatorischen Domäne an andere Domänen des CFTR-Kanals ermöglicht (10, 63, 64, 311). Dabei zeigte sich, dass die simultane Aktivierung der PKC durch PMA und der PKA durch cAMP zu einer verstärkten Interaktion der regulatorischen Domäne mit anderen Domänen von CFTR führte (311). Die Interaktion von PDZ mit DRA erleichtert dessen endosomale Membraninsertion (211) und DRA wird durch intrazelluläres Ca^{2+} , jedoch nicht durch PKC oder PKA inhibiert (196). Eine Aktivierung von CFTR inhibiert sowohl die elektroneutrale Na^+ -Absorption durch NHE3, als auch die elektrogene Na^+ -Absorption durch ENaC (193). Von Lee-Kwon et al. wurde beschrieben, dass eine erhöhte intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Carbachol die Na^+Cl^- -Absorption inhibiert, eine rapide $\text{PKC}\alpha$ -abhängige Inhibition von NHE3 zur Folge hat und die durch Carbachol aktivierte $\text{PKC}\alpha$ Isoform wahrscheinlich die Endozytose von NHE3 stimuliert (80, 93, 204, 405).

PKC Isoformen sind auch bei der Interaktion von CFTR und NHE3 beteiligt. Die durch Ezrin verankerte PKA initiiert die Phosphorylierung des Na^+/H^+ exchanger regulatory factor 1 (NHERF1) (378), der als Kofaktor bei der cAMP- und cGMP-medierten Regulation der Salz- und Wasserabsorption, sowie Sekretion im Intestinaltrakt durch die Regulation von NHE3 und CFTR eine wichtige Rolle spielt (53, 94). Es wurde gezeigt, dass $\text{PKC}\epsilon$ an den Rezeptor für aktivierte C Kinasen (RACK1) bindet, der zusammen mit NHERF1 die cAMP-induzierte Interaktion von CFTR und NHE3 bzw. die Inhibition von NHE3 reguliert (14, 209, 210, 385).

Somit wird die Aktivierung, Expression von CFTR und Interaktion von CFTR/DRA, CFTR/NHE3 und die Aktivität und Oberflächenexpression des

NBCe1, der das für die apikale Sekretion benötigte HCO_3^- importiert, von PKC Isoformen reguliert.

Anhang G Regulation der ElektrolytabSORption durch die PKC

ANGII ist ein wichtiger Regulator der Aldosteronproduktion und führt in der Nebenniere zu einer PKC-vermittelten Aktivierung der PKD und einer erhöhten Aldosteronproduktion (51, 262). Aldosteron stimuliert innerhalb des murinen distalen Kolon die elektrogene Na^+ -Absorption durch ENaC (193, 285) und innerhalb des proximalen Kolon die elektroneutrale Na^+Cl^- -Absorption und K^+ -Sekretion (359, 360). Die PKC-abhängige Aldosteronproduktion reguliert somit indirekt die elektroneutrale und elektrogene Absorption von Na^+/Cl^- . Die Sekretogoga Forskolin und Carbachol verursachen eine Aktivierung von PKC Isoformen und es ist bekannt, dass erhöhte cAMP- und Ca^{2+} -Konzentrationen die Na^+/Cl^- -Absorption inhibieren (22, 193). Dies ist allerdings nicht der einzige regulatorische Signalweg, weil eine ANGII-vermittelte Regulation des intestinalen NHE3 unabhängig von Aldosteron nachgewiesen wurde (249). Es wäre aber interessant zu untersuchen, ob die Sekretogoga-medierte Regulation der Na^+/Cl^- -Absorption und die Inhibition verschiedener PKC Isoformen durch deren Einfluss auf die PKD-vermittelte erhöhte Aldosteronproduktion bedingt ist.

Anhang H Regulation der Transportstöchiometrie des NBC

Es wurde eine unterschiedliche Transportstöchiometrie des pankreatischen NBCe1 (NBCe1-B) und des renalen NBCe1 (NBCe1-A) gefunden, wenn diese in verschiedenen Zelllinien exprimiert wurden (136). Bei einer Expression in renalen proximalen Tubuluszellen der Maus zeigten beide Transporter eine Stöchiometrie von 3:1 ($\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$). Wurden hingegen NBCe1-A/B in pankreatischen Zellen exprimiert, betrug ihre Stöchiometrie 2:1 ($\text{HCO}_3^-/\text{Na}^+$) (136). Der Effekt einer veränderten Stöchiometrie von 3:1 zu 2:1 in NBCe1-A-

transfizierten murinen Nierenzellen wurde durch eine PKA-abhängige Phosphorylierung von Ser⁹⁸² des NBCe1-A beobachtet (137). NBCe1-B Transporter besitzen eine identische PKA-Phosphorylierungsstelle (Ser¹⁰²⁶) wie der NBCe1-A, jedoch zusätzlich eine Thr⁴⁹-Phosphorylierungsstelle des N-Terminus. Gross et al. zeigten jedoch, dass eine Phosphorylierung von Thr⁴⁹ des N-Terminus des NBCe1-B in pankreatischen Zellen die cAMP-induzierte Membranleitfähigkeit erhöht ohne die Stöchiometrie von 2:1 zu verändern (135). Bei einer Expression des NBCe1-B in renalen Zellen führte hingegen die PKA-mediierte Phosphorylierung von Ser¹⁰²⁶ des NBCe1-B zu einer veränderten Stöchiometrie von 3:1 zu 2:1 (135). Als mögliche Ursache wurde von Gross et al. angeführt, dass in der Niere möglicherweise einzigartige Komponenten für eine 3:1 Stöchiometrie vorhanden sind und die Transportrate des NBCe1 Zelltyp-abhängig ist (136, 137, 139). Müller-Berger et al. zeigten 2001, dass Na⁺/HCO₃⁻ Kotransporter aus der Niere von Ratten, die in *Xenopus* Oozyten exprimiert wurden, ihre Stöchiometrie infolge erhöhter intrazellulärer Ca²⁺-Konzentration hingegen von 2 HCO₃⁻ : 1 Na⁺ zu 3 HCO₃⁻ : 1 Na⁺ konvertieren und so den HCO₃⁻-Transport steigern können (246). Die Protein Kinase C könnte als Kinase von Serin- und Threoninresten bei der cAMP- und Ca²⁺-bedingten Phosphorylierung eine Rolle spielen. Bisher ist allerdings nicht bekannt, ob und unter welchen Bedingungen der NBCe1-B in humanen Zellen in vivo durch die PKC direkt phosphoryliert und ob das die NBCe1-B Transportstöchiometrie verändert.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Mein Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Oliver Bachmann, Prof. Dr. rer. nat. Christian Stock für die Begutachtung und Prüfung der Arbeit, Prof. Dr. rer. nat. Anaclet Ngezahayo für den Prüfungsvorsitz, sowie meinen Kooperationspartnern und Mitgliedern der AG von PD Dr. med. Oliver Bachmann und Prof. Dr. med. Ursula Seidler.

Im Besonderen möchte ich mich bei meiner Freundin Jenny König und bei meinem Bruder Tobias May bedanken, die mich während der gesamten Zeit als Doktorand und darüber hinaus über alle Maßen unterstützt haben!

Curriculum Vitae

Oliver May

Curriculum Vitae

Kärntner Strasse 27

26131 Oldenburg

Email: olivermay@gmx.de

Persönliche Informationen

Geburtsdatum 17. September 1980

Geburtsort Oldenburg

Nationalität Deutsch

Ausbildung

Promotion

07/2010 - 10/2015 Promotion an der medizinischen Hochschule Hannover

Titel: *Regulation des elektrogenen Natrium Bikarbonat Kotransporters NBCe1 und der pH-Homöostase im Kolon der Maus*

Betreuer PD Dr. med. Oliver Bachmann

Diplom

07/2008 Diplom in Biologie, Carl-von-Ossietzky Universität, Oldenburg

Titel: *Bedeutung der DNA-Reparatur für die gentoxische Wirksamkeit von Zytostatika und Zytostatikakombinationen auf humane Ovarialkarzinomzellen*

Betreuer Prof. Dr. Irene Witte

Berufserfahrung

Seit 01/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe Humangenetik von Prof. Dr. John Neidhardt an der Universität Oldenburg

04/2015 - 01/2016 Wissenschaftlicher Mitarbeiter der Arbeitsgruppe plastische Chirurgie von Prof. Dr. Lars Steinsträßer an der Universität Oldenburg

08/2009 - 04/2010 Firmengründung und Entwicklung eines Unternehmenskonzeptes für das „EXIST“ Förderprogramm.

03/2006 - 11/2008 Studentischer Mitarbeiter der Firma „INTOX“ an der Universität Oldenburg

04/2008 - 07/2008 Wissenschaftlicher Mitarbeiter des „EFRE“ Projektes der Universität Oldenburg; Individuelle Chemosensitivitätsprüfung von Karzinomen

10/2001 - 07/2008 Studium der Biologie an der Carl-von-Ossietzky Universität Oldenburg mit den Schwerpunkten Biochemie, Physiologie und Zellbiologie.