

**Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Freien Universität Berlin**

**Funktionelle und molekularbiologische Untersuchungen zur Beteiligung  
von zwei TRP Kanälen an der Leitfähigkeit des Pansenepithels  
für Ammonium, Natrium, Kalium und Calcium**

**Inaugural Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
PhD of Biomedical Science  
an der  
Freien Universität Berlin**

**vorgelegt von  
Franziska Liebe  
Tierärztin  
aus Berlin**

**Berlin 2022  
Journal Nr.: 4342**

**Gedruckt mit Genehmigung  
des Fachbereichs Veterinärmedizin  
an der Freien Universität Berlin**

<b>Dekan:</b>	Univ.-Prof. Dr. Uwe Rösler
<b>Erster Gutachter:</b>	Prof. Dr. Friederike Stumpff
<b>Zweiter Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Johanna Plendl
<b>Dritter Gutachter:</b>	Univ.-Prof. Dr. Heidrun Gehlen

Deskriptoren (nach CAB Thesaurus):

cattle  
rumen  
rumen epithelium  
rumen metabolism  
calcium  
ammonium  
potassium  
sodium  
membrane permeability  
nutrient transport  
biochemical transport  
cell ultrastructure  
xenopus laevis  
animal nutrition

**Tag der Promotion:** 26.04.2022

**Für alle Wissbegierigen**

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>IV</b>
<b>Definitionen</b> .....	<b>V</b>
<b>1. Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>2. Literatur</b> .....	<b>2</b>
2.1. Harnstoff - Recycling .....	2
2.1.1. Effiziente Proteingewinnung.....	3
2.1.2. Ökologische Relevanz der Stickstoffausscheidung .....	7
2.1.3. Medizinische Relevanz des Stickstofftransports .....	9
2.2. Ammoniak- und Ammoniumtransport im Pansenepithel .....	13
2.2.1. Histologie des Pansens.....	13
2.2.2. Ammoniumkonzentration im Pansen .....	14
2.2.3. Mechanismen des Transports.....	14
2.2.4. Transport über das Pansenepithel .....	15
2.3. Ammoniumtransport durch divalent-sensitive, nicht-selektive Kationenkanäle.....	18
2.3.1. TRPV3.....	20
2.3.2. TRPV4.....	21
2.4. Stickstoffkreislauf im Colon .....	21
2.5. Aufnahme und klinische Relevanz des Calciums beim Rind.....	22
2.5.1. Kurzkettige Fettsäuren .....	25
<b>3. The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional     characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport.....</b>	<b>28</b>
3.1. Supplementary Material (Liebe et al. 2020).....	47
<b>4. Effects of butyrate<sup>-</sup> on ruminal Ca<sup>2+</sup> transport: evidence for the involvement     of apically expressed TRPV3 and TRPV4 channels. (Liebe et al. 2022) .....</b>	<b>51</b>
4.1. Supplementary Material (Liebe et al. 2022).....	80
<b>5. Diskussion</b> .....	<b>89</b>
5.1. Die Detektion von bTRPV3 und bTRPV4 im Rinderpansen.....	89
5.1.1. Probenmaterial.....	89
5.1.2. Sequenzierung, Vektorsynthese .....	89
5.1.3. Antikörperetablierung und Proteindetektion im Pansenepithel .....	90

5.2.	Die Funktion von bTRPV3 und bTRPV4 im Rinderpansen .....	92
5.2.1.	Agonistenwahl.....	92
5.2.2.	Ussing Kammer Experimente .....	92
5.3.	Die Charakterisierung von bTRPV3 und bTRPV4.....	93
5.3.1.	Expressionssysteme .....	93
5.3.2.	Leitfähigkeit für $\text{NH}_4^+$ und weitere Kationen .....	94
5.3.3.	$\text{NH}_4^+$ bewirkt intrazellulären pH-Abfall.....	96
5.3.4.	SCFA steigern die intrazelluläre Calciumkonzentration .....	96
5.4.	Die Verhornung des Pansenepithels.....	98
5.5.	Ausblick .....	101
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>104</b>
<b>7.</b>	<b>Summary .....</b>	<b>106</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>Anhang: Publikationen in Co Autorenschaft.....</b>		<b>VI</b>
<b>A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from Bos indicus crossbreds versus Bos taurus .....</b>		<b>VI</b>
<b>The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of <math>\text{Na}^+</math>, <math>\text{Ca}^{2+}</math>, and <math>\text{NH}_4^+</math> .....</b>		<b>VII</b>
<b>Beyond <math>\text{Ca}^{2+}</math> signalling: the role of TRPV3 in the transport of <math>\text{NH}_4^+</math> .....</b>		<b>VIII</b>
<b>Publikationen.....</b>		<b>IX</b>
<b>Danksagung.....</b>		<b>XII</b>
<b>Selbständigkeitserklärung .....</b>		<b>XIV</b>

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Der N-Stoffwechsel des Wiederkäuers. ....	3
Abb. 2 Der Harnstoffzyklus mit Zubringerreaktionen und Citratzyklus. ....	5
Abb. 3 Der vereinfachte, mikrobielle Harnstoffabbau in der Umwelt. ....	8
Abb. 4 Die Patch-Clamp Technik. ....	17
Abb. 5 $\text{NH}_3$ bzw. $\text{NH}_4^+$ Aufnahmewege und Verhornung im Pansenepithel des Rindes. ....	100
Abb. 6 Ruminales Transportmodell bei SCFA Exposition. ....	102

## Abkürzungsverzeichnis

[ ]	Konzentration
2-APB	2-Aminoethoxydiphenylborat (Synonym: Diphenylborsäure-2-aminoethylester)
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
AQP	Aquaporine
ATP	Adenosintriphosphat
bTRPV3	bovine Form des TRPV3 Kanals
bTRPV4	bovine Form des TRPV4 Kanals
bzw.	beziehungsweise
CaBD <sub>9k</sub>	CalbindinD <sub>9k</sub>
Ca <sup>2+</sup>	ionisierte Form des Calciums (Calcium-Ion)
Cl <sup>-</sup>	Chlorid-Ion (Anion des Chlors)
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup>	Carbonat-Ion
cRNA	<i>in vitro</i> transkribierte RNA
Cs <sup>+</sup>	Cäsium-Ion
engl.	englisch
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alia</i> (und andere)
GABA	γ-Aminobutyrat
GFP	engl. <i>green fluorescent protein</i> (grün fluoreszierendes Protein)
G <sub>t</sub>	Leitfähigkeit
H <sup>+</sup>	Proton bzw. geladenes Ion des Wasserstoffs
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Hydrogencarbonat
H <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	Kohlensäure
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
HEK-293	HEK-293 Zellen
IP <sub>3</sub>	Inositoltrispohosphat
I <sub>sc</sub>	Kurzschlussstrom (engl. <i>short-circuit current</i> )
K <sup>+</sup>	Kalium-Ion
LC <sub>50</sub>	<i>lethal concentration of 50 %</i> = mittlere letale Konzentration einer bestimmten Substanz innerhalb eines definierten Zeitraum bei einer bestimmten Tierart
Li <sup>+</sup>	Lithium-Ion
LPS	Lipopolysaccharide
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium-Ion
N <sub>2</sub>	Stickstoff
NaBu	Natriumbutyrat
NADP	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat
NCX1	Na <sup>+</sup> /Ca <sup>2+</sup> Antiporter
NH <sub>3</sub>	Ammoniak
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Ammonium
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
NHE	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> Austauscher
NKCC	Na <sup>+</sup> -K <sup>+</sup> -2Cl <sup>-</sup> -Cotransport
NMDG	<i>N-Methyl-D-glucamin</i>
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub>	Stickstoffdioxid
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
N <sub>2</sub> O	Distickstoffoxid (Lachgas)
N <sub>x</sub> O	Stickoxide

NPN	Nicht-Protein-Stickstoff-Verbindungen
NSSC	nicht-selektiver Kationenkanal (engl. <i>non-selective cation channel</i> )
P <sub>i</sub>	Phosphat-Ion
pK <sub>a</sub>	Säurekonstante (engl. <i>acid</i> ) bzw. negative dekadischer Logarithmus der Gleichgewichtskonstante; ein Maß für die Stärke einer Säure
PMCA1	Ca <sup>2+</sup> -ATPase
PP <sub>i</sub>	Pyrophosphat
Rb <sup>+</sup>	Rubidium-Ion
Rh	Rhesus
SCFA	kurzkettige Fettsäuren (engl. <i>short-chain fatty acids</i> )
TGF-α	transformierender Wachstumsfaktor alpha (engl. <i>transforming growth factor-α</i> )
TRP	nicht selektive Kationenkanalfamilie (engl. <i>transient receptor potential channels</i> )
TRPV	Vanilloid-Rezeptor Unterfamilie der TRP-Kanäle (z.B. TRPV3, TRPV4)
u.a.	unter anderem
VRL-2	frühere Bezeichnung für TRPV4 (engl. <i>vanilloid receptor-like</i> )
X.	<i>Xenopus laevis</i>
YFP	engl. <i>yellow fluorescent protein</i> (gelb fluoreszierendes Protein)
z.B.	zum Beispiel
ZO-1	<i>Zonula Occludens-1</i>

## Definitionen

Anabolismus	Aufbau von körpereigenen Stoffen
apikal	dem Lumen zugewandte Seite einer Zelle oder eines Gewebes
Assimilation	Überführung körperfremder Ausgangsstoffe in körpereigene Substanzen
basolateral	dem Lumen abgewandte Seite
BMDL <sub>10</sub>	engl. <i>benchmark dose</i> 10 %: erhöht eine definierte Nebenwirkung um 10 %
Katabolismus	Abbau von körpereigenen Stoffen
mukosal	zum (z.B. Darm)lumen hinweisend, zur Schleimhaut gehörig
luminal	im Lumen gelegen
serosal	der Serosa zugehörige Schicht, dem Lumen entfernteste Seite



# 1. Einleitung

Die *transient receptor potential* (TRP) Kationenkanäle werden in zahlreichen Geweben exprimiert. Beim Säuger findet man insgesamt 28 Vertreter, welche sechs Unterfamilien angehören (Nilius und Flockerzi 2014). Im Jahre 1989 wurde erstmals ein *trp* Gen aus der Fliege *Drosophila melanogaster* kloniert, dessen Mutation bei den Fliegen zu visuellen Störungen mit einem transienten Rezeptorpotential führte (Cosens und Manning 1969; Nilius und Flockerzi 2014). In den nachfolgenden 32 Jahren wurden diverse funktionelle Zusammenhänge insbesondere in der Sensorik von Schmerz und Temperatur beschrieben. Auch pathophysiologische Zusammenhänge mit unterschiedlichen Vertretern dieser Familie wurden erkannt, sowohl beim Menschen als auch beim Tier.

Die TRP Proteine liegen in der Membran und bestehen aus 6 membranspannenden Domänen (S1-S6), wobei zwischen S5-S6 eine kationengängige Pore gebildet wird (Nilius und Flockerzi 2014). Zumeist bilden sich aus 4 identischen TRP Proteinen ein Kanal (Homotetramer), aber auch Heterotetramere sind beschrieben, bei denen aus 2 unterschiedlichen Proteinen der Familie ein Kanal gebildet wird.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die bovinen Homologe der Kanäle TRPV3 und TRPV4 (bTRPV3 und bTRPV4) untersucht. Beide Proteine gehören der Unterfamilie der „vanilloiden“ TRP Kanäle (TRPV) an, welche insgesamt 6 Vertreter (TRPV1 – TRPV6) mit recht unterschiedlichen Eigenschaften vorweist (Nilius und Flockerzi 2014). Der Name leitet sich aus der Empfindlichkeit des ersten geklonten Kanals der Subfamilie für Vanilloide (u.a. Capsaicin) her (Caterina et al. 1997). TRPV3 und TRPV4 haben andere Eigenschaften und Funktionen, die im Zusammenhang mit der Transportphysiologie im Rinderpansen detaillierter dargestellt werden.

Folgende Fragestellungen werden in dieser Dissertation bzw. in den in Klammern aufgeführten Publikationen beantwortet:

- 1) Leitet der humane TRPV3 (hTRPV3) bzw. der bovine TRPV3 (bTRPV3) Kanal das  $\text{NH}_4^+$  Ion? (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2021)
- 2) Leitet der bTRPV3 Kanal  $\text{Ca}^{2+}$  Ionen? (Schrapers et al. 2018)
- 3) Wirken Agonisten, die funktionelle Wirkungen am nativen Pansenepithel haben, auf den bTRPV3 Kanal? (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2022)
- 4) Wie groß ist die Einzelkanalleitfähigkeit des bTRPV3 für unterschiedliche Kationen:  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NMDG}^+$ ? (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2020)
- 5) Welche Unterschiede gibt es zum hTRPV3? (Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2021)
- 6) Welche Antikörper können für bTRPV3 etabliert werden und wo genau liegt das bTRPV3 Protein im nativen Pansenepithel des Rindes? (Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022)
- 7) Leitet der bTRPV4 Kanal  $\text{NH}_4^+$  bzw.  $\text{Ca}^{2+}$  Ion? (Liebe et al. 2022)
- 8) Wie wirken funktionell TRPV3 bzw. TRPV4 Agonisten am nativen Pansenepithel des Rindes? (Rabbani et al. 2018; Liebe et al. 2022)
- 9) Welche Antikörper können für bTRPV4 etabliert werden und wo genau liegt das bTRPV4 Protein im nativen Pansenepithel des Rindes? (Liebe et al. 2022)
- 10) Wie wirken sich kurzkettige Fettsäuren (Buttersäure) auf die Leitfähigkeit von bTRPV3 und bTRPV4 für die Ionen  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  aus? (Liebe et al. 2022)

### Publikationen in Erstautorschaft:

- The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport (Liebe et al. 2020)
- Effects of butyrate on ruminal Ca<sup>2+</sup> transport: evidence for the involvement of apically expressed TRPV3 and TRPV4 channels (Liebe et al. 2022)

### Publikationen in Co-Autorenschaft:

- The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Schrapers et al. 2018)
- A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from *Bos indicus* crossbreeds versus *Bos taurus* (Rabbani et al. 2018)
- Beyond Ca<sup>2+</sup> signalling: the role of TRPV3 in the transport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Liebe et al. 2021)

## 2. Literatur

### 2.1. Harnstoff - Recycling

Beim Wiederkäuer zirkulieren große Mengen von Stickstoff im ruminohepatischen Kreislauf (Abb. 1). Initial nach Fütterung, kann der bei der Fermentation überschüssig entstehende Stickstoff in Form von Ammoniak/Ammonium durch die Pansenwand treten und wird in der Leber hauptsächlich zu Harnstoff umgesetzt. Dieser wird letztlich über die Niere ausgeschieden. Beim Wiederkäuer gelangen jedoch auch große Mengen des Harnstoffs über den Speichel oder das Pansenepithel zurück in den Vormagen. Im Pansen (*Rumen*) kann Harnstoff von symbiontischen Mikroorganismen zu Proteinen aufgebaut werden, die reich an essentiellen Aminosäuren sind. Aus dem Vormagen gelangen diese in den eigentlichen Gastrointestinaltrakt, wo sie vollständig resorbiert werden können. Sofern insgesamt genügend Stickstoff verfüttert wird, kann so ein Mangel an essentiellen Aminosäuren im Futter kompensiert werden (Von Engelhardt et al. 2015; Kues et al. 2021).

Mit einem Volumen von bis zu 100 Litern ist das *Reticulorumen* der größte Verdauungsbereich des Rindes (Von Engelhardt et al. 2015). In ihm dominieren anaerobe und fakultativ anaerobe Bakterien-Spezies, wobei die Zusammensetzung der Population vom Wassergehalt, pH-Wert, Ionenstärke und Redoxpotential abhängt, was wiederum durch die Futterzusammensetzung bestimmt wird (Rodríguez et al. 2007).

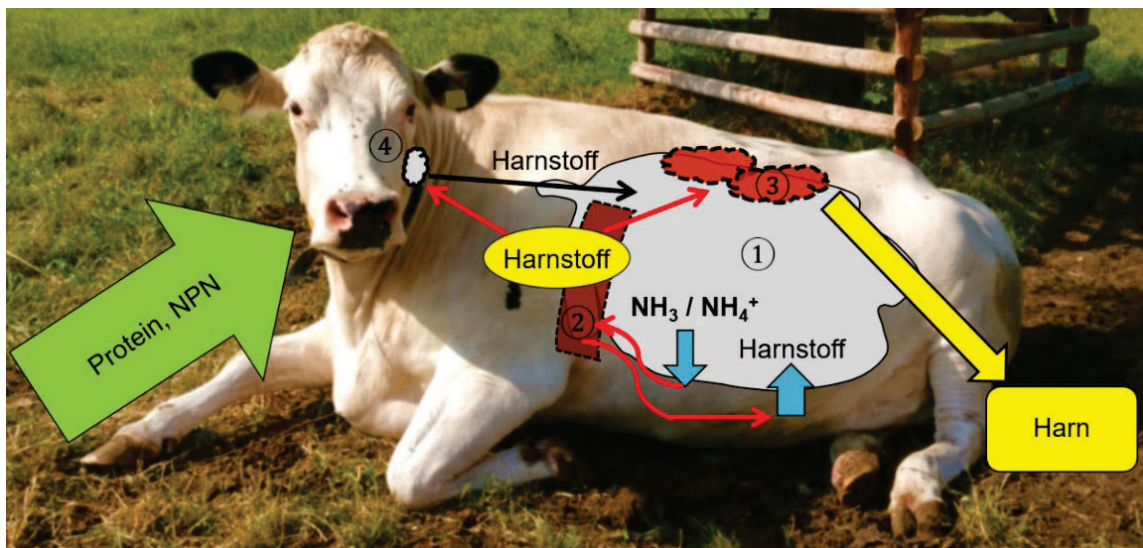


Abb. 1 Der N-Stoffwechsel des Wiederkäuers.

Verfütterte Proteine bzw. Nicht-Protein-Stickstoff-Verbindungen (NPN) können im Pansen (①) fermentativ abgebaut werden. Entstehendes überschüssiges Ammonium bzw. Ammoniak werden resorbiert und gelangen in die Blutbahn. In der Leber (②) findet eine Entgiftung statt, wobei überwiegend Harnstoff entsteht, welcher über das Pansenepithel auf dem direkten Weg zurück in den Pansen gelangen kann. Weitere Transportziele vom Harnstoff sind die Niere (③) und die Speicheldrüse (④). Während über die Niere der Harnstoff-Stickstoff endgültig ausgeschieden wird, kann der Harnstoff mit dem Speichel wieder in den Pansen gelangen und damit potentiell zum mikrobiellen Proteinaufbau genutzt werden. (Frei nach (Kues, Blickwede et al. 2021) unter Verwendung eigenen Bildmaterials.)

### 2.1.1. Effiziente Proteingewinnung

Wie bei *Omnivoren* und *Carnivoren* findet bei Wiederkäuern die Denaturierung der im Pansen gebildeten oder über die Nahrung aufgenommenen Proteine im Magen bzw. im sogenannten *Abomasum* statt, bewirkt durch einen niedrigen pH-Wert als auch der Hydrolyse durch Proteasen. Vergleichbar ist ebenfalls die Proteinverdauung im Dünndarm, wo Endo- und Exopeptidasen des Pankreas und Peptidasen des Bürstensaums wirken. Schlussendlich werden Aminosäuren über sekundär aktiven Transport (in der Regel  $\text{Na}^+$ -abhängige Carrier) aufgenommen. Dabei können basische Aminosäuren auch  $\text{Na}^+$ -unabhängig mithilfe eines Antiporters im Austausch mit intrazellulär akkumulierten, neutralen Aminosäuren aufgenommen werden. Ein tertiär aktiver Transport mittels  $\text{H}^+$ -Cotransport wurde für Prolin, Glycin und Alanin als zusätzlicher Aufnahmemechanismus beschrieben. Di- und Tripeptide werden tertiär aktiv in das Darmepithel transportiert. Dieser  $\text{H}^+$ -gekoppelte Aufnahmeweg ist durch den Oligopeptid-Translokator Pept1 vermittelt. Nur in äußerst geringen Mengen werden vollständige Proteine von der Darmschleimhaut bzw. von dendritischen Zellen und M-Zellen (im Ileum) aufgenommen, was im Zusammenhang mit der Funktion des Immunsystems steht (Von Engelhardt et al. 2015; Kues et al. 2021).

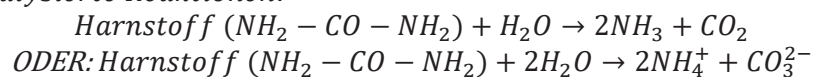
Ein entscheidender Unterschied zwischen *Monogastrier* und *Ruminantia* stellt die hohe Nutzbarkeit von mikrobiellen Proteinen des Pansens dar. Mikrobiell synthetisiertes Protein aus dem *Colon* oder *Caecum* kann hingegen in der Regel nicht verwertet werden. Eine sehr hohe Nutzbarkeit mikrobiellen Proteins findet sich allerdings in *Caecotrophe* fressenden Spezies, wie *Lagomorpha* und *Rodentia* (Von Engelhardt et al. 2015).

Nachteilig ist an der Vormagenverdauung hingegen, dass prinzipiell jede Proteinquelle mikrobiell verdaut wird, auch wenn es sich bereits um qualitativ hochwertiges Protein handelt. Ein Anteil des Futterproteins (30-70 %) passiert jedoch unbeeinflusst das Vormagensystem.

Entscheidend hierfür sind die Löslichkeit bzw. die Interaktion mit anderen Substanzen (z.B. Tanninen (Polyphenole), chemische Behandlung „protected proteins“), Struktur der Disulfidbrücken und Sekundär- bzw. Tertiärstruktur (Hartinger et al. 2018). Der Abbau von Proteinen im Pansen erfolgt durch Proteasen, die vornehmlich von Bakterien gebildet werden. Des Weiteren sind Enzyme von Protozoen und Pilzen, ferner auch futterpflanzenassoziierte Enzyme am Proteinabbau beteiligt. Nach dem Abbau der Proteine können die Mikroorganismen die Peptide und Aminosäuren direkt aufnehmen, um Protein zu synthetisieren. Bei Energiemangel werden resorbierte Aminosäuren zur eigenen ATP-Gewinnung katabolisiert (Rodríguez et al. 2007). Die hierbei genutzte Desaminierung bringt kurzkettige Fettsäuren (z.B. Valin zu Isobuttersäure), CO<sub>2</sub> und Ammoniak hervor (Rodríguez et al. 2007; Kues et al. 2021).

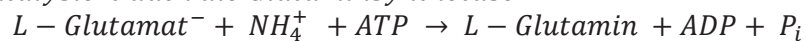
Neben dem Abbau von Proteinen können pansenassoziierte Mikroorganismen auch Nicht-Protein-N-Stickstoff (NPN) nutzen. Dabei kann es sich um endogen produzierten oder verfütterten Harnstoff handeln oder aber um freie Aminosäuren, Nitrate und Harnsäure (Annison 1956). Wichtig sind auch endogene Stickstoffquellen, worunter sezerniertes Mucoprotein vom Speichel und abgeschilferte Epithelzellen fallen (Pearson und Smith 1943; Von Engelhardt et al. 2015; Kues et al. 2021). Hauptsächlich entstehen, katalysiert durch die mikrobielle Urease, Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) und Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>), wobei je nach Ausgangssubstrat noch weitere organische Säuren resultieren (Gleichung 1).

(1) *Urease katalysierte Reaktionen:*



Unter ausreichender Energiezufuhr können die Mikroorganismen diese Stickstoffquellen zur *de novo* Proteinsynthese nutzen (Rodríguez et al. 2007). Je nach Fütterungsregime kann NH<sub>4</sub><sup>+</sup> 40-95 % der bakteriellen Proteinsynthese bedienen (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-Assimilation). Die bakterielle Glutamatdehydrogenase setzt NH<sub>4</sub><sup>+</sup> und α-Ketoglutarat mithilfe des NADP-Systems zu Glutamat um. Unter Verbrauch von ATP kann Glutamat mit NH<sub>4</sub><sup>+</sup> zu Glutamin reagieren (Gleichung 2).

(2) *Reaktion katalysiert durch die Glutaminsynthetase:*



Beide, sowohl Glutamat als auch Glutamin, sind Ausgangsstoffe für die weitere Aminosäuresynthese. Mittels bakterieller Enzyme können im Pansen auch essentielle Aminosäuren gebildet werden, die vom Tier selbst nicht produziert werden können (Von Engelhardt et al. 2015; Kues et al. 2021).

Ammonium bzw. Ammoniak, welches nicht zur Proteinsynthese verwendet wird, kann im Zuge der Vormagenmotorik aus dem Pansen hinaus fließen und über *Reticulum* und *Omasum* ins *Abomasum* gelangen. Weitaus größere Mengen gelangen aber über die Pansenwand ins Blut (Details siehe 2.2) und von dort aus zur Verstoffwechslung in die Leber (Von Engelhardt et al. 2015).

Seit einiger Zeit weiß man, dass die Aufnahme von NH<sub>3</sub> in die perivenösen Hepatozyten nicht einfach per Diffusion, sondern über das Rhesus assoziierte Glykoprotein B (RhBG) erfolgt (Handlogten et al. 2005). Dieses Kanal-ähnliche Protein katalysiert die Umwandlung von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in NH<sub>3</sub>, welches dann hocheffizient über die Proteinpore in die Zelle aufgenommen werden kann. Damit bleibt die [NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup>] im arteriellen Blut bei ~ 0,04 mmol · L<sup>-1</sup> bzw. venösem Blut ~ 0,2 mmol · L<sup>-1</sup> stabil und ist im Vergleich zur Pansenflüssigkeit (3-15 mmol · L<sup>-1</sup>) beachtlich geringer (Symonds et al. 1981; Von Engelhardt et al. 2015).

Die Umwandlung von  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  in Glutamin (Gleichung 2) bzw. Harnstoff (Abb. 2) benötigt Energie und hat in beiden Fällen einen Einfluss auf den Säure-Basen Haushalt. Hierbei handelt es sich nicht um einen wiederkäuerspezifischen Stoffwechselweg (Kues et al. 2021).

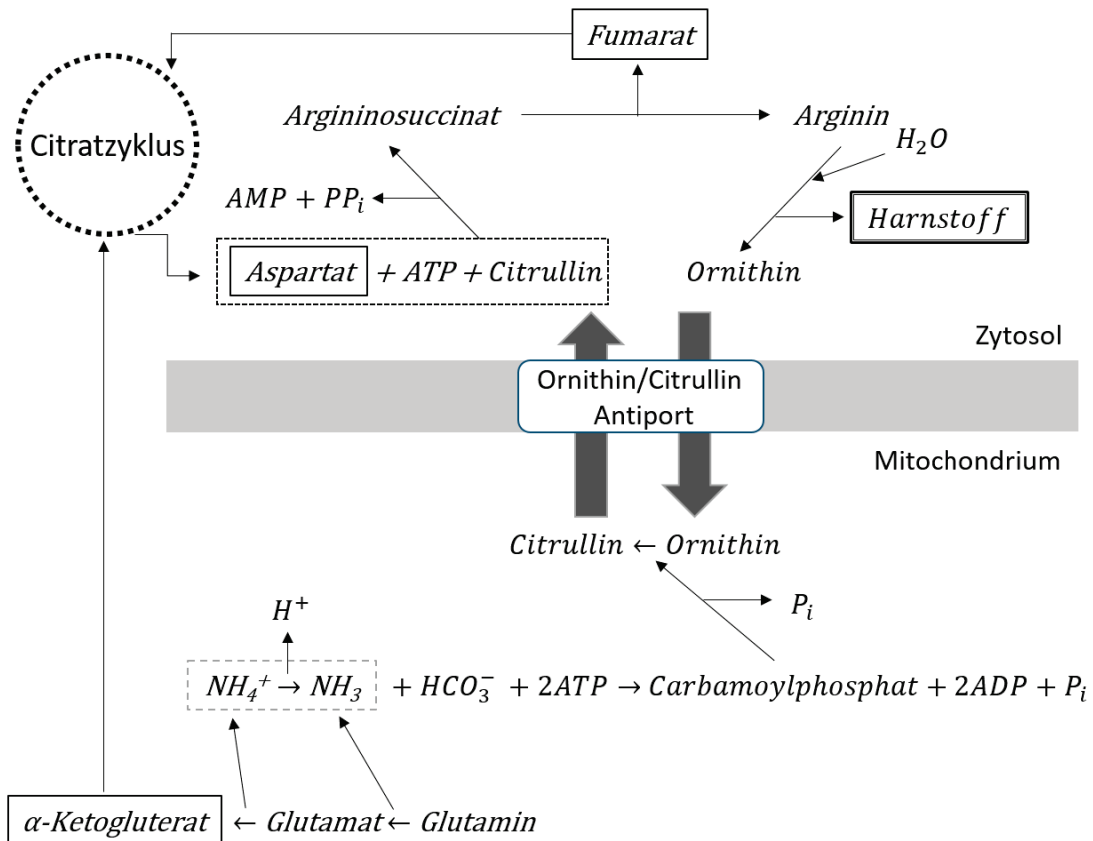


Abb. 2 Der Harnstoffzyklus mit Zubringerreaktionen und Citratzyklus.

Der Harnstoffzyklus findet teilweise im Mitochondrium und im Cytosol der Hepatozyten statt. Hierbei kann je ein Stickstoff aus  $\text{NH}_4^+$  und Aspartat in Harnstoff gebunden werden. Aspartat kann u.a. aus Oxalacetat (Citratzyklus-Intermediat) hergestellt werden. Das  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  direkt aus der Blutbahn wird vorerst in Glutamat oder Glutamin fixiert, um in größeren Mengen in die periportalen Hepatozyten zu gelangen und wird für den Harnstoffzyklus dann wieder abgebaut. Das bei der Zubringerreaktion entstehende  $\alpha$ -Ketoglutarat kann im Citratzyklus metabolisiert werden. Das Fumarat, welches im Harnstoffzyklus als Nebenprodukt entsteht, kann ebenfalls im Citratzyklus wieder zur Aspartat Synthese genutzt werden. Die vereinfachte Abbildung und dessen Beschreibung basiert auf dem Buch von Kues *et al.* (Kues et al. 2021).

Perivenöse Hepatozyten, die in geringerer Anzahl als die periportalen Hepatozyten weiter stromabwärts liegen, wandeln hingegen  $\text{NH}_4^+$  in Glutamin um (Gleichung 2), welches weiter zum Aufbau nicht-essentieller Aminosäuren genutzt werden kann. Bei einer metabolischen Azidose wird die Glutamin-Synthese priorisiert auf Kosten der Harnstoffsynthese (Taylor und Curthoys 2004). In der Niere kommt es hingegen bei Azidose vermehrt zur Desaminierung von Glutamin, wobei überschüssige Protonen in Form von  $\text{NH}_4^+$  ausgeschieden werden können (Kues et al. 2021).

Der in der Leber gebildete Harnstoff kann durch spezifische Transporter (Urea transporters, UT) in die Blutbahn gelangen, wodurch u.a. eine Ausscheidung über die Niere möglich wird. Auch in der Niere kommt es, allerdings in geringerem Umfang, zur Bildung von Harnstoff (Von Engelhardt et al. 2015).

Der größte Teil an freien Aminosäuren des körpereigenen Proteinabbaus wird direkt zur Synthese neuer Proteine verwandt. Andersfalls wird oft die Aminogruppe abgelöst, um die

Kohlenstoffverbindung dem zelleigenen Energiestoffwechsel zuzuführen (Desaminierung). Die abgelöste Aminogruppe kann vor Ort zur Synthese von Stickstoffverbindungen genutzt werden. Überschüssige Aminogruppen werden in Alanin und Glutamin umgesetzt und in die Blutbahn abgegeben, um dann in der Leber (Alanin, Glutamin) und Niere (Glutamin) als Intermediate der Gluconeogenese zu dienen. Während Alanin zu Pyruvat umgesetzt wird, entsteht aus Glutamin Glutamat bzw.  $\alpha$ -Ketoglutarat (Citratzyklus). In beiden Fällen kann sich letztendlich Ammoniak/Ammonium bilden. In der Niere wird der gebildete Ammoniak zur Neutralisierung von Säuren im Urin genutzt, während die Leber daraus Harnstoff synthetisiert (Abb. 2).

Im Folgenden kann der gebildete Harnstoff über die Blutbahn zurück in den Pansen transportiert werden. Zum einen wird Harnstoff über die Speicheldrüsen sezerniert und nachfolgend geschluckt. Zum größeren Teil gelangt Harnstoff jedoch direkt über die Pansenwand in die Pansenflüssigkeit zurück. Lokalisationsunabhängig in allen Epithelzellen des Pansens wird insbesondere der Harnstofftransporter UT-B2 exprimiert, wobei lediglich die Corneozyten des *Stratum corneum*s ausgeschlossen sind (Stewart et al. 2005; Abdoun et al. 2010; Coyle et al. 2016). Des Weiteren sind vermutlich Vertreter der Aquaporin (AQP) Kanalfamilie am Harnstofftransport beteiligt (Røjen et al. 2011; Berends et al. 2014; Lu et al. 2014).

Es schließt sich der ruminohepatische Kreislauf, indem der Harnstoff von den Mikroorganismen des Pansens zu  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  abgebaut wird, welches entweder erneut resorbiert oder zu mikrobiellen Proteinen synthetisiert werden kann (Abb. 1).

Die Leber setzt fütterungsabhängig 40-80 % des zugeführten Stickstoffes in Harnstoff um, welches in den Verdauungstrakt zurückkommt, wovon wiederum 35-55 % anabolisch genutzt werden (Lapierre und Lobley 2001; Li et al. 2019). Wenn genügend Energie zu Verfügung steht, kann die mikrobielle Synthese im Zusammenhang mit dem zirkulierenden Harnstoff eine proteinarme Fütterung kompensieren (Harmeyer und Martens 1980; Wickersham et al. 2008; Lu et al. 2014). Bis zu drei Tagen zeigt eine solche proteinarme Fütterung keine negativen Auswirkungen auf die Milchleistung, aber obligat wird eine verringerte Stickstoffausscheidung im Harn beobachtet (Reynolds und Kristensen 2008; Mutsvangwa et al. 2016). Außerdem nimmt dabei verhältnismäßig das Harnstoff-Recycling zu, während die Harnstoffkonzentration im Blut sinkt. Handelt es sich umgekehrt um eine typischerweise eingesetzte, proteinreiche Fütterung zur Maximierung des Fleischansatzes bzw. der Milchleistung, wird der Rücktransport von Harnstoff in den Pansen geblockt (Batista et al. 2017; Schwab und Broderick 2017; Hartinger et al. 2018; Lapierre et al. 2018; Lapierre et al. 2020). Bei *in vitro* Untersuchungen zeigte sich, dass der Pansen den Harnstofftransporter UT-B1 (SLC14a1) sowie Aquaporin 3 (AQP3) exprimiert (Stewart et al. 2005; Lu et al. 2015; Zhong et al. 2020). Ferner konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, dass die Permeabilität des Pansenepithels für Harnstoff in einer vom pH abhängigen Weise durch kurzkettige Fettsäuren (SCFA),  $\text{CO}_2$ , pH und  $\text{NH}_4\text{Cl}$  moduliert wird (Norton et al. 1982a; Norton et al. 1982b; Rémond et al. 2002; Abdoun et al. 2006; Simmons et al. 2009; Lu et al. 2015). Dabei erhöhen SCFA und  $\text{CO}_2$  die Permeabilität des Pansenepithels (Abdoun et al. 2006; Abdoun et al. 2010; Lu et al. 2015). Eine maximale Harnstoff Transportrate wurde bei einem luminalen pH-Wert von  $\sim 6,2$  mit Abfall in beiden Richtungen beobachtet (Lu et al. 2014). Diese pH-Abhängigkeit könnte funktionell auf eine Beteiligung des durch Protonen modulierten AQP3 hinweisen (Zeuthen und Klaerke 1999). Hingegen wirkt eine hohe mukosale  $[\text{NH}_4^+]$  hemmend auf den Harnstoffrückfluss (Harmeyer und Martens 1980; Kennedy und Milligan 1980). Bereits bei  $1,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} [\text{NH}_4^+]$  ist eine halb-maximale Inhibition erreicht. Die sehr rasch eintretenden Effekte deuten auf eine Herabregulation bereits exprimierter Transportproteine hin, wobei zusätzlich *in vivo* auch eine Verringerung der UT-B und/oder AQP3 Expression beteiligt sein könnte (Lu et al. 2014; Lu et al. 2015). Interessanterweise wird bei  $0,1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{NH}_4^+$  der Harnstoffrückfluss in den Pansen geringfügig aber signifikant stimuliert. Dieses könnte bei proteinarmer Fütterung die Stickstoffversorgung der Pansenmikroben begünstigen (Lu et al.

2014). Zu bedenken ist bei diesen Überlegungen allerdings, dass die Plasmaharnstoffspiegel bei proteinarmer Fütterung abnehmen. Trotz erhöhter Permeabilität des Pansens für Harnstoff können die tatsächlich ins Lumen gelangenden Harnstoffmengen abnehmen. Zusätzlich nimmt die renale Clearance für Harnstoff stark ab und damit auch die fraktionelle Ausscheidung, wodurch die Stickstoffeffizienz ansteigt.

Im alimentären Stickstoffüberangebot wird hingegen der größte Teil des in der Leber gebildeten Harnstoffs über die Nieren ausgeschieden. Dieses führt zu Protein- und Energieverlust, Leber- und Nierenbelastung mit zusätzlicher Belastung der Umwelt (Busch et al. 2003; Abdoun et al. 2006).

### 2.1.2. Ökologische Relevanz der Stickstoffausscheidung

Der Harnstoff im Blut, der nicht in den Pansen zurückfließt, wird über die Nieren sehr effektiv ausgeschieden ( $\sim 75 \text{ mL} \cdot \text{min}^{-1}$ ). Nur die physiologische Clearance von Kreatinin ist höher. Die Harnstoffausscheidung ist abhängig von der Wasserausscheidung. Ferner beruht die für die Wasserrückresorption entscheidende hohe Osmolalität im Nierenmark im Wesentlichen auf der interstitiellen Harnstoffkonzentration (Von Engelhardt et al. 2015). Bei einer geringen alimentären Stickstoff-Zufuhr wird kompensatorisch die Harnstoffkonzentration, die glomeruläre Filtrationsrate und die Harnstoffausscheidung reduziert (Eriksson und Valtonen 1982). In der Niere wird dann Harnstoff neben den sonst üblichen Harnstofftransportern UT-A2 und UT-B verstärkt über den Harnstofftransporter UT-A1 resorbiert (Starke et al. 2012). Im Vergleich zum Urin ist die Ausscheidung über den Dung relativ gleichbleibend.

Weitere stickstoffhaltige Verbindungen im Urin sind Ammoniak, Harnsäure, Kreatinin und Aminosäuren (Von Engelhardt et al. 2015). Die Mikroorganismen des Bodens, im Wasser oder auch im Kot setzen Harnstoff um (Abb. 3). Je nach Stickstoffzusammensetzung in Harn, Bodenbeschaffenheit und Witterung benötigt die Umsetzung einer Urinlache von Harnstoff zu  $\text{NH}_4^+$  bis zum Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) im Boden üblicherweise einige Wochen (Dijkstra et al. 2013).

Die Nitrifikation besteht aus zwei Reaktionsschritten, welche von *Nitrobacteriaceae* vermittelt wird: der Ammoniak-Oxidation (zu Nitrit:  $\text{NO}_2^-$ ) und der anschließenden Nitrat-Oxidation, in welcher dann Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) produziert wird (Wrage et al. 2001). Bereits in der Ammoniak-Oxidation entsteht als Nebenprodukt Distickstoffoxid ( $\text{N}_2\text{O}$ ). Zu unterscheiden ist die autotrophe von der heterotrophen Nitrifikation. Letztere ist eher in Pilzen vorzufinden und unterscheidet sich von den Enzymen her zur autotrophen Nitrifikation. Dadurch können organische Stickstofflieferanten wie Harnstoff direkt oxidiert werden (Wrage et al. 2001). Im Folgenden können Denitrifizierer, welche in verschiedenen Bakterien Gattungen wie *Bacillus* oder *Pseudomonas* zu finden sind, schrittweise  $\text{NO}_3^-$  zu  $\text{N}_2$  mit den Intermediaten  $\text{NO}$  und  $\text{N}_2\text{O}$  reduzieren. Bei niedrigen pH-Werten wird vermehrt  $\text{N}_2\text{O}$  freigesetzt, da  $\text{N}_2\text{O}$  Reduktasen im Säuren inhibiert sind. Auch ein Überangebot von  $\text{NO}_3^-$  und Sauerstoffarmut führt zu einer vermehrten  $\text{N}_2\text{O}$  Bildung in Relation zum Endprodukt  $\text{N}_2$ . Je nach Bodenbedingungen und vorherrschenden Mikroorganismen kann auch bereits  $\text{NO}_2^-$  aus der Ammoniak-Oxidation in die Denitrifikation eingebracht werden (Wrage et al. 2001).

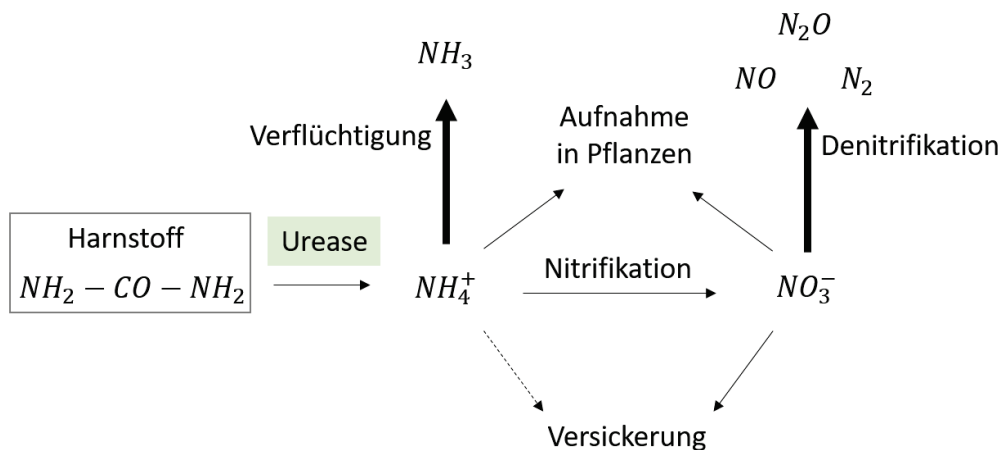


Abb. 3 Der vereinfachte, mikrobielle Harnstoffabbau in der Umwelt.

Harnstoff wird durch eine mikrobielle Urease hydrolysiert. Neben kleinen Mengen an flüchtigem Ammoniak, welches als Gas freigesetzt wird, kommt es bei neutralen pH-Werten überwiegend zur Bildung von Ammonium, welches von den Pflanzen und dem Boden aufgenommen werden oder zu Nitrat umgesetzt werden kann. Die Denitrifikation hat zur Folge, dass weitere klima- bzw. umweltrelevante Gase emittiert werden. Die Abbildung wurde modifiziert nach (Singh et al. 2013).

Die Landwirtschaft verursacht etwa 10-12 % der weltweiten, anthropogenen Klimagase.  $N_2O$  alleingegenommen stammt zu etwa 60 % aus der Landwirtschaft und gilt als drittichtigstes Klimagas nach  $CO_2$  und Methan (De Klein Cam 2010; Eckard et al. 2010). Der potentielle Einfluss von  $N_2O$  ist im Vergleich zu  $CO_2$  298 Mal größer eingeschätzt worden, auch wenn nur etwa 10 % des  $N_2O$  zu den ozonschädigenden Stickstoffdioxid ( $NO_2$ ) und Stickstoffmonoxid ( $NO$ ) umgesetzt werden (Ravishankara et al. 2009; Eckard et al. 2010).

Um die dabei aufkommende klimarelevante  $N_2O$  Emission zu reduzieren, wurden bereits unterschiedliche Ideen hinsichtlich der Fütterung, der Zucht und des Bodenmanagements erarbeitet und zusammengefasst (Eckard et al. 2010; Gerber et al. 2013). Dabei wurde u.a. das Protein-Energie Verhältnis thematisiert, welches z.B. in Frühlingsweiden für Rinder unausgewogen ist. Ferner versucht man den Proteinanteil, welcher unverändert den Pansen passiert, mithilfe von Tanninen (Polyphenole) zu erhöhen. Auch die Berücksichtigung von Wissen um die unterschiedlichen Aminosäuremuster von Körperproteinen und Milchproteinen mit effektiver Supplementierung limitierender Aminosäuren wie Lysin und Methionin könnte eine Futterproteinreduktion mit verringertem N-Ausstoß bewirken (Doepel et al. 2004; Arriola Apelo et al. 2014). Mithilfe einer erhöhten Mineralfütterung kann das Harnvolumen erhöht werden, was eine verminderte Stickstoffkonzentration im Urin bedingt, obschon die Gesamtausscheidung davon unberührt bleibt. Üblicherweise liegt die Stickstoffkonzentration des Urins zwischen 3 und 20  $g \cdot L^{-1}$  (Dijkstra et al. 2013). Bei genügend geringer Konzentrierung pro exponierter Fläche wird die Kapazität der  $N_2O$  Reduktase nicht überschritten, sodass als Endprodukt das unschädliche  $N_2$  entsteht. Erkannt wurde, dass unter anaeroben Bedingungen wie bei der Güllelagerung kaum  $N_2O$  entsteht. In Mastbetrieben oder bei Einstreusystemen kann aufgrund der großen Oberflächen und dem regelmäßigen Neueintrag ausreichend Sauerstoff an die Ausscheidungen gelangen, was die Fermentation und damit ein Freisetzen von  $NH_3$ ,  $N_2O$  und  $N_2$  in die Luft bewirkt (Dijkstra et al. 2013).

Bei den Verbesserungsideen hinsichtlich der Bodengestaltung wurden unterschiedliche Düngearten, die Häufigkeit, die Verteilung und der Zeitpunkt des Düngens genauer untersucht. Eine Idee stellt der Einsatz von Biokohle dar, welcher das Versickern von Nitraten verhindern und die Stickstoffemissionen verringern soll (Clough und Condron 2010). Zusätzlich wurde der Einsatz von Nitrifikations-Inhibitoren auf Flächen diskutiert, welche die Oxidation von  $NH_4^+$  zu  $NO_3^-$  unterbinden soll, sodass die  $N_2O$  Bildung vermindert wird. Hierbei wurde sogar eine Verfütterung von Nitrifikations-Inhibitoren erwogen. Ferner hemmten Urease-Inhibitoren die



mikrobielle Umsetzung von Harnstoff, sodass die Stickstoffemission reduziert und die Stickstoffaufnahme durch die Pflanzen erhöht wurde (Singh et al. 2013).

Die stickstoffhaltigen Verbindungen des Harnstoffabbaus  $N_2$  und  $NH_3$  stellen anders als  $NO$  und  $N_2O$  keine direkten Klimagas dar. Stickstoff ( $N_2$ ) ist mit 78 % der Hauptanteil der normalen Atmosphäre. Es handelt sich um ein inertes Luftgas, welches von Bakterien bzw. Archaeen mit dem Enzym Nitrogenase fixiert wird und damit in den terrestrischen Stickstoffzyklus zurückkehren kann. Indirekt können auch  $NO$  und  $N_2O$  über  $N_2$  wieder zurück in den Stickstoffzyklus gelangen, wenn das dabei entstehende Ammonium zum Aufbau von Biomasse genutzt werden kann (Stein und Klotz 2016). Aufgrund dieser globalen alimentären Bedeutsamkeit wurde bereits seit Anfang des 20. Jahrhunderts industriell Stickstoff mit Wasserstoff zu Ammoniak umgesetzt (Haber-Bosch Verfahren (Haber und Le Rossignol 1913)). Diese synthetischen  $NH_3$  Dünger bedeuten aber einen Eingriff in den natürlichen Stickstoffkreislauf, da sie in der Umwelt die Mengen an  $NO_3^-$  und  $N_2O$  zusätzlich steigern (Stein und Klotz 2016).

Der übermäßige Eintrag von Stickstoffverbindungen verursacht ein Ansäuern der Böden und Gewässer. Vor allem durch Überdüngung kommt es zu einer Abnahme der Speziesdiversität des nicht landwirtschaftlich genutzten Ökosystems. Als besonders gravierend müssen die Auswirkungen auf Oberflächenwasser gesehen werden. Die (anthropogene) Eutrophierung verursacht ein übermäßiges Algenwachstum und beschleunigt ein Verlanden von Seen (De Vries et al. 2001). Windverschleppung und Wolkenbewegungen können Stickstoffverbindungen auch auf Erde und Gewässer weit entfernt vom Verursachungsort eintragen (Behera et al. 2013). Neben dem Boden und dem Oberflächenwasser ist auch das Grundwasser von versickerndem  $NO_3^-$  gefährdet. Laut europäischer Nitratrichtlinie EU-RL 91/676/ EWG soll eine Nitratkonzentration von  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  nicht überschritten werden (De Vries et al. 2001). Hier herrscht mittlerweile dringender Handlungsbedarf, da bereits in Europa etwa 13 % der Grundwassermessstellen diesen Grenzwert übersteigen (Benekos et al. 2021). Zusätzlich sorgen  $NO_3^-$  Aerosole durch ihre Streuwirkung der Sonnenstrahlen indirekt für einen längeren Erhalt von Wolken, was auch bei Sulfataerosolen bekannt ist (Behera et al. 2013).

Die Reduzierung der Einträge von für Versauerung, Eutrophierung oder bodennahes Ozon verantwortlicher Stoffe wird nach der Richtlinie über die Reduktion der nationalen Emissionen bestimmter Luftschadstoffe (EU 2016/2284) gefordert. Zusätzlich soll diese Reduzierung auch durch die Stoffstrombilanzverordnung vom 14. Dezember 2017 (BGBl. I S. 3942; 2018 I S. 360) erwirkt werden.

### 2.1.3. Medizinische Relevanz des Stickstofftransports

Artübergreifend erfordert die Umsetzung von überschüssigem, körpereigenem Stickstoff zu Harnstoff Energie. Während der Harnstoffzyklus in der Leber stattfindet, erfolgt die Hauptausscheidung über die Nieren (Kues et al. 2021). Diese zwei Organe geraten daher besonders in den medizinischen Fokus. Bei Betrachtung der Stickstoffflüsse der Milchkuh wird etwa die Hälfte des Stickstoffs mit dem Urin ausgeschieden, während knapp ein Viertel jeweils durch Milch und Kot ausgeschieden werden. Nur knapp 2 % des Stickstoffs endet in der Haut und im Fell (Arriola Apelo et al. 2014).

Bei akutem Leberversagen resultieren  $NH_3/NH_4^+$ -Blutkonzentrationen von  $> 0,15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Ott und Vilstrup 2014). Diese beim Menschen gut untersuchte Hyperammonämie verursacht eine hepatische Enzephalopathie mit komplexer Pathogenese (Ott und Vilstrup 2014). Bereits ab  $[NH_3/NH_4^+] > 50 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  spricht man von einer Hyperammonämie, welche z.B. durch Leberzirrhosen, portosystemischen Shunt oder angeborenen bzw. medikamentverursachten Defekten des Harnstoffzyklus ausgelöst werden kann (Matoori und Leroux 2015).

Pathophysiologisch verursacht die Hyperammonämie eine erhöhte Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke und bewirkt eine zentrale Glutamin-Akkumulation (Gleichung 2), welche osmotisch zur Schwellung der Astrozyten führt. Patienten mit akutem Leberversagen sind davon stärker betroffen als Patienten mit Leberzirrhose, bei denen sich die  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  Konzentration im Blut graduell erhöht (Matoori und Leroux 2015). Gleichzeitig wird durch die erhöhte Glutamin-Synthese die Glutamat-Konzentration verringert, weswegen kompensatorisch  $\alpha$ -Ketoglutarat (Intermediat des Citratzyklus) in Glutamat umgewandelt wird (Barmore et al. 2021). Der zerebrale Stoffwechsel ist verändert, genauso die Neurotransmission. Ammoniak/Ammonium erhöht die extrazelluläre  $\text{K}^+$ -Konzentration der Astrozyten und führt zur verstärkten Aktivität des neuronalen  $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{2Cl}^-$ -Transporters, welches die kortikale, inhibitorische Neurotransmission stört (Matoori und Leroux 2015). Unter dieser Toxizität des Ammoniaks können beim Menschen undeutliche Sprache, grobschlägiges Zittern der Hände (Asterix), Vomitus, Krampfanfälle und Müdigkeit beobachtet werden (Matoori und Leroux 2015; Barmore et al. 2021). Diagnostisch können die gesunkene Blut-Harnstoffkonzentration idealerweise im Zusammenhang mit der gestiegenen  $[\text{NH}_3]$  im Blut Aufschluss geben (Barmore et al. 2021).

In Untersuchungen an Rindern wurde  $1,84 \text{ mmol NH}_3/\text{NH}_4^+ \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$  als maximale Leberkapazität ermittelt. Bei dementsprechender Infusionsrate von  $\sim 15 \text{ mmol} \cdot \text{min}^{-1}$  Ammoniumacetat blieb die arterielle Plasmakonzentration stabil bei physiologischen  $\sim 0,04 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Symonds et al. 1981). In diesem Experiment wurde außerdem beobachtet, dass bei steigender Ammoniuminfusion die Rinder zuerst vermehrt tranken und urinieren, dann Unruhe und eine übersteigerte Atmung zeigten. Eine deutliche klinische Manifestation wurde bei einer arteriellen  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  Konzentration von  $\sim 0,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  vermerkt. Die Tiere wurden neurologisch auffällig mit schwankendem Gang, zeigten unregelmäßige und unwillkürliche Muskelkontraktionen (Faszikulation) und der Kot wurde sehr flüssig. Festliegend wurden die Tiere ab einer arteriellen Blutkonzentration von  $\sim 0,8 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

Diese hier experimentell akut herbeigeführte Hyperammonämie kann, wie bereits beim Menschen beschrieben, auch beim Rind klinisch bei gestörter Leberfunktion (z.B. Leberzirrhose), infektiös bedingtem  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$ -Anfall oder auch Bypass des Leber-Blutflusses auftreten und eine hepatische Enzephalopathie bewirken. Die Astrozyten im Gehirn weisen eine intensive Umsetzung von  $\text{NH}_4^+$  in Glutamin auf (Gleichung 2). In den benachbarten Neuronen werden daraus die wichtigen Neurotransmitter Glutamat und  $\gamma$ -Aminobutyrat (GABA) synthetisiert. Bei Hyperammonämie und resultierender erhöhter Glutamin-Synthese erklären sich die neurologischen Symptome, die final zu Schläfrigkeit bis hin zur Apathie führen. Im Gehirn schwellen die Astrozyten an, welches ein generelles Hirnödeme nach sich ziehen kann (Kues et al. 2021). Experimentell wurden spongiforme Degenerationen des zentralen Nervensystems bei Rindern und Schafen beobachtet, die unter Lebervergiftung litten bzw.  $\sim 3$  Tage intravenös Ammoniumacetat erhielten (Hooper 1975; Cho und Leipold 1977). In einem anderen Experiment wurde bei einer subklinischen Hyperammonämie eine Hyperglykämie aufgrund verringerter Blutinsulinkonzentration festgestellt (Fernandez et al. 1988).

Auch eine Harnstoffvergiftung bewirkt beim Rind eine Hyperammonämie, die sich bereits akut klinisch zeigt, wie in Busch *et. al* und Kues *et. al* genauer dargestellt (Busch et al. 2003; Kues et al. 2021). Ursache ist hierbei eine übermäßige Verfütterung an NPN im Kraftfutter (z.B. Dosierfehler beim Harnstoffzusatz) oder eine versehentliche Aufnahme von Stickstoffdünger. Grundsätzlich kann die Harnstoff-Toxizitätsgrenze durch Gewöhnung der Rinder nach oben verschoben werden, wobei maximal 1 % Harnstoffgehalt in der gesamten Futterration empfohlen werden und Sojaschrot mit seinen natürlicherweise enthaltenen Ureasen einen beschleunigten Abbau bewirkt. Im Pansen umgesetzt zu Ammoniak mit nachfolgender Protonierung zu Ammonium verursacht das Übermaß einen Anstieg des Pansen pH-Wertes (Pansenalkalose). Die Permeation in die Blutbahn führt durch die nicht ausreichend schnelle

Entgiftung in der Leber zur Hyperammonämie.  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  kann den Citratzyklus hemmen. Zur Energiegewinnung bleibt die anaerobe Glykolyse, welche zu einer vermehrten Milchsäurebildung führt. Diese wiederum bedingt einen zellulären pH-Abfall, welcher vor allem im Nervensystem irreversible Schäden verursachen kann. Bereits innerhalb einer Stunde nach der überhöhten Harnstoffaufnahme können Symptome zutage treten wie Übererregbarkeit, Unruhe, vermehrter Harn- und Kotabsatz und eventuell Kolikerscheinungen. Zentralnervöse Symptome folgen mit Hypersalivation, verstärkter Schweißabsonderung, starrem Blick, Muskelzuckungen, Bewegungsstörungen bis hin zum Festliegen und Tachypnoe mit finaler Dyspnoe, wobei die Atemluft nach Ammoniak riecht. Unbehandelt kann dieses Syndrom innerhalb von Stunden letal enden. Sofortmaßnahmen beinhalten eine Verdünnung des Pansen NPNs und die Verlangsamung der Urease-Aktivität mit kaltem Wasser ( $> 50 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Interessanterweise soll auch Essiggabe (5 %ige Essigsäure,  $> 20 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) helfen, wobei dies zu einem Ansäuern des Panseninhaltes mit Verschiebung des Dissoziationsgleichgewicht zu Gunsten des  $\text{NH}_4^+$  führt (Kues et al. 2021).

Eine alimentär bedingte Hyperammonämie wurde auch bei Pferden beobachtet (Taylor 2002). Die witterungsbedingte Veränderung der Weidepflanzen verursachte in diesem Fall ein verändertes Mikrobiom im Dickdarm, welches zur exzessiven Resorption von  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  führte. Zusammengefasst als *mare reproductive syndrome* wurden bei den betroffenen Pferden geschlechtsunabhängig erhöhte Blutharnstoffwerte und Symptome wie Augenläsionen, hepatische Enzephalopathie, Perikarditis, Hufrehe (Laminitis) und vermehrt späte Aborte und kranke Neugeborene festgestellt (Taylor 2002).

Nicht nur akute, sondern auch chronische nutritive Überbelastung des Stickstoff-Stoffwechsels könnte pathophysiologisch bedeutsam sein. Diskutiert wird so unter anderem ein „Degenerationssyndrom“ des Rindes. Vermutet wird, dass die chronische Intoxikation durch  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  über eine Hemmung des Citratzyklus zum vermehrten Zelluntergang führt. Pathologisch soll es zu Veränderungen in der Niere (Glomerula- und Tubulusnephrose) und in der Leber (toxische Leberdegeneration) kommen (Schmack 2016). Im Zusammenhang mit anderen Faktoren könnte die übermäßige Belastung durch zu viel Protein zur beobachteten Verkürzung der Nutzungsdauer des Rindes von 2,4 (im Jahr 2000) auf 2,2 Laktationen (im Jahr 2008) beitragen, einhergehend mit gesunkener Lebensleistung (Schmack 2016).

Die physiologische Harnstoffkonzentration im Blut wird mit einer großen Breite zwischen  $0,1\text{-}0,4 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  bzw.  $1,6\text{-}6,6 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  angegeben. Allerdings zeigt sich auch bei nutritiv N-übersorgten Kühen eine Blutharnstoffkonzentration von  $0,25\text{-}0,40 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  und somit scheint dieser Parameter diagnostisch eher ungeeignet (Schmack 2016). Neben weiteren hinweisenden Parametern kann auch ein erhöhter Gesamtbilirubingehalt im Serum ( $> 1,5 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ ) auf eine Überlastung der Leber hinweisen (Schmack 2016), wobei hier pathophysiologisch sicherlich auch die Ketose in die Differenzialdiagnose einbezogen werden sollte (Von Engelhardt et al. 2015).

Auch beim Menschen verursacht eine bedarfsübersteigende Ernährung an Protein eine höhere Harnstoffkonzentration im Urin. Die *glomeruläre* Filtrationsrate erhöht sich, womit hämodynamische Verletzungen im *Glomerulus* auftreten können (Kramer 2019; Kues et al. 2021). Der hohe Proteingehalt in Ziegenmilch ist einer der Gründe, warum eine Gabe an menschlichen Neugeborenen zu schwersten Erkrankungen führt (Maines et al. 2017).

### Ammoniak in der Luft

Ammoniak ( $\text{NH}_3$ ) wird als farbloses Gas mit „stechendem“ Geruch beschrieben, welches auch Menschen als deutlich augen- und nasenreizend empfinden können (Dirksen et al. 2002).  $\text{NH}_3$ -Emissionen werden hauptsächlich durch Nutztierbestände und Stickstoffdünger verursacht (Behera et al. 2013).

Für Ammoniak in der Luft gelten laut Tierschutz-Nutztierhaltungsverordnung für Kälber, Schweine, Kaninchen, Legehennen und Masthühner Grenzwerte für den Aufenthaltsbereich von 20 Kubikzentimeter je Kubikmeter Luft. Die medizinische Bedeutsamkeit, welche von Konzentration und Expositionszeit des  $\text{NH}_3$  abhängt, wurde u.a. in einem Experiment an Ratten untersucht, wo bereits kurzzeitige  $\text{NH}_3$ -Exposition angestrengte Atmung und Speicheln, nach längerer Exposition auch akute Lungenentzündungsreaktionen verursachten (Elfsmark et al. 2019). Der  $\text{LC}_{50}$  wurde bei Ratten bei einer Exposition für 60 min im Bereich zwischen 7338 und 16600 ppm  $\text{NH}_3$  ermittelt (Elfsmark et al. 2019). Auch bei Broilern wurde bereits bei einer Konzentration von 100 ppm  $\text{NH}_3$  in der Luft (für 4-7 Tage) hämorrhagische Lungenveränderungen beobachtet (Al-Mashhadani und Beck 1985). Bei Schweinen wurden über einen längeren Zeitraum bei erhöhter  $\text{NH}_3$ -Konzentration (zwischen 20-30 ppm) ein erhöhtes Auftreten von Pleuritis Läsionen festgestellt (Michiels et al. 2015). Eine Konzentration über 5000 ppm soll beim Menschen akutes Lungenversagen und -ödeme hervorrufen (Elfsmark et al. 2019). Bei Personen, die berufsbedingt in Nutztierhaltungen arbeiten oder in direkter Umgebung zur Nutztierbeständen leben, wurde eine verschlechterte Lungenfunktion beobachtet (Borlée et al. 2017). In der deutschen Gefahrenstoffverordnung ist daher für  $\text{NH}_3$  ein Arbeitsplatzgrenzwert von  $20 \text{ mL} \cdot \text{m}^{-3}$  festgesetzt worden.

Im Stall gehaltene Rinder zeigen bei einer  $\text{NH}_3$ -Vergiftung über die Luft anhaltenden Tränenfluss, Nasenausfluss, oberflächliche Atmung und Teilnahmslosigkeit, wobei die Schleimhautschäden wegbereitend für pathogene Keime sein können (Dirksen et al. 2002). Bei langanhaltend hoher  $\text{NH}_3$ -Konzentration stellt sich eine verminderte Futteraufnahme mit verringerter Gewichtszunahme ein (Dirksen et al. 2002). Akute, stark überschießende  $\text{NH}_3$ -Vergiftungen zeigen sich bei Rindern in Form von hochgradiger Atemnot mit Lungenödem, Speicheln und schaumig-blutig bis schleimig-eitrigem Nasenausfluss (Dirksen et al. 2002).

### Nitrat

Der Einfluss von Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ) in der menschlichen Ernährung (über z.B. Trinkwasser und Gemüse) wird kontrovers beurteilt (Bondonno et al. 2016). Kausale pathologische Auswirkung auf die menschliche Gesundheit werden bei der Methämoglobinämie des Säuglings, ferner bei Dickdarmkrebs und Schilddrüsenerkrankungen gesehen (Ward et al. 2018). Da neben Oberflächenwasser und Boden auch Grundwasser von versickernden  $\text{NO}_3^-$  gefährdet ist, wurde ein Grenzwert von  $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  festgesetzt (EU-RL 91/676/ EWG).

Unbestritten ist die Toxizität von erhöht eingetragenen Nitrat ( $> 10 \text{ mg NO}_3\text{-N} \cdot \text{L}^{-1}$ ) für viele wasserlebende Tiere (Süß- und Salzwasser) (Camargo et al. 2005).

Auch beim Rind wurde eine Toxizität von Nitrat bzw. Nitrit festgestellt, die nach Verfütterung stark gedüngten Grünfutters (hier *Pennisetum purpureum*) auftreten kann (Gontijo et al. 2017; Efsa et al. 2020). Neben der Witterung spielt auch eine unzureichende Adaptationsphase an Futterumstellungen eine Rolle. Im Verlauf der mitunter tödlich verlaufenden Intoxikation zeigten sich braun gefärbte Schleimhäute, eine grau-blaue Zunge, Sialorrhö, Dyspnoe, Tympanie und Dekubitus am Sternum (Gontijo et al. 2017). Nitrat selbst ist wenig giftig, wird aber fermentativ zum gefährlichen Nitrit umgesetzt. Nitrite können mit biogenen Aminen kanzerogene Nitrosamine bilden. Außerdem kommt es bei hohen Nitrit-Dosen akut zur Umwandlung von Oxyhämoglobin zu Methämoglobin, welches nur noch eine sehr geringe Sauerstoffkapazität aufweist (Efsa et al. 2020; Omer et al. 2021). Auf Grundlage dieser Pathologie wurde ein  $\text{BMDL}_{10}$  von 64 mg Nitrat pro kg Körpergewicht pro Tag ermittelt (Efsa et al. 2020).

## 2.2. Ammoniak- und Ammoniumtransport im Pansenepithel

### 2.2.1. Histologie des Pansens

Der Pansen ist wie die anderen Teile des Vormagens mit einer drüsenlosen Schleimhaut (*Pars nonglandularis*) überzogen und entwickelte sich aus dem Oesophagus (Mutoh und Wakuri 1989; Weyrauch et al. 2009). Sowohl das Ausmaß der Oberflächenvergrößerung durch Pansenzotten (*Papillae ruminis*), als auch die Ausprägung der einzelnen Schichten des Pansenepithels sind abhängig von der Fütterung. Eine ausschlaggebende Rolle spielt die Konzentration an SCFA im Panseninhalt (Liebich 2010; Liu et al. 2019) (siehe 2.5.1).

Das ruminale *Epithelium mucosae* kann als mehrschichtiges, verhornendes Plattenepithel (laut Nomina Histologica Veterinaria 2017: *Epithelium stratificatum cornificatum*, engl. *cornified stratified epithelium*) charakterisiert werden (Dobson 1955; Graham und Simmons 2005; Weyrauch et al. 2009). In der darunterliegenden *Lamina propria mucosae* (Subepithelium) befinden sich die Blutgefäße, welche ebenfalls innerhalb jeder Pansenzotte liegen (Weyrauch et al. 2009). Der Feinaufbau des Epithels beginnt mit dem *Stratum basale*, dem die Zellen des *Stratum spinosum profundum* und des *Stratum spinosum superficiale* aufliegen (Weyrauch et al. 2009). Die Dichte an  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPasen und Mitochondrien nimmt zum *Stratum basale* zu (Graham und Simmons 2005; Stewart et al. 2005; Steele et al. 2011). Das darüber liegende *Stratum granulosum* bildet mit den Zell-Zell Verbindungen (Desmosomen und Tight Junctions) eine Permeabilitätsbarriere. Das *Stratum corneum* schließt das Epithel als physikalische Barriere aus verhornten Keratinozyten (bzw. Korneozyten) ab (Graham und Simmons 2005; Stewart et al. 2005; Weyrauch et al. 2009; Steele et al. 2011).

Ussings transportphysiologische Untersuchungen an der Froschhaut (Ussing und Zerahn 1951; Koefoed-Johnsen und Ussing 1958; Jared und Rao 2017) führten vor über 50 Jahren zum Modell von mehrschichtigen Epithelien als funktionelles Synzytium mit zwei transportierenden Membranen. Erstmals wurde dabei erkannt, dass die apikale  $\text{Na}^+$  Aufnahme des Epithels über einen Kanal (ENaC) in der obersten Zellschicht erfolgt und sekundär aktiv von der basolateralen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase angetrieben wird. Hierdurch wird ein transepithelialer Kurzschluss-Strom erzeugt. Sowohl der durch die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase aufgebaute Ionengradient als auch das transepitheliale Potential stellen eine wichtige Triebkraft vieler trans- und parazellulärer Transportprozesse dar (Koefoed-Johnsen und Ussing 1958; Graham und Simmons 2005; Stumpff et al. 2011; Jared und Rao 2017).

Das ruminale Epithel stellt wie die Haut des Frosches ein funktionelles Synzytium dar (Stumpff et al. 2011). Unter Anwendung des Modells von Ussing sind die transportphysiologischen Verhältnisse im ruminalem Epithel daher funktionell ähnlich zu den einschichtigen Epithelien der anderen Verdauungsabschnitte (Liebich 2010). Die Barriere zum ruminalem Lumen bildet die apikale Membran des *Stratum granulosum*, gefolgt von mehreren Zellschichten bis hin zum *Stratum basale*, die sich wie ein einziges Kompartiment verhalten, angrenzend zur Basalmembran. Die vitalen Epithelzellen dieses Kompartiments sind über Gap Junctions und die darin gebündelten interzellulären Kanäle miteinander verbunden, welche der Kommunikation und dem Stofftransport dienen (Mese et al. 2007). Dabei wurden in den ruminalem *Strata basalia*, *spinosa* und *granulosa* immunhistologisch Connexin 43 nachgewiesen, ein in Säugern ubiquitär vorkommendes Gap Junction Protein (Graham und Simmons 2005). Mithilfe dieser Gap Junctions kommt es innerhalb des funktionellen Synzytiums zum selektiven Austausch von Ionen, Second Messengern und kleinen Molekülen (z.B. Glukose, SCFA). Somit können resorbierte Stoffe durch die verschiedenen Schichten hindurch von der apikalen Membran zur basolateralen Membran transportiert werden, umgekehrt kann der Rückfluss stattfinden, wie z.B. von Harnstoff (siehe 2.1.1). Außerdem tragen Gap Junctions zur Koordination der Differenzierung, des Wachstums und des Metabolismus im Gewebe bei (Mese et al. 2007).

In der Epidermis bilden die Tight Junction Proteine in Interaktion mit anderen Faktoren die Hautbarriere und werden ausgeprägt vom *Stratum granulosum* exprimiert. Immunhistologisch wurden auch einige Tight Junctions im *Stratum spinosum* (z.B. ZO-1, Claudin-4) und andere in allen Schichten (z.B. Claudin-1) nachgewiesen (Basler et al. 2016). Im ruminalen Gewebe trägt die ähnliche Tight Junction Verteilung von Occludin, Claudin-1, 4 und 7 bedeutend zur Permeabilitätsbarriere bei (Graham und Simmons 2005; Stumpff et al. 2011; Rabbani et al. 2018). Diese Barriere hält den großen Konzentrationsgradienten von Cl<sup>-</sup> (Blut > Pansen); K<sup>+</sup>, SCFA und H<sup>+</sup> (Pansen > Blut) aufrecht (Stumpff et al. 2011).

### 2.2.2. Ammoniumkonzentration im Pansen

Im Pansen liegen bei physiologischem pH von ~ 6,25 etwa 99,9 % Ammonium (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) und 0,1 % Ammoniak (NH<sub>3</sub>) vor (Abdoun et al. 2006; Von Engelhardt et al. 2015). Dies ist mithilfe der Handerson-Hasselbalch-Gleichung (Gleichung 4) rechnerisch nachvollziehbar bei einem Ammonium-pK<sub>a</sub> Wert von 9,25 (Ott und Vilstrup 2014).

$$(4) \text{pH} = \text{pK}_a + \log_{10} \frac{[\text{Base}]}{[\text{Acid}]}$$

$$10^{-(9,25-6,25)} = \frac{[\text{NH}_3]}{[\text{NH}_4^+]}$$

$$\text{NH}_4^+ \rightleftharpoons \text{NH}_3 + \text{H}^+$$

Abhängig von der Stickstoff-Zufuhr, Assimilationsrate durch Mikroorganismen und dem Abstand zur letzten Fütterung, kann die Konzentration von NH<sub>3</sub> im Pansen in einem weitem Spektrum schwanken, wobei ein Bereich zwischen 3-6 mmol · L<sup>-1</sup> als Optimum für die mikrobielle Synthese postuliert wurde (Rodríguez et al. 2007). Von anderen Autoren werden 1-3 mmol · L<sup>-1</sup> als Optimum vorgeschlagen (Slyter et al. 1979). Während mikrobielle Proteinsynthese und die Absorption über das Pansenepithel die Konzentration an NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> senken, sorgt der Rückstrom von Harnstoff neben der Nahrungsaufnahme für eine Konzentrationserhöhung (Rodríguez et al. 2007).

### 2.2.3. Mechanismen des Transports

Grundsätzlich kann über eine NH<sub>3</sub> oder NH<sub>4</sub><sup>+</sup> Aufnahme diskutiert werden. Eine zelluläre Aufnahme als neutrales bzw. gasförmiges NH<sub>3</sub> erfolgt ohne elektrophysiologische Veränderungen (elektroneutral) und bewirkt ein intrazelluläres Alkalisieren. Eine Depolarisation des Cytosols, die gegebenenfalls mit einer Ansäuerung verbunden ist, spricht hingegen für die elektrogene Aufnahme von NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (Roos und Boron 1981). An Epithelien erwartet man bei mukosaler Applikation von NH<sub>4</sub>Cl analoge Veränderungen auf der basolateralen Seite.

Klassisch wurde von einer einfachen Diffusion des ungeladenen NH<sub>3</sub> durch die Lipidmembran ausgegangen. Aufgrund des großen Dipolmoments von NH<sub>3</sub> (~ 1,5 Debye) mit seinen beiden freistehenden Elektronen ist dieses nach heutigem Erkenntnisstand kaum vorstellbar. Sehr gut belegt ist so mittlerweile, dass das Wassermolekül (~ 1,8 Debye) biologische Membranen nicht in ausreichendem Maße durchdringen kann und das hierfür vielmehr Aquaporine (AQP) notwendig sind (Weiner und Verlander 2019). Damit ist auch eine Regulation möglich, z.B. bei der Harnausscheidung in der Niere. In einer Studie mit künstlichen Membranen (*planar bilayer*) wurde gemessen, dass AQP8 neben Wasser auch NH<sub>3</sub> effizient leiten kann (Saparov et al. 2007). AQP3, 6, 7 und 8 wurden zumindest beim Menschen bereits als NH<sub>3</sub> Transporter identifiziert (Azad et al. 2021). Für die ruminale Expression von AQP3 durch den Pansen gibt es eine solide Datenlage, wobei neben NH<sub>3</sub> auch Harnstoff als Substrat in Frage kommt (Zhong et al. 2020). Eine Kausalität zwischen proteinreicher Fütterung und gesteigerter

Expression von AQP3 wird vorgeschlagen und eine Beteiligung von AQP7, 8 und 10 wird diskutiert (Røjen et al. 2011; Berends et al. 2014).

Ferner wurden zunächst in der Niere und später auch an zahlreichen anderen Organen die Rhesus Glykoproteine als Transportwege für die nicht-protonierte Form ( $\text{NH}_3$ ) identifiziert (Weiner und Verlander 2011; Weiner und Verlander 2014; Hamm et al. 2015; Matoori und Leroux 2015; Weiner und Verlander 2019). Am Gastrointestinaltrakt von Mäusen sind so RhBG (apical) und RhCG (basolateral) als  $\text{NH}_3$  Transporter anhand von Protein und mRNA Untersuchungen belegt (Handlogten et al. 2005). Zu bedenken ist hierbei allerdings, dass bei einer RNA Sequenzierungsstudie an Schafen kein RhBG und RhCG im Pansen entdeckt wurde (Xiang et al. 2016).

Funktionell wird sowohl bei AQP als auch bei Rhesus Glykoproteinen von einer Bindung des  $\text{NH}_4^+$  an das Transportprotein ausgegangen, welches die Bildung von  $\text{NH}_3$  katalysiert. Das  $\text{NH}_3$  gelangt dann elektroneutral in die Zelle hinein. Durch folgende Anlagerung eines Protons entsteht erneut  $\text{NH}_4^+$ , was zu einer Alkalisierung des Cytosols führt (Neuhäuser et al. 2014). Funktionell entspricht dieser Aufnahmeweg also der klassischen Lipiddiffusion, ist aber wesentlich effizienter.

Die These, dass neben der ungeladenen Form ( $\text{NH}_3$ ) auch die protonierte Form ( $\text{NH}_4^+$ ) von Epithelien transportiert werden kann, entstand ursprünglich in der Nierentransportphysiologie, wo der  $\text{NH}_3$  Metabolismus einen kritischen Einfluss auf den Säure-Basen Haushalt hat. Im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife wird durch den gekoppelten  $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-2Cl}^-\text{-CoTransport}$  und durch apikale  $\text{K}^+$  Kanäle (ROMK) neben  $\text{K}^+$  auch  $\text{NH}_4^+$  transportiert. Ferner wird eine Nutzung der  $\text{Na}^+\text{/K}^+$  ATPase durch  $\text{NH}_4^+$  diskutiert (Knepper 1991; Chepilko et al. 1995). Erklärt wurde diese Substitution durch den fast identischen Ionenradius von  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{K}^+$  ( $\sim 0,15$  nm) (Knepper 1991; Chepilko et al. 1995; Bödeker und Kemkowski 1996). Es gibt auch Hinweise für einen Transport von  $\text{NH}_4^+$  durch  $\text{Na}^+\text{/H}^+\text{-Austauscher}$  und  $\text{H}^+\text{/K}^+$  ATPasen der Niere (Weiner und Verlander 2011; Hamm et al. 2015). Ussing Kammer Daten belegen, dass auch am Pansen große Mengen an  $\text{NH}_4^+$  über einen elektrogenen Weg transportiert werden, wobei es zur Depolarisation der apikalen Membran und des ganzen Epithels kommt (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al. 2003; Abdoun et al. 2005; Lu et al. 2014; Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018).

#### 2.2.4. Transport über das Pansenepithel

Bereits 1948 wurde beschrieben, dass  $\text{NH}_3$  über das Pansen- oder Darmepithel resorbiert werden kann (McDonald 1948). Zu diesem Zeitpunkt waren bereits andere Bestandteile des ruminohepatischen Kreislaufs und die Stellung des  $\text{NH}_3\text{/NH}_4^+$  als ruminales Intermediat zwischen mikrobiellem Harnstoff- bzw. Proteinabbau und Proteinaufbau erkannt worden (McDonald 1948). Hierbei ging man zunächst von einer einfachen Diffusion des ungeladenen  $\text{NH}_3$  aus. Es wurde aber schon früh bemerkt, dass die Resorptionsrate von  $\text{NH}_3$  mit absinkendem pH-Wert nicht in dem Maße abnahm, wie die Konzentration nach Gleichung 4 zu erwarten lässt (Gärtner 1963). Es wurde postuliert, dass etwa 16-80 % des ruminalen Stickstoffs als  $\text{NH}_3$  die Pansenwand passieren, wobei in der Folge immer wieder gezeigt wurde, dass die hohen Prozentsätze bei hochenergetischen Fütterungen auftreten (Huntington 1986). Bei dieser Fütterungsweise sinkt der Pansen-pH ab und eigentlich sollte dann die  $\text{NH}_3$  Resorption aus dem Pansen deutlich absinken. In unterschiedlichsten Fütterungsstudien wurde hingegen beobachtet, dass eine erhöhte Konzentrat Aufnahme mit pH Absenkung im Rumen keinen Einfluss auf die Harnstoffausscheidung und auch  $\text{NH}_3\text{-N}$  Emission hatte (Lascano et al. 2008; Agle et al. 2010; Aguerre et al. 2011). Damit wird auch die Wirkungsweise der Therapie mit Essigsäure bei Harnstoffvergiftung zweifelhaft (Kues et al. 2021). Dennoch wurde weiterhin von einer  $\text{NH}_3$  Aufnahme ausgegangen. Intrazellulär

würde dabei die Protonenabgabe der SCFA bzw. des  $\text{CO}_2\text{-HCO}_3^-$  Systems  $\text{NH}_3$  zu  $\text{NH}_4^+$  umsetzen, was wiederum die Triebkraft zur apikalen Aufnahme von  $\text{NH}_3$  erhöht (Bödeker et al. 1992a; Bödeker et al. 1992b).

Zweifel an der These einer einfachen Diffusion von  $\text{NH}_3$  durch die Lipidmembran kamen auf, nachdem in Ussing Kammer Versuchen an Pansenproben vom Schaf und vom Rind gezeigt wurde, dass bei *mukosaler*  $\text{NH}_4\text{Cl}$  oder  $\text{KCl}$  Zugabe stets eine Erhöhung des Kurzschlussstroms beobachtet wurde (Bödeker und Kemkowski 1996; Abdoun et al. 2005; Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018). Dies indizierte die Beteiligung eines elektrogenen Transportmechanismus von positiv geladenen Ionen ( $\text{NH}_4^+$ ) von apikal nach basolateral (Bödeker und Kemkowski 1996). Nach Block der  $\text{K}^+$  bzw.  $\text{NH}_4^+$  Ströme durch Chinidin wurde vorgeschlagen, dass der elektrogene Transport durch ein Chinidin-sensitives Transportprotein vermittelt sei. Bestätigt wurde die Expression Chinidin-sensitiver und für  $\text{K}^+$  und  $\text{NH}_4^+$  durchlässiger Kanäle durch Patch-Clamp Untersuchungen (Abb. 4) an Zellen des Pansenepithels (Abdoun et al. 2005).

In der Folge wurde die  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{NH}_4^+$  Aufnahme in Ussing Kammer Versuchen an Schafepithelien genauer untersucht. An Epithelien von mit Heu gefütterten Schafen wurde bei einem pH-Wert von 7,4 wie damals erwartet festgestellt, dass  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  die  $\text{Na}^+$  Resorption des Pansenepithels hemmt (Abdoun et al. 2003). Es erscheint wahrscheinlich, dass unter diesen Versuchsbedingungen die Aufnahme von  $\text{NH}_3$  überwiegt, welche möglicherweise über AQP3 vermittelt wird (Zhong et al. 2020). Die intrazelluläre Bildung von  $\text{NH}_4^+$  alkalisiert, sodass Protonen für den Antrieb des apikalen  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Austauschers (NHE) fehlen (Abdoun et al. 2003). Allerdings war der mukosale pH bei diesen Versuchen weit höher als der physiologische, ruminale pH-Wert von 6,4.



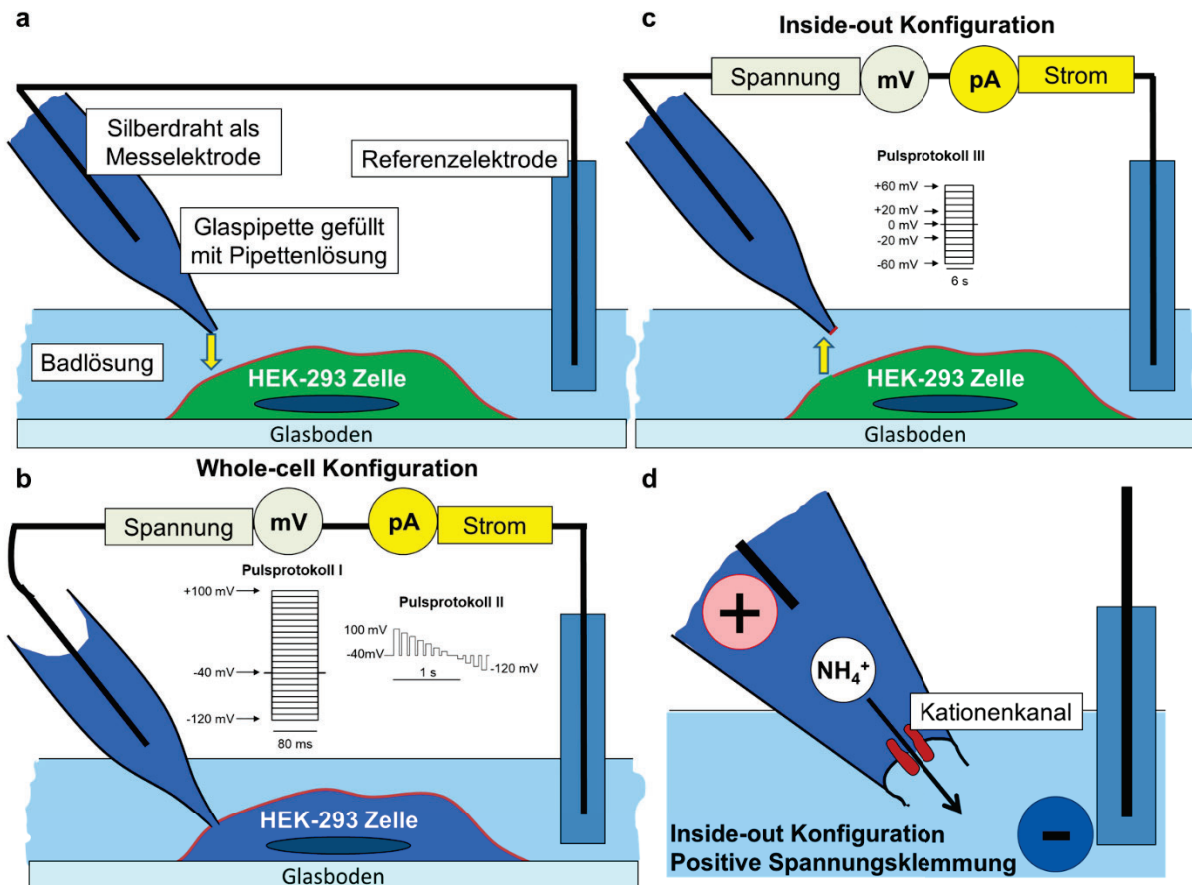


Abb. 4 Die Patch-Clamp Technik

a) Eine HEK-293 Zelle wird elektrophysiologisch untersucht, wozu eine Glaspipette auf die Zellmembran gefahren wird, bis sich ein hoher Widerstand bildet ( $> 1 \text{ G}\Omega$ ; „Gigaohm-Seal“). Es kann je nach Fragestellung eine Ganzzellmessung (*whole-cell* Konfiguration, b) oder eine Einzelkanalmessung (*inside-out* Konfiguration, c und d) erfolgen. b) Bei der *whole-cell* Konfiguration wird die Zelle durch Unterdruck geöffnet, sodass die Pipettenlösung die Zelle füllt. Anschließend werden positive und negative Spannungen angelegt und der Strom gemessen (Pulsprotokoll I und II). c) Bei der *inside-out* Konfiguration wird hingegen ein kleines Membranstück durch die Pipette aus der Zelle entnommen, welches dann nah an der Badoberfläche auf positive und negative Spannungen geklemmt wird (Pulsprotokoll III). d) Im Detail zeigt sich bei der *inside-out* Konfiguration ein Kationenkanal im Membranstück. Bei positiver Spannung können Kationen aus der Pipettenlösung (z.B.  $\text{NH}_4^+$ ) durch einen Kationenkanal in die Badlösung strömen, was mithilfe eines Messverstärkers mit integriertem Analog-Digital-Wandler (EPC9, HEKA Elektronik, Lambrecht) am Computer aufgenommen und ausgewertet werden kann. Text und eigenkonzipierte Abbildung nach (Neher und Sakmann 1976; Numberger und Draguhn 1996)

Ganz eindeutig andere Ergebnisse zeigten sich jedoch an Epithelien von Schafen, die an Konzentratfutter adaptiert worden waren. Nach Gabe von  $\text{NH}_4^+$  steigerte sich auch beim pH 7,4 die  $\text{Na}^+$  Resorption (Abdoun et al. 2003). In einer späteren Untersuchung wurde der luminal pH-Wert als Einflussfaktor herausgearbeitet (Abdoun et al. 2005). Es konnte bestätigt werden, dass luminales  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  beim pH von 7,4 die  $\text{Na}^+$  Resorption hemmt, während beim für den Pansen physiologischen pH von 6,4 sich stets eine deutliche Steigerung der  $\text{Na}^+$  Resorption zeigte (Abdoun et al. 2005). Flux-Untersuchungen (Abdoun et al. 2003; Abdoun et al. 2005) des  $\text{NH}_3$  Transportes deckten auf, dass beim pH von 7,4 überwiegend  $\text{NH}_3$  resorbiert wurde, beim pH von 6,4 hingegen in etwa 70 % in Form von  $\text{NH}_4^+$  und lediglich 30 % als  $\text{NH}_3$  resorbiert wird. Dabei kommt es auch basolateral zu einem diskreten pH-Abfall, der allerdings nur dann zu sehen ist, wenn die basolaterale Lösung schwach gepuffert ist (Rabbani et al. 2018). Im Cytosol dissoziiert  $\text{NH}_4^+$  teilweise zu  $\text{NH}_3$ , welches die Zelle über die apikale oder basolaterale Membran wieder verlässt oder aber in Zellorganellen gespeichert und/oder metabolisiert wird (Bödeker et al. 1992b; Musa-Aziz et al. 2009; Liebe et al. 2021). Dieser

Austritt an  $\text{NH}_3$  könnte ein Grund für den pH-Abfall und die Stimulation der  $\text{Na}^+$  Transportraten durch den NHE darstellen (Abdoun et al. 2005).

In weiteren Ussing Kammer Versuchen am Rinderpansen zeigten Bumetanid und Furosemid keinen Einfluss auf die  $\text{Na}^+$  Fluxraten, womit der NKCC als möglicher Aufnahmemechanismus für  $\text{NH}_4^+$  ausgeschlossen wurde (Martens et al. 1991). Ein theoretisch denkbarer  $\text{K}^+/\text{H}^+$  Austauscher als  $\text{NH}_4^+$  Transporter wäre nicht elektrogen und konnte bisher im Pansen nicht nachgewiesen werden (Abdoun et al. 2006). Stattdessen stimulierte eine transepitheliale Potentialdifferenz von -25 mV (basolateral negativ) den Ammoniumstrom, während dieser durch ein Potential von +25 mV gehemmt wurde. Abdoun *et al.* schlussfolgerten auf Basis dieser Erkenntnisse, dass ein elektrogener Mechanismus für die apikale  $\text{NH}_4^+$  Aufnahme des Rumens verantwortlich sei (Abdoun et al. 2006). Hierbei wurde zunächst an einen  $\text{K}^+$  Kanal gedacht, unter anderem aufgrund der ähnlichen biophysikalischen Eigenschaften von  $\text{K}^+$  und  $\text{NH}_4^+$ .

Im Einklang mit dieser Hypothese einer Aufnahme von  $\text{NH}_4^+$  durch nicht-selektive Kationenkanäle standen die Ergebnisse mit doppellumigen pH-sensitiven Mikroelektroden. Hierdurch konnte gezeigt werden, dass die Resorption von  $\text{NH}_4^+$  im nativen ruminalen Epithel vom Schaf und vom Rind eine Depolarisation mit gleichzeitiger intrazellulärer Ansäuerung verursachte (Lu et al. 2014; Rosendahl et al. 2016). Unerwartet kam es in diesen Versuchen nicht nur bei pH 6,4, sondern auch bei pH 7,4 zu einem intrazellulären pH-Abfall, so dass auch beim pH von 7,4 von einer starken Aufnahme von  $\text{NH}_4^+$  auszugehen ist.

### 2.3. Ammoniumtransport durch divalent-sensitive, nicht-selektive Kationenkanäle

Im vorigen Abschnitt wurden die unterschiedlichen Aufnahmewege im Pansenepithel beleuchtet. Diskutiert wurde die  $\text{NH}_3$  Aufnahme über die lipide Diffusion, über Rhesus Glykoproteine und AQP. Diese Aufnahmemechanismen erklären aber weder den induzierten Kurzschlussstrom, noch das Ansäuern des Epithels mit Stimulation der Natriumresorption durch den NHE. Auch Messungen des Ammonium Fluxes und Versuche mit pH-sensitiven Mikroelektroden belegen eine transzelluläre Resorption in der Form des  $\text{NH}_4^+$  als Hauptaufnahmeweg. Es stellt sich die Frage nach dem verantwortlichen Transportprotein.

In Untersuchungen am Pansenepithel hatte sich gezeigt, dass der Kurzschlussstrom durch das Entfernen von mukosalen, divalenten Kationen ( $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$ ) gesteigert wird (Leonhard et al. 1990; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002). Neben  $\text{Na}^+$  wurde auch für den Cäsium ( $\text{Cs}^+$ ), Rubidium ( $\text{Rb}^+$ ) und  $\text{K}^+$  Transport eine Hemmbarkeit durch divalente Kationen gezeigt (Leonhard et al. 1990; Schultheiss und Martens 1999). In Patch-Clamp Messungen an kultivierten ruminalen Epithelzellen zeigte sich eine Permeabilitätsreihenfolge  $\text{K}^+ > \text{Cs}^+ > \text{Na}^+$  (Leonhard-Marek et al. 2005). In diesen Messungen konnte ferner nachgewiesen werden, dass der Block dieser nicht-selektiven Kationenleitfähigkeit durch divalente Kationen spannungsabhängig war. Bei Depolarisation der Zelle löst sich der Block durch externes  $\text{Ca}^{2+}$  oder  $\text{Mg}^{2+}$ , so dass die Leitfähigkeit für monovalente Kationen steigt. Damit könnte die am Pansenepithel beobachtete Spannungsabhängigkeit der  $\text{Na}^+$  Leitfähigkeit auf der Expression divalent-sensitiver Kationenkanäle beruhen (Lang und Martens 1999). Bei hohen  $\text{K}^+$  Konzentrationen im Pansen steigt durch Depolarisation der apikalen Membran kompensatorisch die  $\text{Na}^+$  Aufnahme, was der Osmoregulation dienen könnte (Lang und Martens 1999; Leonhard-Marek et al. 2005). Zugleich dürfte durch die nicht-selektive Leitfähigkeit vermehrt  $\text{K}^+$  ins Pansenlumen sezerniert werden, welches sich positiv auf die Kaliumhomöostase des Tieres auswirken dürfte. Die Kaliumkonzentrationen im Pansenlumen erreichen dabei Werte um  $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Scott 1966). Allerdings reduziert sich dabei die Aufnahme von  $\text{Mg}^{2+}$  (Leonhard-Marek et al. 2005), welches eine wesentliche Rolle bei der

Pathogenese der Weidetetanie spielt (Martens und Schweigel 2000). Aufbauend auf diesen Arbeiten zeigte sich, dass auch die ruminale  $\text{NH}_4^+$  Leitfähigkeit divalent-sensitiv war (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018). In Patch-Clamp Untersuchungen wurde die  $\text{NH}_4^+$  Leitfähigkeit von kultivierten Pansenzellen bestätigt, welche bei Entfernung der divalenten Kationen eine gesteigerte Stromantwort für  $\text{NH}_4^+$  zeigten (Rosendahl et al. 2016).

Zum Durchbruch kam es, als gezeigt werden konnte, dass Menthol und Thymol den  $\text{NH}_4^+$  induzierten Strom stimulierten (Rosendahl et al. 2016). Zunächst wurde an die Expression des Menthol-sensitiven TRPM8 gedacht, der jedoch mittels qPCR nicht nachweisbar war. Auch mRNA für TRPV1 konnte nicht detektiert werden. In Rinder- und Schafproben wurde mithilfe der qPCR allerdings mRNA für TRPV3, TRPV4, TRPM6 und TRPM7 nachgewiesen (Rosendahl et al. 2016). Die Expression von TRPA1 war kaum oder gar nicht nachweisbar (Rabbani et al. 2018). Die Expression der klassischen epithelialen Calciumkanäle TRPV5 und TRPV6 konnte im Pansen nicht nachgewiesen werden, obschon funktionell Calciumkanäle vorhanden sein müssten (Wilkins et al. 2011; Schröder et al. 2015). Bereits 2008 wurde eine Expression von TRPM7 im Pansen nachgewiesen (Schweigel et al. 2008), wobei TRPM7 und TRPM6 als  $\text{Mg}^{2+}$  selektiv gelten (Schmitz et al. 2007; Schweigel et al. 2008; Martens et al. 2018).

Anhand des erfolgreichen Blocks mit Verapamil, eines Blockers diverser Kationenkanäle, konnte die Hypothese eines  $\text{NH}_4^+$  leitenden Kationenkanals untermauert werden (Rosendahl et al. 2016). Des Weiteren wurden neben den oben erwähnten Monoterpenen Menthol und Thymol eine Reihe anderer TRP Kanal Modulatoren untersucht. Zimtaldehyd, Capsaicin und Methylsalicylat reduzierten den  $\text{NH}_4^+$ -induzierten Kurzschlussstrom über das Epithel, während Campher variable Effekte hervorrief.

Interessanterweise zeigte sich bei den Effekten von Menthol und Thymol oftmals ein biphasischer Verlauf (Rosendahl et al. 2016). Diese Agonisten bewirken beide eine Öffnung des TRPV3 (Macpherson et al. 2006). Hingegen wird der TRPA1 durch Konzentrationen von Menthol  $> 0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  blockiert (Karashima et al. 2007). Entscheidend für die Stromantwort nach Öffnung von nicht-selektiven Kanälen dürfte dabei immer das relative Verhältnis zwischen  $\text{Na}^+$  Resorption und  $\text{K}^+$  Sekretion sein, so dass ein Rückgang der Stromantwort nicht automatisch mit einer Hemmung des Kanals gleichgesetzt werden darf. In der Regel dürfte initial ein  $\text{Na}^+$  bzw.  $\text{NH}_4^+$  Einstrom eine Zunahme des Kurzschlussstroms bewirken. Nachfolgend setzt dann, getrieben von der zunehmenden Depolarisation der apikalen Membran, eine  $\text{K}^+$  Sekretion ein. Die parallele Zunahme der Leitfähigkeit ( $G_t$ ) könnte sowohl durch Öffnung von Kanälen, als auch durch Wirkungen auf die Tight Junction Proteine des parazellulären Weges bedingt sein. Neben Versuchen mit mukosalem  $\text{NH}_4\text{Cl}$  wurden auch Versuche in beidseitigem  $\text{NaCl}$  Ringer durchgeführt. Da mukosal und serosal gleiche Lösungszusammensetzungen vorlagen, konnte die Stimulation des Kurzschlussstromes durch Menthol bzw. Thymol Zugabe nur auf einem aktiven Transport auf transzellulärem Wege beruhen, nicht aber auf der Öffnung einer parazellulären Leitfähigkeit.

Die oben beschriebenen molekularbiologischen und funktionellen Untersuchungen wiesen auf eine Beteiligung des bovinen TRPV3 Kanals (bTRPV3) für den  $\text{NH}_4^+$  Transport hin, welcher dann in HEK-293 Zellen überexprimiert wurde (Schrapers et al. 2018). Inside-out, whole-cell Patch-Clamp und ratiometrische Calcium Messungen zeigten, dass  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{NH}_4^+$  durch bTRPV3 geleitet werden können (Schrapers et al. 2018). Ebenfalls wurde in diesem Zusammenhang erneut eine stärkere Stromantwort nach Entfernung divalenter Kationen beobachtet. Die Ansprechbarkeit des bTRPV3 Kanals auf Menthol, Thymol, 2-APB oder Carvacrol wurde mit denselben Techniken gezeigt (Schrapers et al. 2018). Es ist aufgrund der mRNA-Resultate (Rosendahl et al. 2016) allerdings davon auszugehen, dass weitere TRP Kanäle an der  $\text{NH}_4^+$  Aufnahme beteiligt sein könnten.

### 2.3.1. TRPV3

Der TRP Kanal der Unterfamilie Vanilloid 3 wird als ein  $\text{Ca}^{2+}$ -permeabler nicht-selektiver Kationenkanal beschrieben (Nilius und Flockerzi 2014). Prominent ist seine Expression in Keratinozyten der Haut, des Nasen- und Mundepithels. Interessanterweise wurde im distalen Colonepithel der Maus eine TRPV3 Expression auch funktionell nachgewiesen aber nicht im Magen, Dünndarm und proximalen Colon (Ueda et al. 2009). Auch in der apikalen Membran des Colons und Caecums vom Schwein konnte der TRPV3 nachgewiesen werden (Manneck et al. 2021a). Aber auch in anderen Geweben wie im Gehirn, Hoden oder in der Gebärmutter ist eine TRPV3 Expression bekannt (Nilius und Flockerzi 2014). Zu etwa 38 % stimmt die Proteinsequenz mit der von TRPV4 überein, wobei nach eigenem Abgleich die humane TRPV3 und TRPV4 Proteinsequenz zu 46 % identisch sind. Als Proteininteraktionen mit TRPV3 sind unter anderem Heterotetramerbildung mit TRPV1 beschrieben, die zu Eigenschaften führen, die sich vom Homotetramer unterscheiden. Auch eine Interaktion mit dem *epidermal growth factor receptor* wurde beschrieben, welche die TRPV3 Aktivität erhöht, zur Freisetzung des transformierenden Wachstumsfaktors alpha (TGF- $\alpha$ ) führt und welche letztlich die Transglutaminase-Aktivität fördert, welche für die Haar-Morphogenese und Keratinisierung der Haut entscheidend ist (Danielyan et al. 2009; Eckhart et al. 2013).

Wärme ( $> 33\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) kann den Kanal aktivieren (Nilius und Biro 2013). Eine Vielzahl an chemischen Liganden ist beschrieben, wobei alle unspezifisch sind und relativ hoch konzentriert angewandt werden müssen. Unter ihnen schien 2-Aminoethoxydiphenylborat (2-APB) am häufigsten genutzt worden zu sein, welches u.a. auch TRPV1 und TRPV2 aber nicht TRPV4 aktiviert (Chung et al. 2004; Hu et al. 2009). Auch Pflanzenextrakte wie Thymol, Eugenol, Campher und Carvacrol wurden als Aktivatoren identifiziert (Nilius und Flockerzi 2014; Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018; Schrapers et al. 2018; Manneck et al. 2021b). Kurios erscheint die Aktivierung durch Menthol, welches üblicherweise Kältesensoren wie TRPA1 oder TRPM8 aktiviert (Macpherson et al. 2006; Karashima et al. 2007; Rosendahl et al. 2016; Schrapers et al. 2018). Synergistische Effekte zwischen chemischen Liganden und Wärme, aber auch zwischen zwei unterschiedlichen Liganden wurden oft bei verschiedenen TRPV Kanälen beobachtet. TRPV3 kann zwar nicht wie TRPV1 durch extrazelluläre Protonen aktiviert werden, durchaus ist aber eine Aktivierung durch intrazelluläre Azidifizierung bekannt (Hu et al. 2009; Cao et al. 2012).

Durch die Aktivierung von TRPV3 werden Prozesse angestoßen, die zur Keratinisierung (mit Steigerung der Hautbarriere), Wundheilung und Haarwachstum führen, aber auch an Juckreiz und Schmerzvermittlung beteiligt sind (Nilius und Flockerzi 2014).

Diverse Kationen können durch den Kanal geleitet werden, so u. A.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^{+}$ ,  $\text{Na}^{+}$  und  $\text{Cs}^{+}$ . Ergänzt wird diese Liste durch aktuell nachgewiesene Leitfähigkeiten für  $\text{NH}_4^{+}$  und einer marginalen NMDG<sup>+</sup> Leitfähigkeit (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2020). Divalente Kationen (z.B.  $\text{Ca}^{2+}$ ) werden zwar geleitet, behindern aber den Transport monovalenter Kationen. Verapamil und Rutheniumrot gelten als allgemeine Hemmstoffe (Nilius und Flockerzi 2014; Schrapers et al. 2018).

Mutation des TRPV3 Kanals, welche zu einem *gain-of-function* führen, sind assoziiert mit der seltenen angeborenen Hautkrankheit des Olmsted-Syndroms, welche zu einer verstärkten Keratinisierung, Alopezie, Pruritus und Entzündung der Haut führen (Nilius und Flockerzi 2014). Hierbei wurde zur Klärung der Pathogenese *in vitro* gezeigt, dass eine Aktivierung mit TRPV3 Agonisten (z.B. Eugenol und 2-APB) zu einer erhöhten intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$  Konzentration führt. Eine Hemmung des Haarwachstums und erhöhte Apoptose-Raten sowohl der Keratinozyten als auch der Zellen des Haarfollikels resultierten (Borbiró et al. 2011). In der Maus wurde gezeigt, dass TRPV3 regulatorisch mit dem *epidermal growth factor receptor* (EGFR) wirkt, der wiederum die Offenwahrscheinlichkeit von TRPV3 erhöht, welches die beim Olmsted-Syndrom auftretende Haarlosigkeit und die beeinträchtigte Integrität der Hautbarriere

mit Hyperkeratose erklärt (Nilius und Biro 2013; Blaydon und Kelsell 2014). Über den TRPV3 kommt es ferner zur Aktivierung der Transglutaminase, welche für die Verlinkung der Proteine für die Hülle der Corneozyten bedeutsam ist (Blaydon und Kelsell 2014). Typischerweise zeigt sich daher beim Olmsted-Syndrom eine hereditäre Palmoplantarkeratose (Nilius und Biro 2013). Zu einer Beeinträchtigung der Temperaturwahrnehmung scheint es hingegen beim Olmsted-Syndrom nicht zu kommen, wobei funktionelle Überschneidungen mit anderen TRPV Kanälen kompensieren könnten (Nilius und Biro 2013). Insgesamt ist die Funktion von TRPV3 als Thermosensor der Haut noch unklar.

Auch wenn die gastrointestinale Rolle von TRPV3 kaum erforscht ist, wird ein Zusammenhang zwischen TRPV3 Mutationen und colorektalen Karzinomen vermutet (Hoeft et al. 2010; Proverbio et al. 2013). Ferner erscheint der TRPV3 Kanal eine Rolle bei Dysregulationen der Insulinsekretion zu spielen.

### 2.3.2. TRPV4

Der TRPV4 Kanal, auch früher unter anderem bekannt als *vanilloid receptor-like* (VRL-2), ist in fünf verschiedenen Splice-Varianten (A-E) identifiziert worden (Arniges et al. 2006). Die Expression ist in vielen Organen (z.B. Gehirn, Niere, Knochen) beschrieben worden und unter anderem in Epithelzellen der Cornea, Trachea, des Darms oder der Epidermis (Nilius und Flockerzi 2014).

Wärme (24-38 °C) soll aktivieren, wobei die physiologische Bedeutsamkeit an der Temperaturwahrnehmung umstritten ist. Hypotone, extrazelluläre Lösungen bewirken eine Aktivierung, womit TRPV4 zur zellulären und auch systemischen Volumenregulation beiträgt (Toft-Bertelsen und Macaulay 2021). Auch mechanische Stimuli wie Scherspannung (engl. *shear stress*) sind potente Aktivatoren. Dieser Mechanismus ist in der Regulation des Gefäßtonus und Vaskularisierung entscheidend. Direkt interagiert TRPV4 mit Aktin und Tubulin. Für die Zellschwellung ist die Verbindung zwischen TRPV4 und F-Aktin essentiell. Auch kann TRPV4 mit anderen Kanalproteinen ein Heteromer bilden, wie z.B. TRPC1 oder TRPP2 und offenbar auch mit den Aquaporinen AQP2 und AQP4 (Benfenati et al. 2011; Galizia et al. 2012). Die Permeabilität von monovalenten Kationen ( $K^+$ ,  $Cs^+$ ,  $Na^+$ ,  $Rb^+$ ,  $Li^+$ ) wird wie beim TRPV3 durch  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  gehemmt, wobei insbesondere  $Ca^{2+}$  gut geleitet wird (Nilius und Flockerzi 2014).

Als ein potenter und selektiver chemischer Aktivator wird die Substanz GSK1016790A gesehen. Blockend wirkt Rutheniumrot, genauso wie beim TRPV3. Des Weiteren gilt auch GSK2193874 als selektiver Blocker, welcher damit sogar ein therapeutisches Potential bei Lungenödemem aufweisen könnte (Thorneloe et al. 2012).

Milde bis tödliche Formen von Osteodysplasie als auch symptomatisch diverse Ausprägungen von Neuropathien die teilweise gebündelt auftreten können, beruhen zumeist auf *gain-of-function* Mutationen des TRPV4 Kanals. Überraschenderweise zeigen *TRPV4 knockout* Mäuse unter Normalbedingungen einen sehr milden Phänotyp, vermutlich aufgrund kompensatorischer Effekte anderer TRPV Kanäle (Nilius und Flockerzi 2014).

## 2.4. Stickstoffkreislauf im Colon

Genauso wie im Pansen des Rindes können im Colon Urease-bildende Bakterien Harnstoff umsetzen, wobei dieses den Hauptanteil systemischen Ammoniaks/Ammoniums bildet (Matoori und Leroux 2015). Zusätzlich tragen mikrobielle Protein-Desaminierung und Glutaminasen der Enterozyten zur  $NH_3/NH_4^+$  Bildung bei (Levitt und Levitt 2018). Die Harnstoff Metabolisierung z.B. von *Helicobacter pylori* ist außerdem im Magen und Dünndarm nachweisbar (Levitt und Levitt 2018). Aufgrund von Flux-Untersuchungen wurde eingeschätzt, dass das proximale Colon des Pferdes vergleichbare  $NH_3/NH_4^+$  Transportraten aufweist wie der Pansen (Bochröder et al. 1994). In der Maus wurde auf mRNA und Protein Ebene die

Existenz von  $\text{NH}_3$  leitendem RhBG und RhCG nachgewiesen. Hierbei wurden Proben vom Magen, Duodenum, Jejunum, Ileum und Colon untersucht (Handlogten et al. 2005). Ferner wurden funktionell in Ussing Kammer Untersuchungen am proximalen Rattencolon durchgeführt, die bei pH 7,4 auf eine negative Interaktion zwischen mukosalem  $\text{NH}_4^+$  und der  $\text{Na}^+$  Aufnahme mittels NHE hinweisen (Cermak et al. 2000). Hierbei kam es wie am Pansen zu einer Zunahme des Kurzschlussstroms. Am Colon des Schweines konnte gezeigt werden, dass sowohl die Leitfähigkeit für  $\text{Na}^+$  als auch für  $\text{NH}_4^+$  durch den Entzug divalenter Kationen stimuliert werden kann (Manneck et al. 2021a). Ferner zeigten sich funktionelle Effekte nach Gabe von 2-APB und GSK1016790A. Der Nachweis von TRPV3 und TRPV4 mithilfe der qPCR und Westernblot Technik und die ebenfalls gezeigte apikale Expression sprechen für die Beteiligung am Transport von Kationen über Colon und Caecum.

Der Harnstoffzyklus in der Leber ist speziesunabhängig (2.1.1). Neben den Rumen wurden auch im Magen, Dünndarm und Colon UT-B Kanäle nachgewiesen (Coyle et al. 2016). Ähnliche Erkenntnisse liegen beim Menschen vor (Bergen und Wu 2009; Levitt und Levitt 2019). Inwieweit bereits im Dünndarm eine mikrobielle Proteinsynthese mit nachfolgender Resorption von Harnstoff erfolgen kann, ist umstritten (Metges 2000; Levitt und Levitt 2018; Levitt und Levitt 2019). Anders als beim Rind geht jedoch ein Großteil der hochwertigen mikrobiellen Proteine mit dem Kot verloren und der Monogastrier ist auf die essentiellen Aminosäuren aus der Nahrung angewiesen. Auch wenn der Einfluss auf die Proteinversorgung des energieaufwendigen, *enterohepatischen* Kreislaufs stark limitiert ist (Metges 2000; Bergen und Wu 2009), könnten andere Funktionen, wie die Entfernung von  $\text{H}^+$  aus dem Lumen in Form von  $\text{NH}_4^+$  denkbar sein. Für diese Kanal-vermittelte Resorption von  $\text{NH}_4^+$  gibt es auch Hinweise beim Caecum und Colon des Schweins (Stumpff et al. 2013; Manneck et al. 2021a).

## 2.5. Aufnahme und klinische Relevanz des Calciums beim Rind

Beim Rind ist die Calciumversorgung insbesondere um den Zeitraum der Kalbung kritisch. Mit dem Beginn des Milcheinschusses führt der damit einhergehende Mehrbedarf an  $\text{Ca}^{2+}$  bei bis zu 80 % der kalbenden Rinder zu einer klinischen Hypocalcämie, deren akute Manifestation als „Milchfieber“ bezeichnet wird (Degaris und Lean 2008; Wilkens et al. 2020). Beim Rind sollte die Calciumkonzentration um  $2,1\text{-}2,7 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  liegen (Dirksen et al. 2002). Von subklinischer Hypocalcämie wird bei einer Serum  $[\text{Ca}^{2+}]$  von  $< 2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  gesprochen (Wilkens und Muscher-Banse 2020). Eine Beeinträchtigung des Stehvermögens kann sich bei  $[\text{Ca}^{2+}] < 1,75 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  zeigen und wird dann als „Gebärparese“ bezeichnet. In der Regel ist gleichzeitig auch der anorganisch gebundene Phosphorgehalt im Serum deutlich erniedrigt (Dirksen et al. 2002). Es werden unterschiedliche Fütterungsstrategien *präpartum* sowie  $\text{Ca}^{2+}$  Supplementierung *postpartum* zur Reduktion der Inzidenz der klinischen und subklinischen Hypocalcämie eingesetzt (Wilkens et al. 2020). Bisher liegt die Prävalenz bei Milchrindern für subklinische Hypocalcämie weiterhin hoch bei 5,7 bis 49 %, während sie für Gebärparese bei 0 bis 6 % liegt (Wilkens und Muscher-Banse 2020).

In der Kuhmilch finden sich durchschnittlich eine  $[\text{Ca}^{2+}]$  von  $1,25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  Milch, wobei diese im Kolostrum mit  $1,5\text{-}2,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  sogar noch höher ausfällt (Dirksen et al. 2002). Die beginnende Produktion von Kolostrum zum Ende der Trächtigkeit ist gekennzeichnet von erhöhter  $\text{Ca}^{2+}$ -Transporter Expression und Erhöhung an Modulatoren, welche den transzellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Strom aus dem Blut in die Milch bewirken. Aufgrund der in Kürze benötigten drastisch ansteigenden Mengen wird die Calcium-Homöostase des Muttertiers maßgeblich beeinflusst (Wilkens et al. 2020).

$\text{Ca}^{2+}$  ist unter anderem für den Knochenaufbau, die Muskelkontraktibilität, aber auch für die Stabilisierung des Membranpotentials, beim Aktionspotential des Herzens, bei der

synaptischen Übertragung und im Immunsystem bedeutend, womit viele klinischen Symptome erklärbar werden (Wilkens et al. 2020).

In klinisch leichteren Verläufen zeigen sich Muskelzuckungen, eine verkrampfte Körperhaltung, aber auch eine herabgesetzte Kauaktivität und Pansenmotorik. Höchstwahrscheinlich bewirkt die Abnahme der extrazellulären  $[Ca^{2+}]$  an Muskelzellen eine Erhöhung der Membrandurchlässigkeit für  $Na^+$  und  $K^+$ . Eine Beteiligung nicht-selektiver Kationenkanäle an diesem Effekt erscheint möglich. Die dadurch bedingte Anhebung des Membranpotentials würde die Übererregbarkeit erklären (Dirksen et al. 2002).

Hochgradiger Mangel an  $Ca^{2+}$  führt zu einem Verlust der Ansprechbarkeit der Muskelzelle und Hemmung der Transmitterausschüttung an motorischen Synapsen. Physiologisch muss  $Ca^{2+}$  in Synapsen des motorischen Neurons einströmen, um die Vesikel-Verschmelzung mit der präsynaptischen Membran und die folgende Ausschüttung des Botenstoffs Acetylcholin zu bewirken (Von Engelhardt et al. 2015). Bei stark abgefallenem Plasmacalciumspiegel ist dieses nicht mehr möglich. Die resultierende schlaffe Lähmung führt zur typischen „Auskultationsstellung“ der Tiere. Die  $[Ca^{2+}]$  im Serum liegt bei diesen festliegenden Kühen  $< 1,5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  (Dirksen et al. 2002). Somnolenz, generelles Abkühlen, welches an den Akren (z.B. Ohren) zuerst bemerkt werden kann und Beeinträchtigung der Herzfunktion und Atmung gehen symptomatisch einher. Fortschreitend nimmt die allgemeine Paralyse zu. Todesursache können Kammerflimmern oder Tod durch Ersticken nach Lähmung der Atemmuskulatur sein. Therapeutisch wird eine  $Ca^{2+}$ -Infusion empfohlen (Dirksen et al. 2002).

Bereits leichte Störungen der Calcium-Homöostase können einen Einfluss auf die Gesundheit und Produktivität haben (Wilkens et al. 2020). Während die Kontraktilität der Skelettmuskulatur bei beginnender Hypocalcämie durch das intrazellulär gespeicherte  $Ca^{2+}$  zunächst erhalten bleibt, ist die glatte Muskulatur auf den Einstrom von  $Ca^{2+}$  aus dem Extrazellularraum angewiesen. Damit erklären sich auch Symptome, wie verringerte Kontraktilität und Motilität des Reproduktionstraktes und des Gastrointestinaltraktes (Wilkens et al. 2020). Viele Hormone und Immunzellen nutzen den Inositoltrisphosphat gesteuerten Weg ( $IP_3$ -Rezeptor), um intrazelluläres  $Ca^{2+}$  zu mobilisieren. Unter anderem wurde so beobachtet, dass die Aktivität von Neutrophilen in Milchkühen im Zuge einer subklinischen Hypocalcämie abnimmt (Wilkens et al. 2020).

### Vergleich zum Pferd

Der Laktationsbeginn kann wie beim Rind Ursache sein für eine Hypocalcämie (Toribio 2011). Eine schlaffe Lähmung oder Festliegen wie beim Rind ist jedoch beim Pferde nicht zu erwarten, da die Abnahme der extrazellulären  $[Ca^{2+}]$  weniger ausgeprägt ist und damit eine Hemmung der synaptischen Übertragung nicht eintritt. Allerdings erhöht sich durch fehlende Bindung von  $Ca^{2+}$  das Schwellenpotential spannungsabhängiger  $Na^+$  Kanäle, welche hierdurch früher aktiv werden (Toribio 2011). Eine Übererregbarkeit resultiert, welche sich klinisch u.a. in faszikuläre Muskelzuckungen, Zittern, Ataxie, Herzrhythmusstörungen und tetanischen Krampfanfällen zeigt (Toribio 2011). Aber auch bei Pferden wurden wie beim Rind *Retentio placentae*, verringerter Uterustonius oder Darmlähmung beobachtet (Toribio 2011).

### Spätfolgen

Eine überwundene Gebärparese kann im Folgenden zur Verlagerung von Labmagen, Ketose, Mastitis und verringerter Milchleistung führen, weswegen nicht selten ausgemerzt wird. Ähnlich verursacht die subklinische Hypocalcämie eine drei bis fünfmal höhere Wahrscheinlichkeit, eine *postpartale* Krankheit zu erfahren und damit steigt die Wahrscheinlichkeit eines Abgangs aus der Herde um 50 % (Wilkens et al. 2020). Mit zunehmender Laktationszahl steigt die Inzidenz der Hypocalcämie, vermutlich auch durch die reduzierte Mobilisierbarkeit von Knochen calcium (Dirksen et al. 2002; Wilkens et al. 2020). Während der Milchbildung werden zur Aufrechterhaltung des Blutcalciumspiegels verstärkt

über Parathormon Osteoklasten aktiviert, sodass damit  $\text{Ca}^{2+}$  in die Blutbahn freigesetzt wird. Zusätzlich wird mit diesem Hormon ebenfalls die Nieren- und Darmresorption von  $\text{Ca}^{2+}$  erhöht (Wilkens et al. 2020). Eine azidotische Stoffwechsellage stimuliert die Parathormonausschüttung, wodurch neben der Stimulation der renalen  $\text{H}^+$ -Ausscheidung auch die Mobilisierung von  $\text{Ca}^{2+}$  gefördert wird. Umgekehrt wird die Parathormonausschüttung durch die physiologisch alkalische Stoffwechsellage des Wiederkäuers gehemmt. Entsprechend existieren Konzepte, die Kation-Anion Differenz (engl. *Dietary Strong Cation Anion Difference*) bei der *peripartalen* Wiederkäuerfütterung zu verringern. Da bei dieser Ernährungsform weniger organische Anionen enthalten sind, fällt metabolisch weniger Hydrogencarbonat an. Im Idealfall gelingt es, eine weniger basische Stoffwechsellage zu erzeugen, welche die Parathormonsekretion fördert, ohne dabei eine Pansenazidose hervorzurufen (Wilkens und Muscher-Banse 2020).

### Calciumresorptionsmechanismen

Der folgende Abschnitt basiert auf den Ausführungen von Wilkens *et al.* (Wilkens et al. 2020). Im Gegensatz zum Monogastrier wird beim Rind nicht nur im Darmtrakt  $\text{Ca}^{2+}$  aufgenommen, sondern auch im Pansen. Im Darm und in der Niere findet eine parazelluläre Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  mit Beteiligung unterschiedlicher Tight Junction Proteine abhängig u.a. von der luminalen  $[\text{Ca}^{2+}]$  statt. Von entscheidender Bedeutung sind allerdings die aktiven, transzellulären Resorptionsmechanismen. Der TRPV6 Kanal ist *apikal* im Dünndarm nachgewiesen worden. Eine Translokation des  $\text{Ca}^{2+}$  durchs Cytosol mithilfe von Calbindin $_{9\text{K}}$  ( $\text{CaBD}_{9\text{K}}$ ) schließt sich an, gefolgt von einer basolateralen Ausschleusung durch die  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA1). Eine untergeordnete Rolle im Darm hat der Aufnahmemechanismus über TRPV5,  $\text{CaBD}_{9\text{K}}$  und dem basolateralen  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiporter (NCX1), wobei dieser in der Niere dominant ist. Stimuliert wird die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme unter anderem durch 1,25-dihydroxyvitamin  $\text{D}_3$  (Calcitriol), der biologisch aktiven Form von Vitamin D. Jedoch wird bei  $\text{Ca}^{2+}$ -Restriktion und damit einhergehender endogener Zunahme an Calcitriol nur bei Ziegen und nicht bei Schafen die Expression von  $\text{Ca}^{2+}$ -Transportern im Darm erhöht (Wilkens et al. 2010; Wilkens et al. 2011; Herm et al. 2015). Für das Rind wurde eine Studie unter dieser Fragestellung bisher noch nicht durchgeführt, aber es würde nicht verwundern, wenn ebenfalls kaum intestinale Effekte über den Calcitriol Weg beobachtet werden würden. Dieses Ergebnis wäre zu erwarten, da beim Rind ca. 50 % des  $\text{Ca}^{2+}$  präduodenal resorbiert werden (Schröder et al. 1997), wobei die genauen Angaben je nach Studie sehr unterschiedlich ausfallen (Wilkens et al. 2020).

### Calciumresorption im Pansen

Im Pansen ist eine parazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme aufgrund des mukosal-serosalen elektrochemischen Gradienten und der Dichtigkeit des Epithels ausgeschlossen (Beardsworth et al. 1989; Wilkens et al. 2020). Denkbar ist eine parazelluläre Aufnahme allenfalls bei dramatisch hohen luminalen  $[\text{Ca}^{2+}]$  (z.B. nach Bolus). Auch wurde eine Expression von TRPV5, TRPV6 oder  $\text{CaBD}_{9\text{K}}$  ausgeschlossen. Wird ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Mangel induziert, erhöht sich der Calcitriol-Spiegel im Plasma, welcher aber keine Erhöhung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Flux-Raten im Pansen bewirkt. Die Präsenz von SCFA stimuliert hingegen *in vitro* die  $\text{Ca}^{2+}$  Resorption bzw. wird dies *in vivo* bei Fütterung von Konzentratfutter beobachtet (Uppal et al. 2003). Daraufhin wurde diskutiert, ob ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  Antiporter *apikal* existieren könnte. Die Aufnahme von SCFA bewirkt eine intrazelluläre Azidifizierung, womit ein  $\text{H}^+$ -gesteuerter Antiport möglich erscheint (Schröder et al. 2015). *In vitro* reagierte das Pansenepithel allerdings auch auf die Gabe von ätherischen Ölen wie z.B. Menthol oder Thymol mit einer verstärkten Resorption von  $\text{Ca}^{2+}$  (Rosendahl et al. 2016; Geiger et al. 2021). Auch *in vivo* gibt es Hinweise auf eine erhöhte  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme (Braun et al. 2019). Im Zusammenhang mit dem PCR-Nachweis und funktionellen Untersuchungen stellen Vertreter der nicht-selektiven TRP-Kanalfamilie im Pansen wichtige Kandidaten für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption dar.

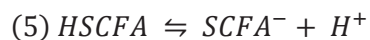
Die basolaterale Ausschleusung könnte über die  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (PMCA1) stattfinden, welche bereits auf mRNA Ebene im Pansen nachgewiesen wurde (Schröder et al. 2015). Jedoch



zeigte eine funktionelle Untersuchung keinen signifikanten Effekt durch Vanadate, einen typischen Inhibitor der  $\text{Ca}^{2+}$  ATPase (Schröder et al. 1999). Da die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme abhängig von der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase ist, wird funktionell der basolaterale Efflux über den  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  Antiporter (NCX1) favorisiert (Leonhard-Marek et al. 2010).

### 2.5.1. Kurzkettige Fettsäuren

Die kurzkettigen Fettsäuren (SCFA, Gleichung 5) entstehen nach dem fermentativen Abbau im Pansen aus Faserkohlenhydraten (z.B. Zellulose, Pektine) bzw. leicht verdaubaren Kohlenhydraten (z.B. Stärke). Über den Abbau zu Glukose bzw. Xylose bis hin zu Pyruvat werden die sauren Energieträger gebildet, wobei sich je nach verfüttertem Kohlenhydrat bzw. physikalischer Struktur des Futters die Mengenanteile der einzelnen SCFA verschieben können (Von Engelhardt et al. 2015). Mengenmäßig vorherrschend ist die Essigsäure, welche zu  $\text{H}^+$  und dem Salz Acetat dissoziiert, gefolgt von Propionsäure (Propionat) und Buttersäure (Butyrat). Ferner entstehen die Gase  $\text{CO}_2$  und Methan (Von Engelhardt et al. 2015). Abhängig vom Futter und vom Messzeitpunkt nach der Fütterung schwanken die drei oben genannten SCFA im Pansen um die Konzentration  $50\text{-}100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , während weitere SCFA zusammengenommen ca.  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  ausmachen können (Bergman 1990; Allen 1997; Stumpff 2018). Aufgrund des  $\text{pK}_a$  Wertes von  $\sim 4,8$  bewirkt die Freisetzung von SCFA bei Fütterung von leicht verdaulichen Kohlenhydraten einen schnellen, drastischen pH-Abfall im Pansen. Das Pansenepithel resorbiert die SCFA, im Wesentlichen aufgrund des hohen chemischen Gradienten zwischen Pansen und Blut. Ein parazellulärer Aufnahmeweg wird als unwahrscheinlich eingeschätzt (Sehested et al. 1999; Stumpff 2018). Insbesondere würde eine parazelluläre Leitfähigkeit für Anionen zu einem Rückfluss von  $\text{Cl}^-$  ins Pansenlumen führen, welches schwer mit der *in vivo* recht niedrigen  $\text{Cl}^-$  Konzentration von ca.  $10\text{-}20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  vereinbar ist (Von Engelhardt et al. 2015).



Bezüglich der apikalen Aufnahme von SCFA bestehen weiterhin Unklarheiten. Experimentell wurde eine höhere SCFA Aufnahme bei pH 6,0 im Vergleich zu einem pH 7,3 festgestellt (Sehested et al. 1999). Die Buttersäure hat die höchste Lipidlöslichkeit, gefolgt von der Propionsäure und der Essigsäure. Allerdings ergeben Fluxmessungen am Pansen nicht die erwarteten höheren Transportraten für Butyrat. Die Polarität der protonierten SCFA (polarer Säureteil mit unpolare Alkylgruppe) ist geringer als die des Wassers oder Ammoniaks und geeignete Kandidaten für die Aufnahme sind bisher nicht diskutiert worden. Dennoch zeichnet sich ab, dass das ursprüngliche Modell einer reinen Diffusion durch die Lipidmembran teilweise oder ganz ersetzt werden könnte (Stumpff 2018). Neben dem Influx der protonierten Säure scheinen zwei weitere Aufnahmewege vorhanden zu sein. Gesichert gilt die Aufnahme als Anion über den Antiport DRA (SLC26A3) im Austausch für  $\text{HCO}_3^-$ . Ferner wurde der MCT1 (SLC16A1) postuliert, der Anionen im Symport mit  $\text{H}^+$  transportiert, wobei dieses Protein eher basolateral lokalisiert zu sein scheint. Bei allen drei Aufnahmemechanismen resultiert initial ein intrazellulärer pH-Abfall, entweder durch direkten  $\text{H}^+$ -Einstrom oder über den Verlust von  $\text{HCO}_3^-$  mit nachfolgender intrazellulären Dissoziation von  $\text{H}_2\text{CO}_3$ , welches laufend aus  $\text{CO}_2$  und  $\text{H}_2\text{O}$  gebildet wird. Diese intrazelluläre Ansäuerung wird durch den Antiport mit  $\text{Na}^+$  über NHE ausgeglichen (Rabbani et al. 2011). Hypothetisch könnte durch die intrazelluläre Azidose auch ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  Antiport angetrieben werden (Schröder et al. 2015; Stumpff 2018).

Während Acetat und Propionat überwiegend basolateral ins Portalblut gelangen und dem Wiederkäuer als Energiequelle zur Verfügung stehen, wird Butyrat auch bereits im Epithel katabolisiert. Zumeist resultieren Metabolite wie Ketone und  $\text{CO}_2$ . Das erzeugte ATP wirkt sich auch positiv auf aktive Transportvorgänge anderer Ionen aus (Von Engelhardt et al. 2015;

Baaske et al. 2020). Basolateral strömt  $\text{Na}^+$  über die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase mit rezirkulierendem  $\text{K}^+$  hinaus und bewirkt durch seinen Efflux eine Triebkraft für den basolateralen Austritt von Anionen wie  $\text{Cl}^-$  oder  $\text{SCFA}^-$  (Stumpff 2018). Volumen- bzw. osmoregulierte Anionenkanäle wie Maxi-Anionen Kanäle (z.B.  $\text{SLCO2A1}$ ),  $\text{LRRC8}$  und Anoctamine werden hierbei als Kandidaten vorgeschlagen (Stumpff 2018). Ferner könnten  $\text{SCFA}^-/\text{HCO}_3^-$  Austausch (z.B.  $\text{SLC4A1/2}$ ) oder wie bereits erwähnt  $\text{MCT1}$  beteiligt sein, gekoppelt an einen ähnlichen apikalen Anionenaustauscher. Hierbei würde es allerdings nicht zur Stimulation der  $\text{Na}^+$ -Resorption kommen, da die aufgenommenen  $\text{H}^+$  dem basolateralen Efflux zugefügt werden würden.

Die Resorption der SCFA sind entscheidend für die Regulation der ruminalen Osmolarität und des Säure-Basen Haushaltes (Stumpff 2018). Bei der Resorption der SCFA gelangt zugleich immer eine recht große Menge an Protonen über den NHE zurück ins Pansenlumen. Das dabei aufgenommene  $\text{Na}^+$  (bis 50 mol pro Tag) gelangt dann über den Speichel (250-300 L pro Tag) zurück in den Pansen, gebunden an die puffernden Anionen  $\text{HCO}_3^-$  und Phosphat (Stumpff 2018; Baaske et al. 2020). Bei übersteigter SCFA Bildung durch hohe Zufuhr leicht verdaulicher Kohlenhydrate kann die Resorption der SCFA und die Pufferung der Protonen nicht schritthalten. Dann kommt es zu einem Anstieg der Osmolarität, einem pH-Abfall und einer Verschiebung der mikrobiellen Population hin zu Spezies, die Laktat statt SCFA bilden (Kleen et al. 2003; Gentile et al. 2004; Plaizier et al. 2008; Hernández et al. 2014; Oetzel 2017; Snyder und Credille 2017; Monteiro und Faciola 2020). Dabei werden gram-negative Bakterien durch gram-positive verdrängt. Die Lyse der gram-negativen Keime soll inflammatorisch wirkende Lipopolysaccharide (LPS) freisetzen. Auch steigert die Konzentratfütterung eine Proliferation von Histamin produzierenden Mikroorganismen, besonders erwähnenswert *Allisonella histaminiformans*. Histamin, welches nicht ausreichend im Epithel detoxifiziert werden kann, führt zur Inflammation (Baaske et al. 2020). Damit wird die Situation prekär, die Osmolarität steigt noch stärker, der pH fällt weiter und die Barriere des Pansenepithels wird zunehmend beschädigt. In schwerwiegenden Fällen können die durch Erosionen in die Blutbahnen eingetragenen, ruminalen Mikroorganismen Leberabszesse und Laminitis verursachen und ein Wasserverlust in den Pansen hinein mit einhergehender tödlicher Dehydration kann folgen (Gaebel et al. 1987; Lodemann und Martens 2006; Steele et al. 2011; Hernández et al. 2014; Meissner et al. 2017; Stumpff 2018). Therapeutisch sollen Puffer Eingaben oder das Entfernen des Panseninhaltes inklusive Spülung helfen (Stumpff 2018). Vergleichbar häufiger tritt die subakute Pansenazidose mit Absinken des Pansen pH-Wertes unter 5,5-5,8 (für mehrere Stunden am Tag) auf, welche unangenehm bis schmerzhaft für das Tier sein soll und die Milchproduktion verringert (Baaske et al. 2020).

Lange bekannt ist, dass die Konzentratfütterung (engl. *high-grain diet*) die Anzahl und Größe der Pansenzotten erhöht. Ferner werden Transportmechanismen des Pansenepithels beeinflusst (Steele et al. 2011). Die Wirkung einer Konzentratfütterung auf die verstärkte Aufnahme von  $\text{NH}_4^+$  auf Kosten von  $\text{NH}_3$  wurde oben bereits erwähnt. Ferner kommt es zu einer Steigerung der SCFA Aufnahme, mit einer Anpassung innerhalb von Wochen unabhängig vom Alter des Rindes (Uppal et al. 2003; Steele et al. 2011; Baaske et al. 2020). Des Weiteren wurde eine Parakeratose bei azidotischen Bedingungen (ruminaler pH < 5,8 für > 3 h pro Tag) wie bei erhöhten Butyrat Konzentrationen beschrieben (Steele et al. 2011; Baaske et al. 2020). Hierbei führt eine erhöhte Mitoserate zu Reifungsstörungen der Keratinozyten und zur Abnahme an Zellverbindungen. Typisch ist die reduzierte Schichtdicke des *Stratum basale*, *spinosum* und *granulosum* und der teilweise Verlust der Zellkerne, Granula des Endoplasmatischen Retikulums im *Stratum granulosum*, während das verdickte *Stratum corneum* oftmals noch Zellkerne aufweist und sich von den unterliegenden Schichten ablösen kann (Bull et al. 1965; Hinders und Owen 1965; Lavker et al. 1969; Tamate und Kikuchi 1978; Steele et al. 2011; Aschenbach et al. 2019; Baaske et al. 2020).

In Ussing Kammer Untersuchungen wurde gezeigt, dass bereits an Konzentratfutter adaptierte Schafe stärkere  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahmen bei Zugabe von SCFA zeigten als Heu gefütterte Tiere (Uppal et al. 2003). Dabei bewirkte die Buttersäure im Vergleich zu Propionsäure und Essigsäure die höchste  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme im Pansen vom Schaf (Schröder et al. 1999).

Auch das Mikrobiom im Colon und Caecum kann SCFA bilden, welche vom Epithel resorbiert werden (Bergman 1990; Stumpff 2018). Diese decken beim Menschen zu 10 %, bei Schweinen bis zu 30 % und beim Pferd bis zu 70-80 % des gesamten Energiebedarfs (Bergman 1990; Al Jassim und Andrews 2009; Stumpff 2018). Im Vergleich dazu liefert der Vormagen des Rindes etwa 75 % der Energie aus SCFA. Im Dickdarm stellt SCFA<sup>-</sup> das dominierende Anion dar, weswegen genauso wie im Pansen ein stetiger Wasser- und Elektrolyt-Austausch, SCFA Absorption und Pufferung zur pH Regulierung bzw. Homöostase des Lumens von Nöten ist (Stumpff 2018). Die Effizienz der SCFA Aufnahme ist vergleichbar zwischen Rind und Pferd, wobei die Bildung von SCFA aus Faserkohlenhydraten beim Pferd weniger stark ausgeprägt ist (Al Jassim und Andrews 2009). Eine pathologische Entgleisung des Dickdarms ist damit ähnlich möglich wie beim Pansen und kann mit einer *Laminitis* (Hufrehe) assoziiert sein (Al Jassim und Andrews 2009).

### 3. The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport.

Name	Bezeichnung	Erläuterung Anteil Leistung
Franziska Liebe	1. Erstautorin	Konzeption des Studiendesigns, der Vorbereitung und Durchführung der Experimente Auswertung und Erstellung der Erstfassung des Manuskriptes Überarbeitung des Manuskripts Sequenzierung von bTRPV3 und Klonierung des Vektors Injektion der Xenopus laevis Oozyten Immunhistologie Inside-out Patch-Clamp Erstellen der Graphiken
Hendrik Liebe	2. Erstautor	Konzeption des Studiendesigns, der Vorbereitung und Durchführung der Experimente Auswertung und Erstellung der Erstfassung des Manuskriptes Überarbeitung des Manuskripts HEK-293 Zellkultur und Transfektion Immunoblotting Zweilumige pH-sensitive Mikroelektrode
Gerhard Sponder	Co Autor	Konzeption, Beratung und Unterstützung in Klonierung und Sequenzierung Überarbeitung des Manuskripts
Sabine Käßmeyer	Co Autorin	Beratung in der Immunhistologie Überarbeitung des Manuskripts
Friederike Stumpff	Co Autorin	Konzeption des Studiendesigns Beratung bei Durchführung und Auswertung der Experimente Unterstützung bei der Erstellung der Erstfassung des Manuskriptes Überarbeitung des Manuskripts

This article has been published in: Pflügers Archiv: European journal of physiology; **472**(6), S. 693-710.

CC BY 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Manuscript received at the Pflügers Archiv: 13 February 2020

Revised: 31 March 2020

Accepted: 6 May 2020

Published: 26 May 2020

DOI: 10.1007/s00424-020-02393-2

<https://doi.org/10.1007/s00424-020-02393-2>

Authors:

Franziska Liebe, Hendrik Liebe, Sabine Kaessmeyer, Gerhard Sponder, Friederike Stumpff

Reproduced with permission from Springer Nature.



# The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport

Franziska Liebe<sup>1</sup> · Hendrik Liebe<sup>1,2</sup> · Sabine Kaessmeyer<sup>3</sup> · Gerhard Sponder<sup>1</sup> · Friederike Stumpff<sup>1</sup>

Received: 13 February 2020 / Revised: 31 March 2020 / Accepted: 6 May 2020 / Published online: 26 May 2020  
© The Author(s) 2020

## Abstract

Large quantities of ammonia ( $\text{NH}_3$  or  $\text{NH}_4^+$ ) are absorbed from the gut, associated with encephalitis in hepatic disease, poor protein efficiency in livestock, and emissions of nitrogenous climate gasses. Identifying the transport mechanisms appears urgent. Recent functional and mRNA data suggest that absorption of ammonia from the forestomach of cattle may involve TRPV3 channels. The purpose of the present study was to sequence the bovine homologue of *TRPV3* (*bTRPV3*), localize the protein in ruminal tissue, and confirm transport of  $\text{NH}_4^+$ . After sequencing, *bTRPV3* was overexpressed in HEK-293 cells and *Xenopus* oocytes. An antibody was selected via epitope screening and used to detect the protein in immunoblots of overexpressing cells and bovine rumen, revealing a signal of the predicted ~ 90 kDa. In rumen only, an additional ~ 60 kDa band appeared, which may represent a previously described *bTRPV3* splice variant of equal length. Immunohistochemistry revealed staining from the ruminal *stratum basale* to *stratum granulosum*. Measurements with pH-sensitive microelectrodes showed that  $\text{NH}_4^+$  acidifies *Xenopus* oocytes, with overexpression of *bTRPV3* enhancing permeability to  $\text{NH}_4^+$ . Single-channel measurements revealed that *Xenopus* oocytes endogenously expressed small cation channels in addition to fourfold-larger channels only observed after expression of *bTRPV3*. Both endogenous and *bTRPV3* channels conducted  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$ , and  $\text{K}^+$ . We conclude that *bTRPV3* is expressed by the ruminal epithelium on the protein level. In conjunction with data from previous studies, a role in the transport of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{NH}_4^+$  emerges. Consequences for calcium homeostasis, ruminal pH, and nitrogen efficiency in cattle are discussed.

**Keywords** TRPV3 · Ammonia transport · Microelectrode · Climate gas · Rumen · *Xenopus* oocyte

## Introduction

Ammonia in its two forms ( $\text{NH}_3$  and  $\text{NH}_4^+$ ) plays a central role in the interconversion of amino acids for protein metabolism,

---

Franziska Liebe and Hendrik Liebe contributed equally to this work.

A Commentary to this article is available online at <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02394-1>

---

**Electronic supplementary material** The online version of this article (<https://doi.org/10.1007/s00424-020-02393-2>) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Friederike Stumpff  
stumpff@zedat.fu-berlin.de

- <sup>1</sup> Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany
- <sup>2</sup> Department of Biology, Chemistry, and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Arnimallee 22, 14195 Berlin, Germany
- <sup>3</sup> Institute of Veterinary Anatomy, Freie Universität Berlin, Koserstraße 20, 14195 Berlin, Germany

requiring rapid transport across membranes of cells and organelles. Surprisingly, little information is currently available concerning the transport of this metabolite by epithelia of the gut. Given that more than half of the ammonia found in peripheral blood is of gastrointestinal origin [31], understanding the mechanisms responsible for ammonia absorption might help with a better management of hyperammonemia in patients suffering from hepatic disease. However, the most urgent task may be to find strategies to reduce the vast amounts of nitrogen that are excreted by livestock worldwide, leading to human respiratory problems, eutrophication, and climate change [28]. Livestock production represents the largest anthropogenic source of the highly potent climate gas  $\text{N}_2\text{O}$  [56]. The nitrogen in this compound originates from dietary protein that is broken down to ammonia in the gut. This ammonia can be utilized for microbial protein synthesis, but unfortunately, the larger fraction of this toxin is absorbed, converted to urea, and excreted into the environment with disastrous consequences.

So why are the losses of ammonia from the gut so high? As recently as two decades ago, it was widely believed that

epithelial ammonia transport occurred by simple diffusion of the uncharged form ( $\text{NH}_3$ ) through the lipid bilayer of the cell membrane [57]. However, like water,  $\text{NH}_3$  has a strong dipole moment and it has become increasingly clear that proteins are required to mediate transport. In the collecting duct of the kidney, it has been established that aquaporins are required for the transport of water. Likewise, Rh-glycoproteins are necessary to mediate ammonia transport. The apical ammonia transporter RhCG is considered to be highly selective for  $\text{NH}_3$  while the substrate ( $\text{NH}_3$  or  $\text{NH}_4^+$ ) of the basolateral RhBG has not yet been clarified [12, 24, 35]. Far less information is available on intestinal absorption of ammonia. In analogy to the collecting duct, electroneutral apical uptake of  $\text{NH}_3$  via RhCG and basolateral efflux via RhBG has been proposed for the intestine of mice [25] or toadfish [10]. Conversely, exchange of  $\text{NH}_4^+$  with  $\text{H}^+$  via sodium-proton exchange (NHE) has been suggested in rat colon [13]. In pig caecum and trout intestine,  $\text{NH}_4^+$  is taken up in an unclear, electrogenic mechanism [46, 52].

Comparatively, more information is available concerning ammonia transport across the forestomach of ruminants. The interest is old [22, 33] and triggered by the low protein efficiency of cattle [20, 26]. In the largest of the forestomachs, the rumen, the cellulose-rich diet is broken up into digestible components by resident microbial populations. Microbial protein is produced from any nitrogen source available, including ammonia and urea [1, 43]. Unfortunately, large quantities of ammonia are absorbed from the rumen before they can be utilized. However, the ruminal epithelium expresses transport proteins through which urea can reenter the rumen and serve as a source of nitrogen for microbial protein synthesis [2, 43, 50, 65]. Since this protein can be fully digested in the following parts of the gastrointestinal tract, this recycling of nitrogen allows ruminants to subsist on low-grade, poorly digestible fodder while yielding milk and meat. Problems emerge when cattle are fed large quantities of high-quality protein required for maximal yields in industrial farming. In this scenario, blood urea levels rise and nitrogen recycling leads to secretion of some 10 mol  $\text{day}^{-1}$  of urea into the rumen, where it is degraded to ammonia, reabsorbed, and again converted to urea and resecreted, requiring  $\sim 40$  mol  $\text{day}^{-1}$  of ATP for hepatic detoxification. Despite recycling, up to 70% of dietary nitrogen is eventually excreted into the environment with urine and feces [20].

Clearly, a clarification of the mechanism responsible for the high efflux of ammonia from the rumen is overdue. The expression profile in the ovine rumen does not appear to support the involvement of either RhCG or RhCB [65]. Systematic studies of ruminal transport of ammonia have established that electroneutral transport of  $\text{NH}_3$  is predominant at an alkaline pH of 7.4. At a physiological pH of 6.4, transport primarily involves electrogenic uptake of  $\text{NH}_4^+$  [3, 4, 7, 22, 40]. Thus, studies with microelectrodes and in Ussing chambers have shown that exposure to  $\text{NH}_4^+$  depolarizes both

the apical membrane and the intact ruminal epithelium in toto with acidification of the cytosolic space [32, 45], resulting in stimulation of NHE [3, 4].

Based on both functional evidence and mRNA data, the bovine homologue of the non-selective transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 3 (bTRPV3) has recently emerged as a candidate for uptake of cations from the rumen, including  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  [40, 45]. Like most other members of the large family of TRP channels [39], both the human and the bovine homologue of TRPV3 are known to be permeable to a number of monovalent and divalent cations, including  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  [48, 63]. Given that certain plant-derived compounds modulate the activity of TRPV3 [55], this has implications both for the development of new drugs and for new feeding strategies [8]. Ruminants absorb considerable amounts of  $\text{Ca}^{2+}$  from the rumen to meet the high demand involved in milk production [61]. Based on electrophysiological data, a ruminal channel for  $\text{Ca}^{2+}$  has long been postulated [27, 62], although the typical epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6 are not expressed in the ruminal epithelium [45, 60]. Intriguingly, TRPV3 channels are activated by intracellular protons [36], which may explain the well-documented stimulatory effects of short-chain fatty acids on ruminal calcium uptake [61].

In contrast to a wealth of data concerning the permeability of TRPV3 to  $\text{Ca}^{2+}$  [36, 39, 55, 63], the permeability of TRP channels in general and TRPV3 in particular to  $\text{NH}_4^+$  had never been investigated before our recent patch-clamp study of HEK-293 cells [48]. One goal of the present study was to confirm transport of  $\text{NH}_4^+$  by bTRPV3 using a different expression system (*Xenopus* oocytes) and a different method (pH-sensitive microelectrodes), both as established in studies of other ammonia transporters [12, 24]. Furthermore, a confirmed sequence and detection on the protein level are lacking. The major aim of the current study was therefore to properly sequence the bTRPV3, to establish a suitable antibody, and finally to localize the channel in the ruminal epithelium.

## Materials and methods

### Animal welfare

The maintenance and surgical treatment of *Xenopus laevis* frogs was in accordance with the guidelines of German legislation, with approval by the animal welfare officer for the Freie Universität Berlin and under the governance of the Berlin Veterinary Health Inspectorate (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, permit G0025/16).

Bovine ruminal epithelium was obtained from Holstein-Friesian cattle slaughtered for meat production in a commercial abattoir (Beelitz, Germany), also under control of the German authorities.

## Ruminal tissue

Pieces of the bovine rumen were removed about 10 min after death and immediately stripped, rinsed twice with PBS, and dissected into pieces of 1 to 2 cm<sup>2</sup>. Samples were shock-frozen in liquid nitrogen and stored at – 80 °C or transferred into formaldehyde solution (Roti®-Histofix 4%, Carl Roth, Karlsruhe, Germany). Unless indicated otherwise, only ventral rumen was used as the locus with maximal absorptive capacity.

## Sequencing and cloning of *bTRPV3*

Shock-frozen bovine ruminal epithelium was used for mRNA extraction with subsequent reverse transcription to cDNA, which was used to sequence the bovine representative of the *TRPV3* channel (*bTRPV3*). The construct was tagged with a streptavidin (Strep) tag (ShineGene Bio-Technologies Inc., Shanghai, China), which was placed at the N terminus to prevent possible interference with a C-terminal PDZ binding motif found in some TRP channels [41]. This Strep-*bTRPV3* construct was then subcloned into pIRES2-*AcGFP1* (Takara BioEurope, Saint-Germain-en-Laye, France) or into pcDNA5/TO (Life Technologies, Darmstadt, Germany) as described previously [48]. Cells successfully transfected with Strep-*bTRPV3*-pIRES2-*AcGFP1* showed green fluorescence.

For expression of *bTRPV3* in *Xenopus* oocytes, the restriction enzymes *PasI* and *XbaI* were used to replace the last 716 bp of the Strep-*bTRPV3*-pcDNA5/TO construct with a 713-bp fragment lacking the stop codon. The resulting construct was then cut out from Strep-*bTRPV3*-pcDNA5/TO and subcloned into pGEM-HE-MCS (kindly donated by Prof. Blanche Schwappach, Georg-August-Universität, Göttingen, Germany) via the restriction sites *HindIII* and *XbaI*. The restriction enzyme *MluI* was used for linearization and RiboMAX Large Scale RNA Production System-T7 (Promega, Mannheim, Germany) was used for in vitro transcription to cRNA according to the manufacturer's instructions.

## Harvesting and injection of *Xenopus* oocytes

*Xenopus laevis* oocytes were obtained and prepared as described by Vitzthum et al. [54] After surgical removal, ovarian lobes were placed in oocyte Ringer's solution (180 mOsm kg<sup>-1</sup> adjusted with D-mannitol) [54], shaken mechanically for 90 min, and transferred into calcium-free oocyte Ringer's solution for 10 min. Defolliculated stage V–VI oocytes were stored in oocyte culture solution at 16 °C until the following day, when they were injected with 50 nL RNase free water containing 15–30 ng of *bTRPV3*-Strep cRNA (WPI Nanoliter 2010, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA). Control oocytes were injected with 50 nL RNase free

water. Injected oocytes were incubated for at least 3 days in modified low-sodium oocyte culture solution before use in experiments (in mmol L<sup>-1</sup>: 80 N-methyl-D-glucamine chloride (NMDGC1), 5 NaCl, 5 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 2.5 2-Oxopropanoic acid, 1 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>, 50 units mL<sup>-1</sup> penicillin, 0.05 mg mL<sup>-1</sup> streptomycin, pH 7.4 adjusted with tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris), 223 mOsm kg<sup>-1</sup> adjusted with D-mannitol).

## Cell culture and transfection of HEK-293 cells

HEK-293 cells (DSMZ, Braunschweig, Germany, 2016/06/08) were cultivated at 37 °C in Dulbecco's modified Eagle's medium (FG 0445) supplemented with 10% fetal bovine serum and 100 units mL<sup>-1</sup> of penicillin and streptomycin (all Biochrom, Berlin, Germany). Polyethylenimine (PEI, linear, MW 25000, Polysciences, Inc., Hirschberg an der Bergstrasse, Germany) was used to transiently transfect the cells with the Strep-*bTRPV3*-pIRES2-*AcGFP1* vector or with the empty pIRES2-*AcGFP1* vector as control (<http://www.cytographica.com/lab/PEItransfect.html>). Experiments were performed 48 h after transfection.

## Immunoblotting

Both the solvents and the samples were cooled throughout the experiments to minimize protein degradation.

## Bovine rumen

RIPA buffer (500 µL; in mmol L<sup>-1</sup>: 25 HEPES, 2 EDTA, 25 NaF, protease inhibitor (cOmplete™, mini, Roche, Basel, Switzerland), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)) was added to the defrosted tissue (200 mg) together with two metal beads. The tissue was homogenized in a mixer mill (30 × 2 min; MM 200, Retsch GmbH, Haan, Germany), followed by a clarifying spin (15 min, 20,000 g, 4 °C). The supernatant containing the protein was transferred into a new tube.

## *Xenopus* oocytes

After the removal of the culture medium, ten oocytes of each transfected group were lysed mechanically in oocyte lysis buffer (500 µL; in mmol L<sup>-1</sup>: 5 MgCl<sub>2</sub>, 5 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 EDTA, 80 sucrose, pH 7.4 (Tris)). The suspension was centrifuged (200 rpm, 10 min, 4 °C) and the supernatant was transferred to a new tube, after which the centrifugation step was repeated. The supernatant was then centrifuged a third time (13,000 rpm, 40 min, 4 °C). The precipitate was suspended in fresh oocyte lysis buffer (40 µL).



## HEK-293 cells

After washing with phosphate-buffered saline (PBS), HEK-293 cells were harvested mechanically by scraping in PBS. After centrifugation (500 g, 5 min), the cell pellet was suspended in PBS (1 mL) and transferred into a new tube. PBS was removed via centrifugation (700 g, 4 min) and the cell pellet was suspended in RIPA buffer (100  $\mu$ L). Lysis was performed for 30 min with gentle agitation and 5 min in an ultrasound bath, followed by a clarifying spin (20 min, 15,000 g), and supernatant with protein was stored at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

The protein concentration of each suspension was determined using the Pierce™ 660 nm protein assay kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA). Proteins were denatured in SDS sample loading buffer (10%) and electrophoresed on polyacrylamide gels (7.5%, SDS-PAGE) in Tris-Glycine buffer (0.1% SDS). Electroblothing was performed onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, Immun-Blot®, Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) in Tris-Glycine buffer (0.3% SDS, 20% methanol,  $4^{\circ}\text{C}$ ).

## Antibodies against bTRPV3

After the first attempts to stain ruminal tissues with a commercial antibody against the human homologue (ab63148, abcam, Cambridge, UK) had failed, epitopes of several commercial antibodies against the human TRPV3 channel were aligned with the sequence of the bovine homologue. A primary mouse antibody directed against an epitope (AA 458–474) from the first extracellular loop of the human TRPV3 channel was selected as the most promising candidate and used at a dilution of 1:3000 (ID: ABIN863127, antibodies-online GmbH, Aachen, Germany). The human epitope (SYRPREEEAIPHLA) showed almost complete homology with the bovine sequence (SYRPREEEALPHLA). For control purposes, a primary mouse antibody directed against the Strep-tag of the clones (1:2500; ID: 34850, Qiagen, Hilden, Germany) was used. Horseradish peroxidase conjugated secondary antibody (anti-mouse, 1:1000; Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany) was used to detect the primary antibodies on the membrane. Proteins were visualized by use of the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany).

These experiments yielded an additional prominent band below the expected molecular weight of full-length bTRPV3. To test for binding via the domains specific for the target epitope [9], additional immunoblots with primary TRPV3 antibody were performed in the presence and absence of the peptide used to produce the TRPV3 antibody (referred to as specific immunizing peptide or SIP, smc 334d\_peptide, antibodies online GmbH, Aachen, Germany) and a control peptide (CP, anti SLC41A3, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), all at 1:1000. Exposure time was

optimized via the ImageLab software (BioRad), which was also used to calculate the relative quantities (see Supplement).

## Immunohistological staining

All preparation steps were performed as described in detail in the Supplement or as described in [51]. Samples from both the ventral and the dorsal rumen were stained with primary antibody diluted in goat serum (5% in PBS; PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) according to Table 1 ( $4^{\circ}\text{C}$ , overnight). Secondary antibody controls were performed with goat serum (5% in PBS) only. To test for specificity of binding, adjacent slices from the same sample of ruminal tissue were incubated in parallel either with the primary mouse TRPV3 antibody only or with a mix of this antibody and its corresponding antigenic peptide (SIP) (Table 1). Images were obtained using a confocal laser-scanning microscope (LSM 510, Axiovert200M, Zeiss, Jena, Germany) at 405, 488, and 543 nm.

## Double-barrelled pH-sensitive microelectrode measurements

pH-sensitive microelectrodes were prepared as described in detail previously [2] and in the Supplement. The potential difference between the pH-sensitive barrel and the reference barrel was used to determine the intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ), while the potential difference between the reference barrel and the ground signal from the bath corresponded to the membrane potential ( $U_{\text{mem}}$ ). Electrodes were calibrated before and after each measurement ( $23^{\circ}\text{C}$ ). After each measurement of an oocyte expressing bTRPV3, a control oocyte was measured.

All microelectrode solutions were adjusted to an osmolality of 223 mOsm  $\text{kg}^{-1}$  using D-mannitol, and were adjusted to pH 7.4 (Tris) and contained (in mmol  $\text{L}^{-1}$ ) 5 HEPES, 1  $\text{CaCl}_2$ , 1  $\text{MgCl}_2$ , and 1 KCl. The following solutions were used (in mmol  $\text{L}^{-1}$ ): NaCl (85 NaCl), KCl (81 KCl, 5 NaCl), NaGlu (80 sodium D-gluconate (NaGlu), 5 NaCl, 10 NMDGCl),  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (5 NaCl, 80  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ),  $\text{NH}_4\text{Cl}$ -EDTA (5 NaCl, 80  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 5 NMDGCl, no  $\text{CaCl}_2$  and no  $\text{MgCl}_2$ ), NMDGCl (80 NMDGCl, 5 NaCl), and NaCl-6.4 (85 NaCl, 5 2-(*N*-morpholino) ethanesulfonic acid (MES), pH 6.4, no HEPES).

## Inside-out patch-clamp experiments

Single-channel experiments were performed as previously described [23, 48] in a continuously perfused bath chamber at  $23^{\circ}\text{C}$ . Pipettes were pulled with a DMZ Universal Puller (Zeitz Instruments, Munich, Germany). Currents were recorded by an EPC 9 patch-clamp amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht, Germany) using the Patchmaster Software (HEKA Electronic). Data were sampled at 10 kHz and filtered at 250 Hz. Currents were clamped at the potentials  $-60$  to  $+$

**Table 1** Primary and secondary antibodies used for immunohistochemical staining

	HEK-293 cells	Ruminal tissue	<i>Xenopus</i> oocytes
Primary antibody 1	mouse TRPV3 antibody (1:1000) <sup>§</sup>	mouse TRPV3 antibody (1:1000) <sup>§</sup>	mouse TRPV3 antibody (1:1000) <sup>§</sup>
Primary antibody 2		rabbit claudin-4 antibody (1:250) <sup>&amp;</sup>	
Secondary antibody 1	594 goat anti-mouse IgG (1:1000) <sup>*</sup>	488 goat anti-mouse IgG (1:1000) <sup>*</sup>	488 goat anti-mouse IgG (1:1000) <sup>*</sup>
Secondary antibody 2		594 goat anti-rabbit IgG (1:1000) <sup>*</sup>	
Immunizing Peptide		smc-334d <sub>peptide</sub> (1:330) <sup>#</sup>	

<sup>§</sup> ABIN863127, antibodies-online GmbH, Aachen, Germany

<sup>\*</sup> Alexa Fluor®, Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA

<sup>&</sup> AB53156, Abcam, Cambridge, UK

<sup>#</sup> smc-334d<sub>peptide</sub>, antibodies-online GmbH, Aachen, Germany

60 mV in 10 mV steps for 6 s each. After each oocyte over-expressing bTRPV3, a control oocyte was measured.

All single-channel patch-clamp solutions were adjusted to an osmolality of 223 mOsm kg<sup>-1</sup> using D-mannitol and had a pH of 7.4 adjusted with Tris and HCl. Initially, oocytes were incubated (5–10 min) in oocyte Ringer (in mmol L<sup>-1</sup>: 96 NaCl, 5 HEPES, 2.5 2-Oxopropanoic acid, 1 KCl, 1 CaCl<sub>2</sub>, 1 MgCl<sub>2</sub>). Oocytes were then placed in a cell culture dish under a dissecting microscope and D-mannitol was added incrementally until the vitelline membrane began to dissociate so that it could be manually removed with sharpened forceps. Care was taken not to damage the plasma membrane. After allowing the stripped oocyte to settle on the glass bottom of a conventional flow chamber over an inverted microscope (Axiovert.A1, Zeiss), a seal was formed and a membrane patch excised and measured in the usual manner. Solutions were based on those used by Doerner et al. [18] and contained (in mmol L<sup>-1</sup>) 20 HEPES, 5 CsCl, 1 ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA), and 1 KCl. The pipette and the NH<sub>4</sub>Cl bath solution additionally contained NH<sub>4</sub>Cl (96 mmol·L<sup>-1</sup>). In NaCl, KCl, and NMDGCl bath solutions, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was replaced by the same amount of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, or NMDG<sup>+</sup> respectively. NH<sub>4</sub>Glu bath solution substituted 81 mmol L<sup>-1</sup> NH<sub>4</sub>Cl with NH<sub>4</sub>-gluconate.

## Data analysis

Data processing was performed using Igor Pro 6.2.2.2 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA) and Sigma Plot 11.0 (Systat Software 11.0, Erkrath, Germany). All potentials were corrected for liquid junction potential using the JPCalcWin software (School of Medical Sciences, Sydney, Australia) [6].

In the microelectrode experiments, relative permeability ratios were calculated according to standard methods from the membrane potentials using Goldman-Hodgkin-Katz theory (GHK) [39, 45].

$$U_A - U_B \approx -\frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left( \frac{P_A \cdot [A]_o}{P_B \cdot [B]_o} \right) \quad (1)$$

Here,  $U_x$  designates the membrane potential in solution  $X$ ,  $F$  is the Faraday constant, and  $T$  is the absolute temperature, while  $P_x$  designates the permeability,  $[X]_i$  the inside, and  $[X]_o$  the outside concentration of ion  $X$ . Note that this equation assumes that the leak current is low as are the contributions of extracellular K<sup>+</sup> and intracellular Cl<sup>-</sup>.

Single-channel data were analyzed as described previously [23, 48] and in the Supplement. To gain an overview of the conductances determined from the analysis of different patches, data were plotted in amplitude histograms. For this, data from all patches were collected, after which the conductance range was divided into a number of equidistant bins, which were plotted on the horizontal axis. The vertical axis gives the number of patches with a conductance falling into the corresponding bin on the  $X$ -axis. Note that the bars in these histograms do not correspond to discrete conductance steps.

## Statistical analysis

All data were statistically evaluated using SigmaStat 11.0. After testing for normality using the Shapiro-Wilk test, comparisons between two groups were performed using the Mann-Whitney rank sum test. In cases where different solutions were applied consecutively, differences were evaluated using ANOVA on ranks followed by the Student-Newman-Keuls method for multiple comparisons or the Wilcoxon

signed-rank test for pairwise comparisons. A significant difference was assumed if  $p \leq 0.05$ .

Obtained values were given as means  $\pm$  SEM, rounding as recommended by the DIN 1333 [17]. The  $n$  value represents the amount of individual experiments whereas  $n/N$  refers to the number of experiments ( $n$ ) from different animals ( $N$ ).

## Results

### Immunohistochemical detection of bTRPV3 in the ruminal epithelium

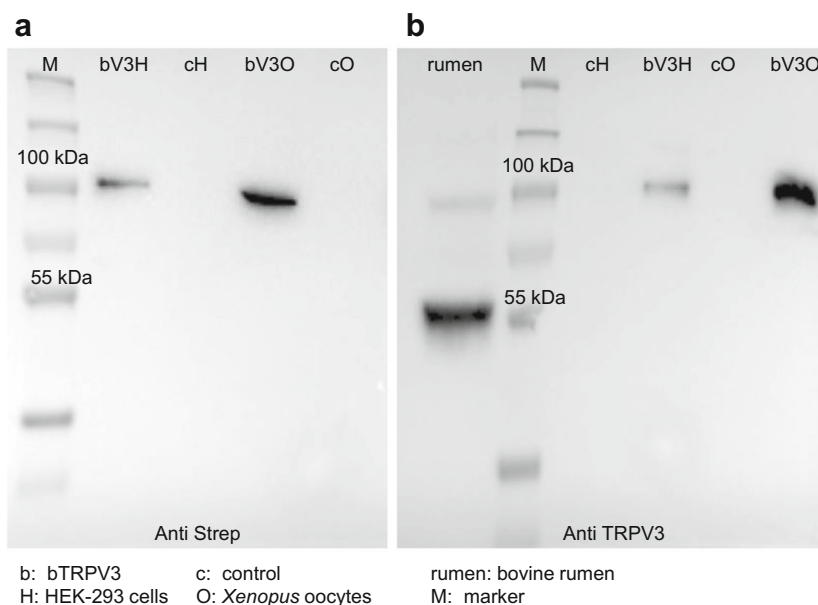
In a first step, the bovine gene for *TRPV3* was sequenced from ruminal tissue (GenBank: MF063038.1; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/1220516332>). The resulting sequence of 2397 base pairs (bp) showed  $\sim 90\%$  homology with human *TRPV3*. Via epitope screening, a promising TRPV3 antibody was selected and its suitability controlled in the two expression systems *Xenopus laevis* oocytes and HEK-293 cells. Successful bTRPV3 expression was confirmed by an immunoblot with detection of the Strep-tag ( $n = 8$ , Fig. 1a), demonstrating a band at the predicted molecular weight of bTRPV3 ( $\sim 90$  kDa) in overexpressing cells, but not in controls. In a second step, the TRPV3 antibody was tested in both expression systems and in protein samples from bovine rumen ( $n/N = 7/5$ , Fig. 1b). Both overexpressing and ruminal samples showed a band at  $\sim 90$  kDa. Controls showed no staining. In

protein from native ruminal epithelium, the TRPV3 antibody stained a second, stronger band at  $\sim 60$  kDa. The blot was repeated in the absence and presence of the specific peptide (SIP) used to produce the TRPV3 antibody. Co-incubation with SIP markedly reduced staining intensity, proving binding of the TRPV3 antibody via the domains specific for the target epitope (see methods and the Supplement).

For imaging, HEK-293 cells ( $n = 2$ , Fig. 2) and oocytes ( $N = 3$ , Fig. 3) were stained with the TRPV3 antibody. In both cases, the cell membrane showed staining for bTRPV3 in overexpressing cells, but not in cells treated with the secondary antibody only or in control cells. Finally, native bovine ruminal tissue from four different animals was stained using the TRPV3 antibody (Fig. 4). Epithelial layers from the *stratum basale* to the *stratum granulosum* were strongly stained, with detection both in the cellular membrane and in the cytosol. In addition, a number of cells within the lower parts of the *stratum corneum* showed staining. Conversely, staining of structures within the subepithelial layers was weak. Treatment with the secondary antibody only did not result in staining. Co-incubation with SIP strongly reduced staining (Fig. 4e, f).

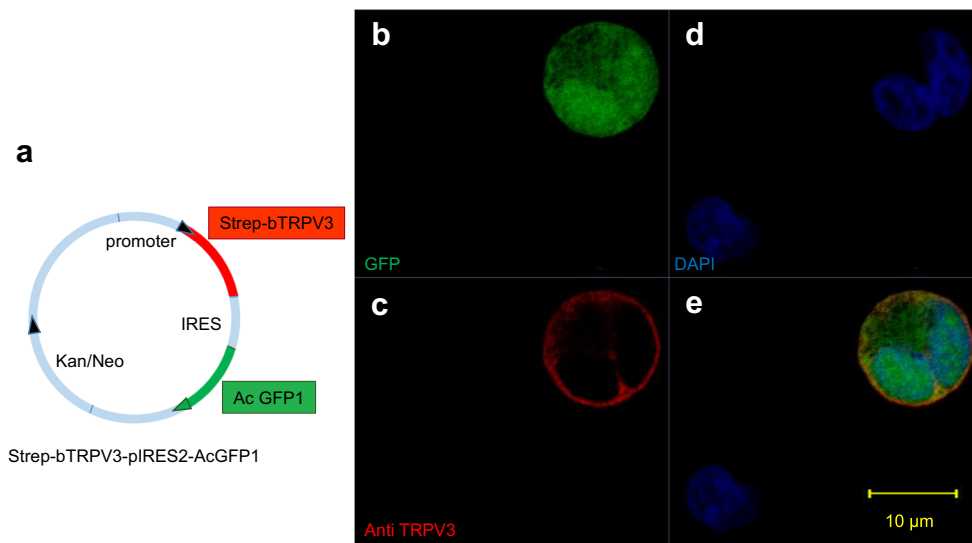
### Experiments with pH-sensitive microelectrodes

Since *Xenopus* oocytes are an established system for studying ammonia transport [12, 24], the intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) and the membrane potential ( $U_{\text{mem}}$ ) of oocytes expressing bTRPV3



**Fig. 1** Comparative immunoblots to validate specific binding of the TRPV3 antibody. **a** Identification via Strep antibody: the marker lane (M) is followed by HEK-293 cells transfected with the Strep-tagged bTRPV3 construct (bV3H) or the control vector (cH), followed by oocytes injected with Strep-tagged bTRPV3 (bV3O) or water (cO). A strong band can be seen at  $\sim 90$  kDa in the overexpressing samples but not in

controls, representing Strep-tagged bTRPV3. **b** Identification via TRPV3 antibody: the four lanes to the right of the marker lane (M) represent bTRPV3 and controls as in **a**. On the left-hand side, bovine ruminal protein (rumen) has been added, showing a band at about  $\sim 90$  kDa. A second, more prominent band is observed at  $\sim 60$  kDa. (protein loading: HEK-293 0.02  $\mu\text{g}$ , oocytes 0.20  $\mu\text{g}$ , rumen 50  $\mu\text{g}$ )



**Fig. 2** Immunohistological staining of overexpressing bTRPV3 HEK-293 cells. **a** Vector used for transfection. The *bTRPV3* gene is fused to a Strep-tag, but not to green fluorescent protein (GFP). **b** Immunohistological staining reveals successful expression of cytosolic GFP. **c** Staining with the TRPV3 antibody (red) shows expression in

the cellular membrane. **d** All cell nuclei were stained with DAPI (blue). **e** Overlay of **b**, **c**, and **d**. The cell in the top right-hand corner is in the process of division with both halves expressing bTRPV3 and GFP. The cell in the lower left-hand corner was not successfully transfected

and controls were investigated using pH-sensitive double-barrelled microelectrodes.

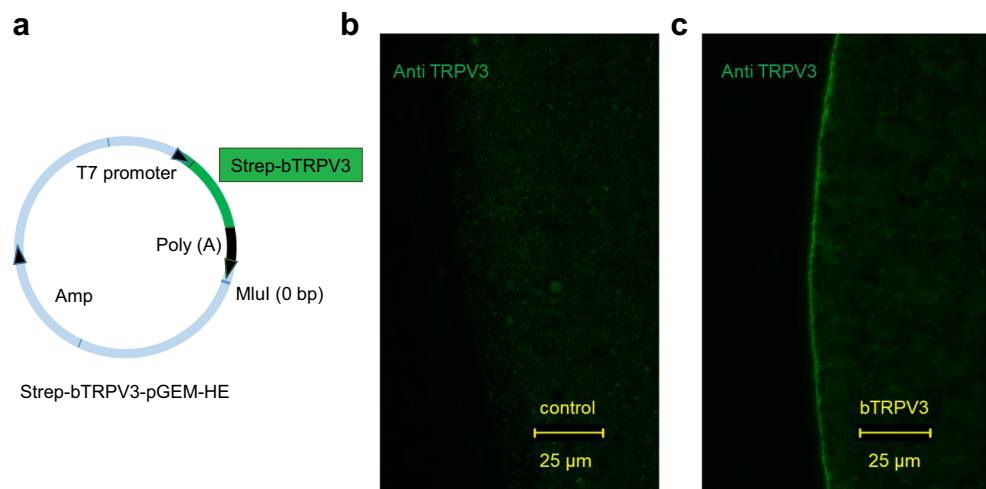
In a first set of screening experiments on oocytes, the effect of a replacement of bath  $\text{Na}^+$  by  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$ , and  $\text{NMDG}^+$  was investigated, as well as the effect of a replacement of  $\text{Cl}^-$  by gluconate ( $\text{Glu}^-$ ). All successfully impaled bTRPV3 oocytes responded to the application of KCl solution with a depolarization (from  $-20 \pm 4$  mV to  $-12 \pm 4$  mV,  $n/N = 6/1$ ,  $p = 0.006$ ) with recovery to  $-18 \pm 3$  mV (Fig. 5 a and b). Responses to  $\text{Glu}^-$  were variable, with little impact on  $U_{\text{mem}}$  in three of the six oocytes studied (Fig. 5a). The other three oocytes were depolarized by  $\Delta U_{\text{mem}} = 14 \pm 4$  mV (Fig. 5b), reflecting expression of  $\text{Cl}^-$  channels [38, 42]. However, overall, effect of  $\text{Glu}^-$  did not pass testing for significance ( $p =$

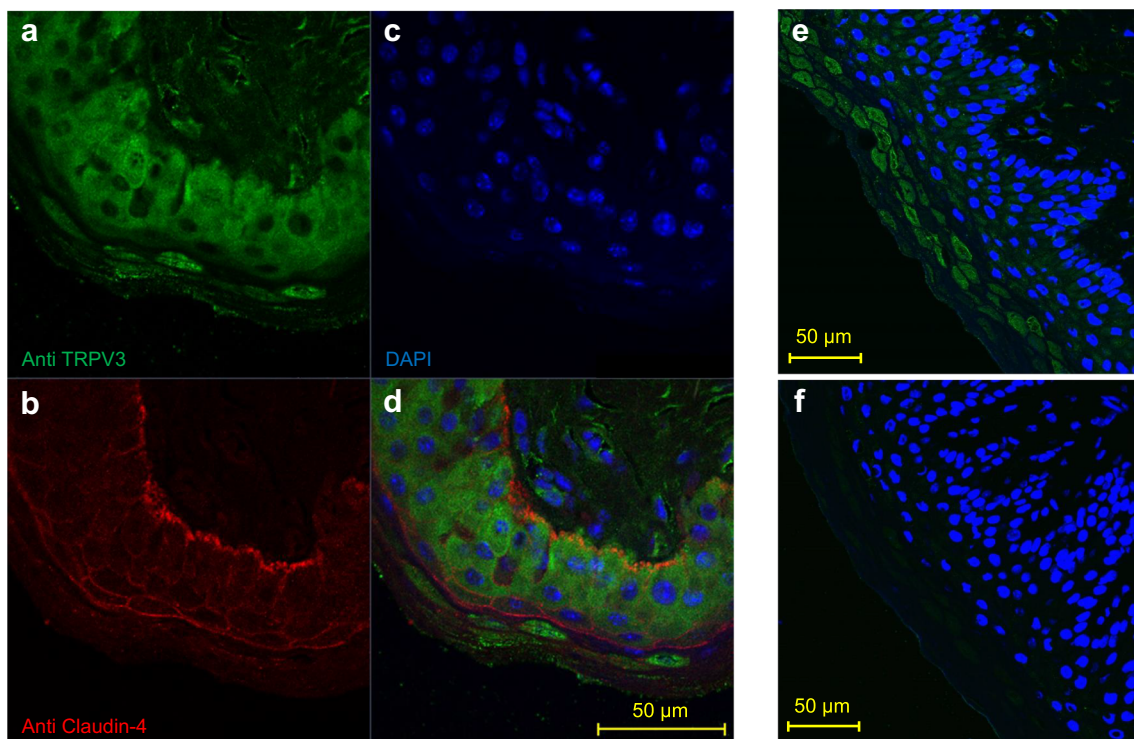
0.6), so that  $U_{\text{mem}}$  appears to be primarily determined by the cation conductances:

$$U_{\text{mem}} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left( \frac{P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_o + P_{\text{K}} \cdot [\text{K}^+]_o}{P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_i + P_{\text{K}} \cdot [\text{K}^+]_i} \right) \approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left( \frac{P_{\text{Na}} \cdot [\text{Na}^+]_o}{P_{\text{K}} \cdot [\text{K}^+]_i} \right) \quad (2)$$

Mean  $\text{pH}_i$  was not visibly affected by these solution changes, but rose continuously from  $7.39 \pm 0.12$  after impalement to  $7.61 \pm 0.10$  after washout of  $\text{Glu}^-$  ( $p = 0.07$ ). Subsequent application of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution resulted in a rapid depolarization of all bTRPV3 oocytes studied ( $-4.0 \pm 2.2$  mV,  $p = 0.008$ ) with a highly significant  $\text{pH}_i$  decline to  $6.22 \pm 0.18$

**Fig. 3** Immunohistological staining of bTRPV3 in *Xenopus* oocytes. **a** pGEM construct containing a Strep-tagged *bTRPV3* sequence for *in vitro* transcription to cRNA. **b** and **c** Immunohistological staining of two oocytes 4 days after injection of **b** water or **c** *bTRPV3* cRNA. Cells were stained with TRPV3 antibody and investigated using the same microscope settings. Only overexpressing oocytes **c** show staining of the cellular membrane with the TRPV3 antibody

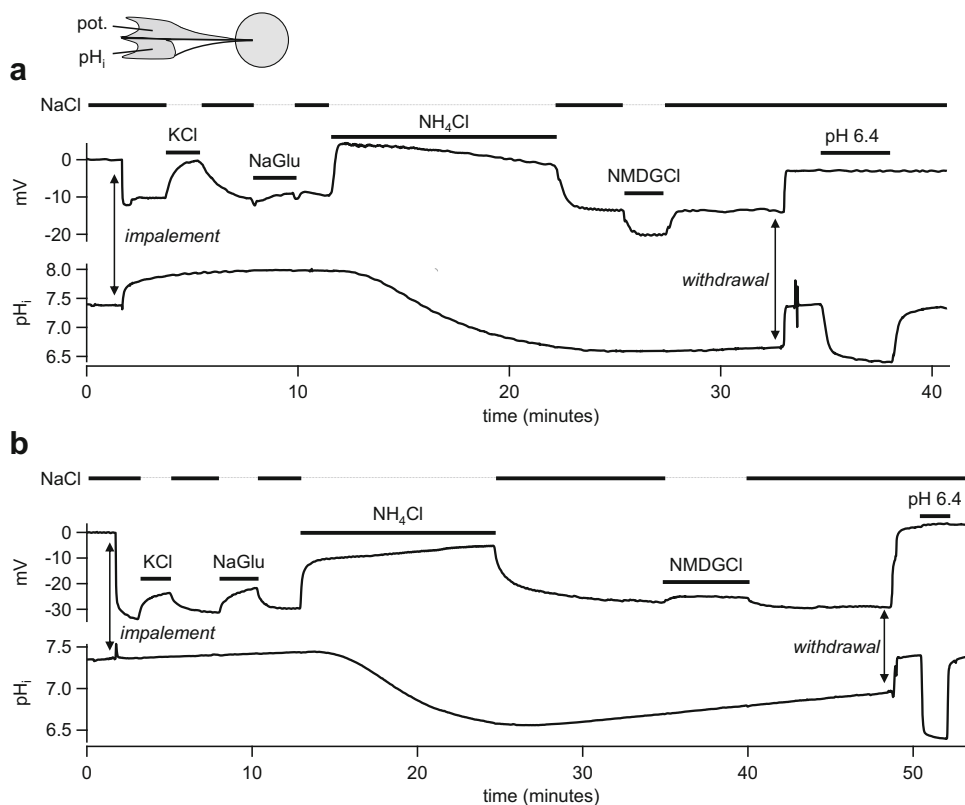




**Fig. 4** Immunohistological staining of native ruminal epithelium. **a** Staining of ventral rumen with the antibody against bTRPV3 (green), demonstrating strong staining of all epithelial layers. Although staining of peripheral structures (most likely representing the cellular membrane) could be clearly seen, cytosolic staining was intense throughout. **b** Claudin-4 (red) forms junctions between the cells. **c** Cell nuclei are shown

in blue (DAPI). **d** Overlay of **a**, **b**, and **c**. **e** Staining of dorsal rumen with the bTRPV3 antibody and DAPI. **f** Using the same rumen sample and same microscope settings as in **e**, treatment with both the TRPV3 antibody and its immunizing peptide (SIP) prevented most of the staining for bTRPV3

**Fig. 5** Original recordings of two oocytes expressing bTRPV3 measured via pH-sensitive, double-barreled microelectrodes. All oocytes uniformly responded to KCl and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  with a rapid and reversible depolarization. Only application of  $\text{NH}_4\text{Cl}$  induced a strong and reversible acidification. Responses to NaGlu and NMDGCl varied, as shown in **a** and **b** and discussed in the text

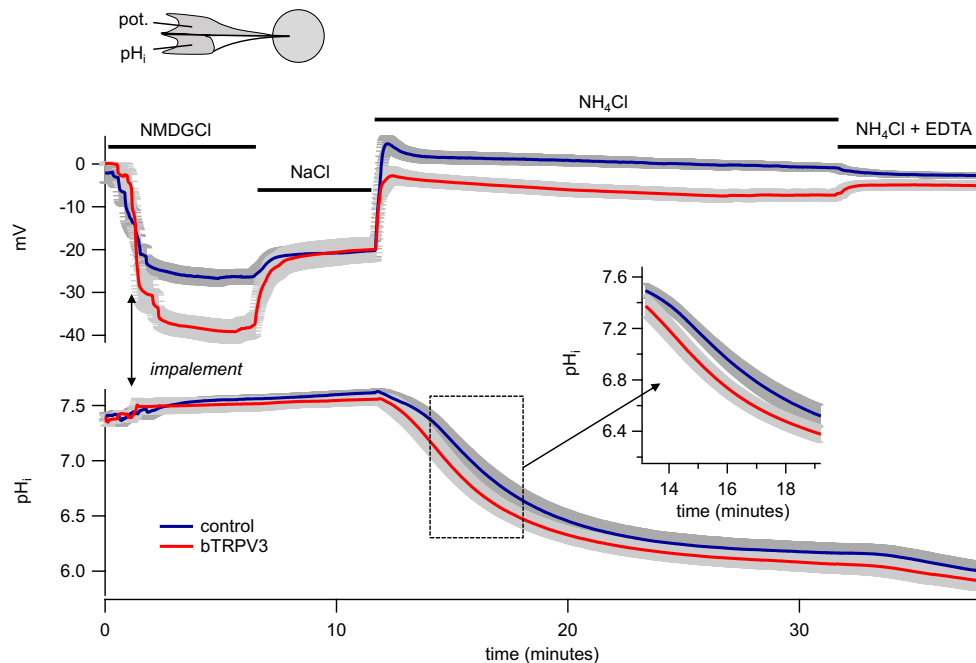


( $p = 0.006$ ). Return to NaCl solution resulted in an immediate repolarization of all oocytes to  $-17 \pm 3$  mV. Intracellular pH recovered more gradually, reaching  $6.27 \pm 0.14$  after 10 min. Replacement of  $\text{Na}^+$  by  $\text{NMDG}^+$  during the recovery phase had no impact on  $\text{pH}_i$ , but induced a strong reversible hyperpolarization in three oocytes ( $\Delta U_{\text{mem}} = 10 \pm 4$  mV, Fig. 5a), reflecting reduced influx of cations. Unexpectedly, the three other bTRPV3 oocytes responded with a slight depolarization ( $\Delta U_{\text{mem}} = 2.7 \pm 0.3$  mV, Fig. 5b). This may reflect induction of membrane leakage by high concentrations of  $\text{NMDG}^+$  as described previously [38]. Due to converse reactions, the overall effect of  $\text{NMDG}^+$  was not significant ( $p = 0.5$ ). In seven control oocytes from the same frog, effects were not significantly different, although interestingly, six of them responded to  $\text{NMDG}^+$  with a hyperpolarization.

In a second set of experiments, the effect of  $\text{NH}_4^+$  was studied more rigidly in *Xenopus* oocytes from three animals, strictly alternating between bTRPV3 and control oocytes (Fig. 6 and Table 2). To assess leak currents, experiments started in an NMDGCl solution, in which bTRPV3 oocytes had a significantly lower  $U_{\text{mem}}$  than controls. This undoubtedly reflects higher efflux of  $\text{K}^+$  through bTRPV3 channels, resulting in a lower resting potential. A slight continuous alkaline drift was observed. Replacement of  $\text{NMDG}^+$  by  $\text{Na}^+$  did not change

this drift in  $\text{pH}_i$ , suggesting that any baseline activity of NHE was discrete. Addition of  $\text{Na}^+$  resulted in a strong depolarization of all oocytes studied, with a potential jump significantly higher in the bTRPV3 group, but reaching the same end level as in the controls. According to GHK theory, this is to be expected if overexpression of bTRPV3 increases both the permeability to  $\text{K}^+$  (i.e.,  $\text{K}^+$  efflux) and the permeability to  $\text{Na}^+$  (i.e.,  $\text{Na}^+$  influx) by the same factor. While absolute currents should increase, the  $U_{\text{mem}}$  (Eq. 2) should remain roughly the same.

Application of  $\text{NH}_4^+$  caused a further depolarization in both cell types. Relative to the potential in NMDGCl, the magnitude of depolarization was significantly higher in oocytes expressing bTRPV3, suggesting higher influx of  $\text{NH}_4^+$ . However, in absolute terms, the resulting  $U_{\text{mem}}$  in  $\text{NH}_4^+$  was lower in bTRPV3 expressing oocytes, again reflecting higher  $\text{K}^+$  efflux. From these potentials, relative permeability ratios can be determined that are given in Table 2, which showed that relative to  $\text{NMDG}^+$ , bTRPV3 expressing oocytes showed significantly higher conductances to both  $\text{Na}^+$  and  $\text{NH}_4^+$ . In line with this, after application of  $\text{NH}_4^+$ , an acidification was observed in all oocytes that was significantly faster in bTRPV3 oocytes than in controls, suggesting a higher absolute influx of  $\text{NH}_4^+$  ions. However, final



**Fig. 6** Intracellular pH ( $\text{pH}_i$ ) and membrane potential (in mV) of oocytes expressing bTRPV3 ( $n/N = 14/3$ ) and control oocytes ( $n/N = 16/3$ ). The blue traces show the means ( $\pm$  SEM in gray) of all control oocytes, the red traces the means ( $\pm$  SEM in gray) of all bTRPV3 oocytes. Overexpressing bTRPV3 oocytes had a significantly lower membrane potential in NMDGCl than controls, reflecting higher efflux of  $\text{K}^+$  through bTRPV3 channels. Subsequent application of NaCl led to a stronger potential jump in oocytes expressing bTRPV3. The final potential was equal to that of controls, reflecting both a higher influx of  $\text{Na}^+$  and a

higher efflux of  $\text{K}^+$ . Relative to NMDGCl,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution induced a stronger depolarization in bTRPV3 oocytes than in controls, reflecting higher influx of  $\text{NH}_4^+$ . However, the final potential was slightly lower in bTRPV3 oocytes, suggesting a relatively higher efflux of  $\text{K}^+$  in bTRPV3 oocytes. Acidification after application of  $\text{NH}_4^+$  was significantly faster in bTRPV3 oocytes. Ultimately, both systems reached similar  $\text{pH}_i$ . Note the inverse responses in membrane potential after a switch to a divalent cation-free  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution (EDTA) (details see text and Table 2)

**Table 2** Membrane potential, intracellular pH and relative permeability ratios of bTRPV3 expressing (bV3,  $n/N = 14/3$ ) and control *Xenopus* oocytes (ctrl,  $n/N = 16/3$ ). Solutions were applied consecutively and values were measured 5 min after exposure unless indicated otherwise. Relative permeability ratios were calculated from Eq. 1 and contain contributions of leak currents. The last column gives the  $p$  values for differences between the two columns. Within columns, different superscripts indicate significant differences with  $p < 0.05$

Membrane potential (mV)			
	bTRPV3	control	p (bV3 vs. ctrl)
NMDGCl	$-39.2 \pm 2.6^a$	$-27.2 \pm 1.8^a$	0.001
NaCl	$-20.1 \pm 2.8^b$	$-20.3 \pm 2.2^b$	0.6
NH <sub>4</sub> Cl (3.5 min)	$-4.4 \pm 1.5^d$	$1.5 \pm 1.4^c$	0.003
NH <sub>4</sub> Cl (20 min)	$-7.2 \pm 1.3^c$	$-0.9 \pm 0.8^d$	$\leq 0.001$
NH <sub>4</sub> Cl-EDTA	$-5.0 \pm 1.1^d$	$-2.7 \pm 0.5^e$	0.03
Intracellular pH			
	bTRPV3	control	p (bV3 vs. ctrl)
NMDGCl	$7.52 \pm 0.07^a$	$7.56 \pm 0.04^a$	1.0
NaCl	$7.56 \pm 0.05^b$	$7.61 \pm 0.03^b$	0.9
NH <sub>4</sub> Cl (3.5 min)	$6.90 \pm 0.08^c$	$7.14 \pm 0.06^c$	0.04
NH <sub>4</sub> Cl (20 min)	$6.08 \pm 0.08^d$	$6.18 \pm 0.09^d$	0.6
NH <sub>4</sub> Cl-EDTA	$5.96 \pm 0.09^e$	$6.05 \pm 0.08^e$	0.6
Relative permeability ratio $p(X) / p(\text{NMDG}^+)$			
Ion X	bTRPV3	control	p (bV3 vs. ctrl)
Na <sup>+</sup>	$2.16 \pm 0.19^a$	$1.35 \pm 0.11^a$	0.002
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (20 min)	$3.41 \pm 0.22^b$	$2.78 \pm 0.21^b$	0.06
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (EDTA)	$3.76 \pm 0.30^c$	$2.58 \pm 0.17^c$	0.003

$\text{pH}_i$  did not differ, possibly reflecting an equilibrium primarily determined by the potential, the concentration gradients, and the pH regulatory mechanisms rather than by the permeability.

Subsequent removal of  $\text{Ca}^{2+}$  from the solution with buffering by EDTA had inverse effects on bTRPV3 expressing and control oocytes. As expected, all bTRPV3 oocytes were depolarized by removal of  $\text{Ca}^{2+}$  in line with greater influx of  $\text{NH}_4^+$  through bTRPV3 after removal of  $\text{Ca}^{2+}$ , which permeates the pore of bTRPV3 with high affinity, thus interfering with the entry of monovalent cations. More surprising was the observation that all control oocytes were hyperpolarized. Most likely, this reflects a lower expression of divalent-sensitive cation channels in conjunction with an opening of calcium-inactivated  $\text{Cl}^-$  channels that are endogenously expressed by *Xenopus* oocytes [42]. In both groups of oocytes, application of EDTA resulted in a further slight acidification. In bTRPV3 oocytes, speed of acidification rose from  $(-8 \pm 4) 10^{-3}$  pH units/min before application of EDTA to  $(-34 \pm 6) 10^{-3}$  pH units/min ( $p \leq 0.001$ ) 5 min later, in controls, from  $(-3.2 \pm 1.7) 10^{-3}$  pH units/min to  $(-41 \pm 9) 10^{-3}$  pH units/min ( $p = 0.006$ ), with no significant difference between the groups ( $p = 0.11$ ). Likewise, the end value of  $\text{pH}_i$  did not differ between the two groups.

In conjunction, these results suggest that both groups of oocytes express conductances to  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ , and  $\text{NH}_4^+$ , with permeability relative to  $\text{NMDG}^+$  (plus leak currents) higher in bTRPV3 oocytes (Table 2). In both groups, any permeability to  $\text{NH}_3$  is much smaller than that to  $\text{NH}_4^+$ .

## Patch-clamp experiments

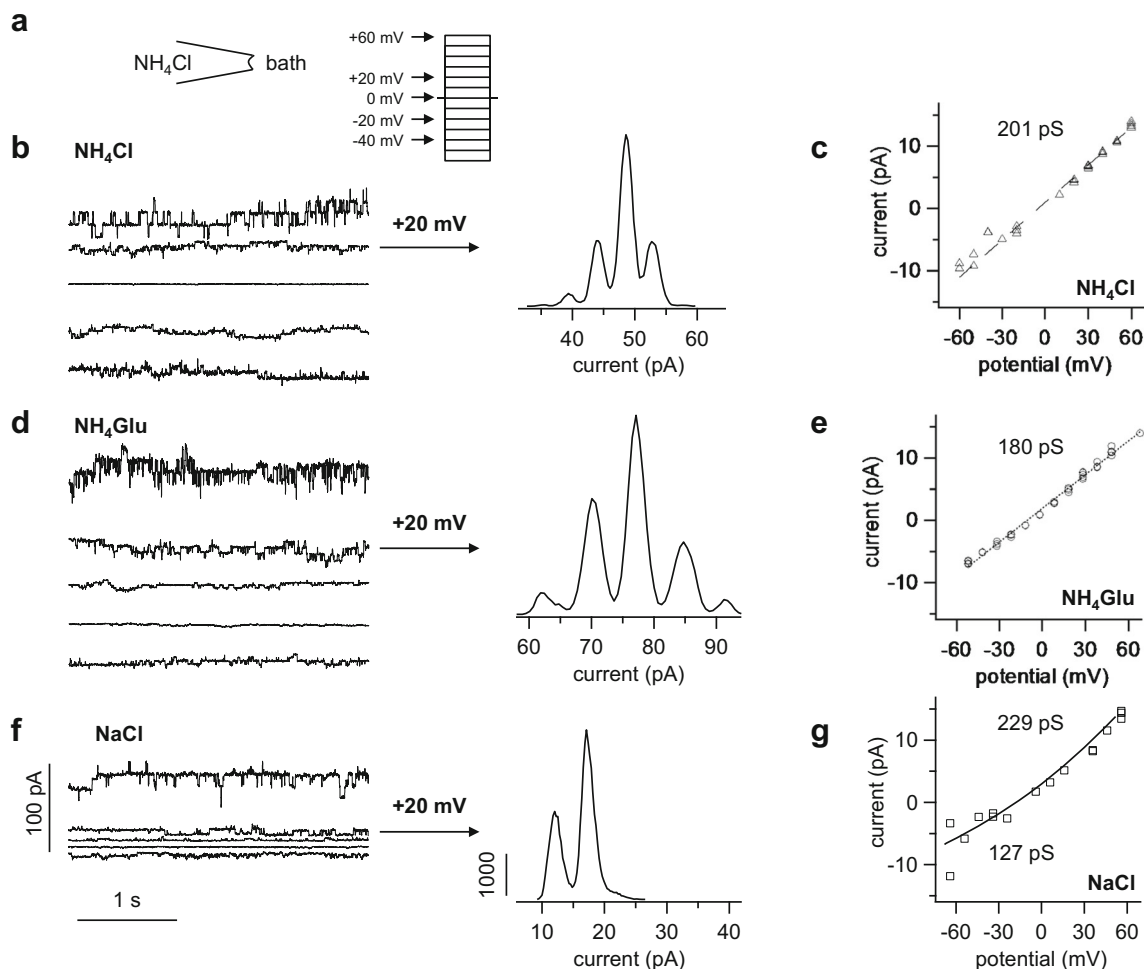
Subsequent inside-out patch-clamp experiments on membrane patches of oocytes confirmed this hypothesis, with both groups showing a conductance to  $\text{NH}_4^+$  on the single-channel level. In total, patches from 27 bTRPV3 and 21 control oocytes from the same three frogs used in microelectrode experiments were investigated in the inside-out configuration, alternating between the two groups. To allow an assessment of the  $\text{NH}_4^+$  conductance under symmetrical conditions, the experiments were carried out with  $\text{NH}_4^+$  in the pipette.

Throughout and in both groups, there was a tendency for single-channel events to occur in one solution and vanish in another solution without apparent reason. Typically, activity of channels increased with the duration of the measurement. Patches were frequently silent in the first solution (NaCl), and showed activity after application of the second solution ( $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). Those patches that survived a return to NaCl remained active, arguing against a selective conductance to  $\text{NH}_4^+$ .

Of the 27 patches from bTRPV3 expressing oocytes, all but four showed channel activity in at least one trace (Fig. 7). The conductance could be determined using linear fits for symmetrical (Fig. 7c and e) or the GHK equation for asymmetrical configurations (Fig. 7g, see methods). Ion replacement showed that the conductance depended on the cation, but not on the anion in the bath. Over all patches, single-channel conductance to  $\text{NH}_4^+$  in symmetrical solution was  $92 \pm 15$  pS, ( $n = 18$ ).

In control oocytes, only 14 out of 21 patches showed channel activity in at least one solution (Fig. 8). In asymmetrical solution with NaCl in the bath, the conductance of these small channels was about half of those found in bTRPV3 oocytes ( $48 \pm 9$  pS,  $n = 11$ ,  $p = 0.04$ ). An almost identical  $\text{NH}_4^+$  conductance was determined from linear fits after switching to symmetrical  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution ( $43 \pm 9$  pS,  $n = 13$ ,  $p = 0.7$ ). In four patches, it was possible to switch to KCl and NMDGCl solutions, yielding similar values for  $\text{NH}_4^+$  ( $p = 0.7$ ). The conductances to the other ions  $\text{Na}^+$  ( $33 \pm 10$  pS,  $n = 11$ ,  $p = 0.11$ ),  $\text{K}^+$  ( $23.8 \pm 1.3$  pS,  $n = 2$ ,  $p = 0.4$ ), and  $\text{NMDG}^+$  ( $9.2 \pm 2.1$  pS,  $n = 3$ ,  $p = 0.10$ ) were numerically smaller than the  $\text{NH}_4^+$  conductance.

Compared with the control oocytes, the channel population in patches from bTRPV3 oocytes was visibly much more diverse. While 14 patches showed large conductances similar to those in Fig. 7, nine other patches showed smaller channels comparable with those seen in the control oocytes. In eight patches, both small and large channels could be observed in



**Fig. 7** Single-channel measurements from a bTRPV3 expressing oocyte (inside-out). **a** Measurements were performed with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in the pipette. The cytosolic side of the patch was consecutively exposed to different bath solutions as indicated and exposed to potentials between  $-60$  and  $+60$  mV in steps of  $10$  mV. For clarity, only the current responses to the potentials indicated by the arrows are shown. **b** Original recording in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bath solution (same scaling as in **f**). The amplitude histogram at  $+20$  mV can be seen in the middle showing three distinct channels. **c** IV-plot corresponding to **b**, yielding a linear relationship with the slope of the fit as indicated in the figure. **d** Channel openings were not affected by the

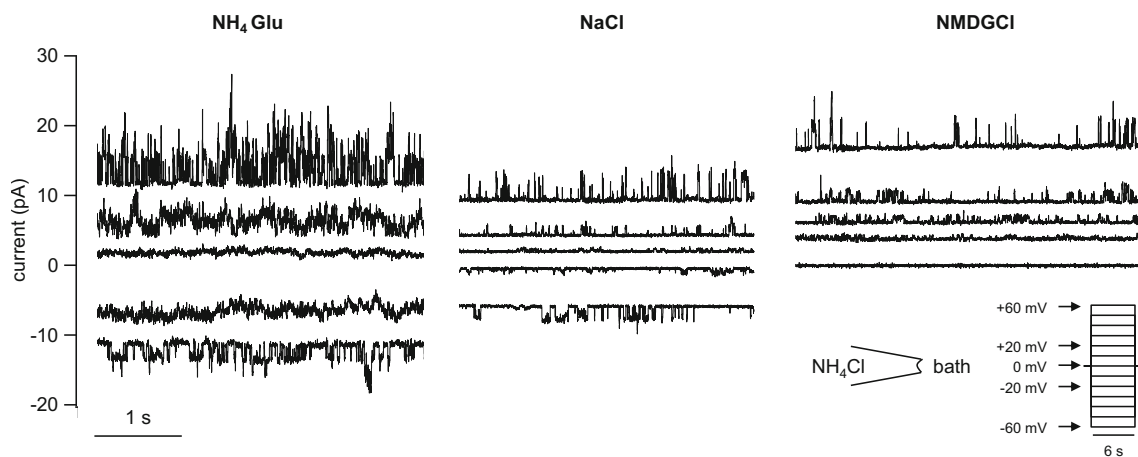
replacement of chloride by the much larger anion gluconate, proving cation selectivity (same scaling as in **a** and **f**). The histogram in the middle shows four distinct channels. **e** IV-plot from **d**, with the GHK fit yielding a similar conductance as in **c**. **f** In  $\text{NaCl}$  solution, channel openings at positive potentials are comparable with **b** and **d**, whereas channel openings at negative potentials were smaller. **g** IV-plot from **f**, fitted with the GHK equation by variation of the permeability to the two ions  $\text{Na}^+$  and  $\text{NH}_4^+$ . The conductance was then calculated from the GHK fit to the data and from the concentrations (see Supplement, equation 2). The negative reversal potential of the fit reflects a higher conductance to  $\text{NH}_4^+$

the same experiment and three of them simultaneously showed large and small channel activity in the same trace. The conductance of bTRPV3 for  $\text{K}^+$  could be investigated in two of such patches (Fig. 9). The large channels in these patches had a conductance of  $216 \pm 2$  pS for  $\text{NH}_4^+$  and  $116 \pm 13$  pS for  $\text{K}^+$  and most likely reflected bTRPV3 channels. The smaller conductances of  $52 \pm 11$  pS for  $\text{NH}_4^+$  and of  $43 \pm 14$  pS for  $\text{K}^+$  ( $n = 5$ ) appeared to reflect endogenous channels.

Despite some overlap, the two populations of channels become apparent in the amplitude histogram of  $\text{NH}_4^+$  conductances (Fig. 10c). The vertical height of the bars represents the number of patches falling into a certain conductance range, which is given on the horizontal axis. While control oocytes had one peak at conductances around  $50$  pS, oocytes

expressing bTRPV3 showed a second peak over  $150$  pS. In the corresponding histogram for  $\text{Na}^+$  conductances, a similar distribution was observed with one peak at  $\sim 20$  pS for both groups and a second peak at  $\sim 80$  pS in bTRPV3 oocytes only (Fig. 10d). In the further analysis, we assumed that channel activity smaller than  $100$  pS for  $\text{NH}_4^+$  reflects expression of endogenous non-selective channels, which were excluded from subsequent statistical evaluation. Under these circumstances, the mean  $\text{NH}_4^+$  conductances from these traces were  $144 \pm 12$  pS ( $n = 9$ ) for symmetrical  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution,  $185 \pm 14$  pS ( $n = 6$ ,  $p = 0.7$  vs.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) for the  $\text{NH}_4\text{Glu}$  bath solution, and  $182 \pm 12$  pS ( $n = 10$ ,  $p = 0.04$  vs.  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) for the  $\text{NaCl}$  bath solution. The latter also yielded a conductance to  $\text{Na}^+$  ( $98 \pm 10$  pS), significantly lower than that for  $\text{NH}_4^+$  ( $p \leq 0.001$ ).



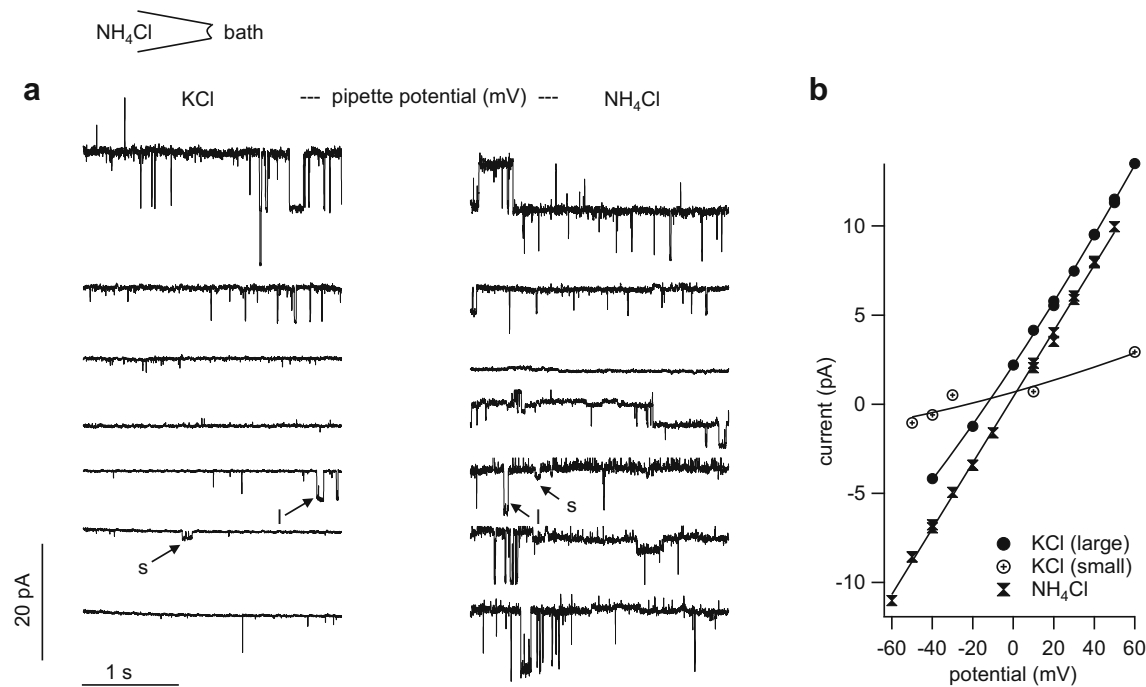


**Fig. 8** Original recordings from an inside-out patch from a control oocyte (same scaling). Measurements were performed with  $\text{NH}_4\text{Cl}$  in the pipette. Only the current responses to the potentials indicated by the arrows are shown in the traces. Measurement in  $\text{NH}_4\text{Glu}$  solution showed small channel openings at positive and negative potentials, with the fit yielding a conductance of 41 pS for  $\text{NH}_4^+$  in this patch. After switching

to  $\text{NaCl}$  solution, channel openings at negative potentials were visibly smaller, reflecting influx of  $\text{Na}^+$  (here: conductance of 59 pS for  $\text{NH}_4^+$  and 31 pS for  $\text{Na}^+$ ). After replacement of  $\text{Na}^+$  with the much larger cation  $\text{NMDG}^+$ , channel openings were only visible at positive potentials. The GHK fit yielded a conductance for  $\text{NH}_4^+$  of 53 pS and 11 pS for  $\text{NMDG}^+$

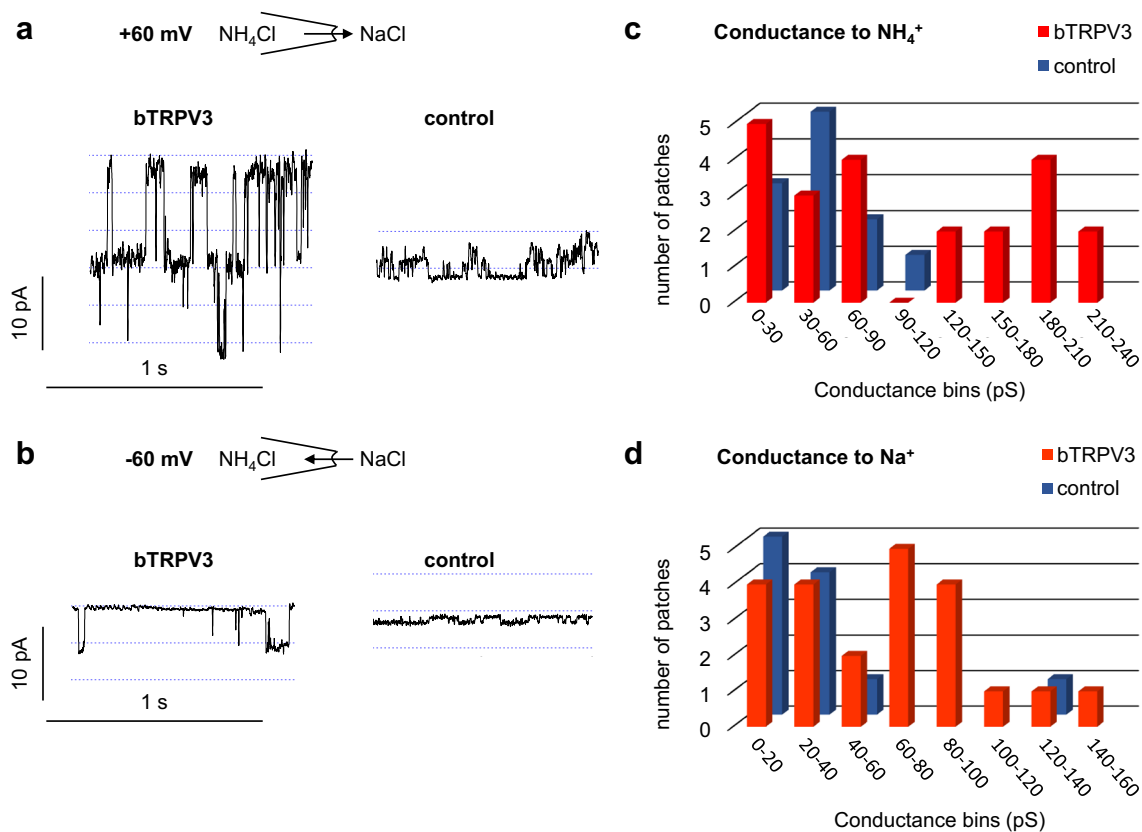
The current study was performed in modifications of oocyte Ringer solution and accordingly, the conductances differed from those obtained in mammalian Ringer solution. However, after adjusting for the different concentrations of

$\text{NH}_4^+$  (Supplement, equation 3), the conductance of the large channels in the bTRPV3 group could be statistical compared with the data which we obtained in a previous study of bTRPV3 expressed in HEK-293 cells [48]. For symmetrical



**Fig. 9** Inside-out measurement of a patch from a bTRPV3 oocyte expressing two different types of channels. The pipette was filled with  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . **a** Original recordings, showing consecutive exposure to  $\text{KCl}$  (traces to the left) and  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (traces to the right, same scaling). Small (s) and large (l) populations of channels were observed, most likely representing endogenous and bTRPV3 channels respectively. **b** IV-plot of unitary currents from amplitude histograms of the patch in **a**. Data from the symmetrical  $\text{NH}_4\text{Cl}$  configuration were fitted linearly and yielded a conductance of 185 pS, with a reversal potential  $\sim 0$  mV. In the

asymmetrical  $\text{KCl}$  configuration, data from large and small channels were fitted separately to the GHK equation by variation of the permeability to the two ions  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{K}^+$ . The conductance was calculated from the permeability and the concentrations (see Supplement, equation 2). The fit of the large channel openings yielded a conductance to  $\text{NH}_4^+$  of 215 pS and to  $\text{K}^+$  of 129 pS. The smaller openings could be fitted with a conductance of 45 pS for  $\text{NH}_4^+$  and 18 pS for  $\text{K}^+$ . Both reversal potentials were shifted to  $\sim -15$  mV, confirming the higher conductance to  $\text{NH}_4^+$



**Fig. 10** Original inside-out recordings and histograms from control and bTRPV3 oocytes in asymmetrical solution with NH<sub>4</sub>Cl in the pipette and NaCl in the bath. **a** Original recordings from one overexpressing bTRPV3 oocyte and one control oocyte at a pipette potential of +60 mV, reflecting efflux of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> (same scaling). **b** Corresponding traces at -60 mV, reflecting Na<sup>+</sup> influx. Data from all voltages were fitted as in Figs. 7 and 8 to yield a conductance to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and Na<sup>+</sup> for each patch. **c** Histogram giving an overview of all conductance values for NH<sub>4</sub><sup>+</sup> determined from patches showing channel activity in asymmetrical solution. The total conductance range was divided into a number of equidistant

bins, which are given on the X-axis. The Y-axis gives the number of patches with a conductance falling into the corresponding bin on the X-axis. The histogram shows one cluster of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> conductances for control oocytes (blue) around 50 pS, while for bTRPV3 oocytes (red), a second cluster of conductances can be seen around 150 pS. Three bTRPV3 patches expressed both small and large channels. **d** Corresponding histogram of all measurements of the conductance to Na<sup>+</sup>. One peak emerges at ~20 pS for both groups of oocytes and a second peak at ~80 pS in bTRPV3 oocytes only

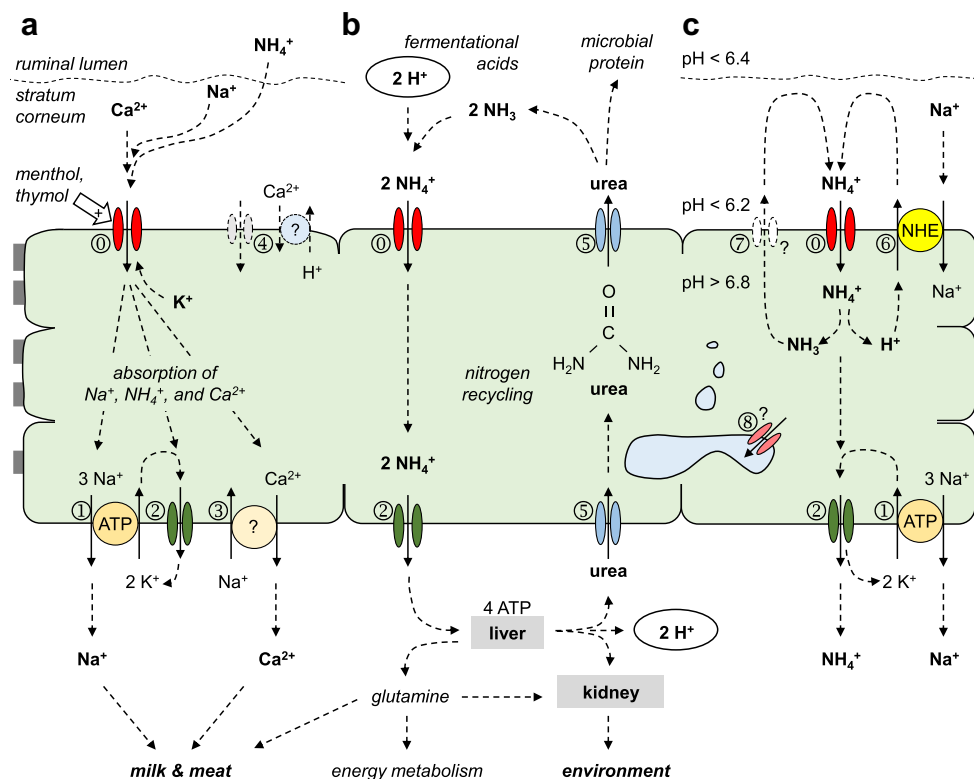
NH<sub>4</sub>Cl solution, no significant differences were found ( $p = 0.8$ ). In asymmetrical solution, there was a slight trend for a lower NH<sub>4</sub><sup>+</sup> conductance in oocytes ( $p = 0.08$ ). The Na<sup>+</sup> conductance did not differ ( $p = 0.9$ ).

## Discussion

The current study provides clear evidence for expression of the bovine homologue of TRPV3 by the epithelial layers of the bovine rumen. We confirmed the permeability of this channel to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and K<sup>+</sup> in Ringer solutions with physiological concentrations of Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>. In conjunction with previous studies of our group [8, 40, 45, 48], we conclude that bTRPV3 is involved in the ruminal uptake of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, and Ca<sup>2+</sup> and contributes to the apical conductance of K<sup>+</sup> [29] (Fig. 11).

In a first step, the bovine *TRPV3* was sequenced. After epitope screening, a commercial murine antibody was selected

with binding affinity to a conserved epitope in the first extracellular loop of TRPV3. In immunoblots of protein from overexpressing HEK-293 and *Xenopus* oocytes, the antibody stained a band at the predicted height of ~90 kDa (Fig. 1). In non-expressing controls from both groups, no band was observed proving that staining was caused by binding of the antibody to bTRPV3. Corresponding immunohistochemistry confirmed expression of the channel protein primarily in the cellular membrane (Figs. 2 and 3). Immunoblots of ruminal protein show a band of equivalent molecular weight (~90 kDa), clearly arguing for expression of bTRPV3 by the rumen. However, a second, stronger band was visible at ~60 kDa (Fig. 1b). In a previous study, a ~60 kDa band could also be observed in human epidermal keratinocytes stained with a goat-polyclonal antibody directed against the epitope AA 461-487 of TRPV3 [53]. In that study, knockdown of TRPV3 showed that the ~60 kDa band was a splice variant. Blasting the epitope sequence with alignment in NCBI yields only three splice variants of bTRPV3, two at ~90 kDa, and



**Fig. 11** Model showing the function of bTRPV3 in the rumen. The ruminal epithelium is a multilayered, *squamous* epithelium of cells that are interconnected by gap junctions, thus forming a functional syncytium. **a** bTRPV3 (⊙) is a non-selective cation channel that can serve as a pathway for the uptake of nutrients such as Na<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>, and contributes to the apical conductance for K<sup>+</sup>. Uptake of cations is stimulated by certain monoterpenoids such as menthol and thymol. Basolateral extrusion involves the sodium-potassium pump (ATP1A1, ⊙), basolateral K<sup>+</sup> channels (⊙), and sodium-calcium exchangers (⊙). In the model, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> is taken up by the same pathway as K<sup>+</sup> (⊙, ⊙). Other TRP channels and exchangers may be involved (⊙). **b** Within the ruminal lumen, large quantities of fermentational acids are produced, releasing protons that can partially be removed via efflux of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> via bTRPV3 (⊙) and basolateral K<sup>+</sup> channels (⊙). In the liver, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> is converted to non-toxic metabolites, mostly urea, but also some glutamine. Only glutamine

can be utilized by mammalian enzymes for protein synthesis. Conversely, urea must be excreted. This can occur renally, resulting in nitrogen losses and environmental damage. Alternately, urea can be secreted into the rumen via urea transporters such as UT-B or aquaporin 3 (⊙). After degradation by the microbiota within, NH<sub>3</sub> is released and can be utilized by microbial enzymes for protein synthesis. NH<sub>3</sub> also functions as a buffer, binding protons to form NH<sub>4</sub><sup>+</sup> that is again removed via bTRPV3 (⊙). This “nitrogen recycling” can reach 20 mol day<sup>-1</sup> in cattle. **c** At physiological pH gradients across the apical membrane, NH<sub>4</sub><sup>+</sup> stimulates sodium transport via NHE (SLC9A3, ⊙) with apical recirculation of NH<sub>3</sub> via an unknown pathway (⊙). Electrogenic transport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> across the basolateral membrane continues (⊙). Specific staining for bTRPV3 can also be found within the cytosol, possibly reflecting expression of bTRPV3 or its splice variant in intracellular membranes such as those of the ER (⊙)

only one with a predicted length of 60.25 kDa (NP\_001092494.1). This splice variant contains the epitope for binding of the antibody and thus appears as the most likely explanation for the additional ~ 60 kDa band in Fig. 1b.

In particular in immunohistochemical staining, antibodies may occasionally bind by their constant domains rather than via the high affinity binding domains for the target epitope [9]. For this reason, immunochemical stainings and immunoblots were repeated in presence of the peptide used to produce the TRPV3 antibody. If the antibody is functional, this peptide should interfere with specific binding via the high affinity binding domains. Non-specific binding via other domains should continue unimpaired. In our case, a quenching of staining was observed (Fig. 4 f and Supplement). However, it should be emphasized that ultimately, this observation does

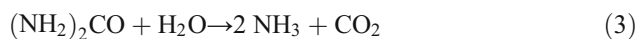
not rule out that binding might have occurred to another protein via a structure similar to the target epitope [9].

*TRPV3* emerged as a candidate gene when searching for the apical divalent-sensitive, non-selective cation channel of the rumen [30, 45, 49, 59]. Traditionally, TRP channels have been primarily regarded as channels involved in neuronal signaling rather than in epithelial transport. However, both spontaneous and induced mutations of TRPV3 primarily interfere with the function of keratinocytes, inducing skin lesions rather than neurological symptoms [36]. In line with this, ruminal tissue showed a strong immunohistochemical staining of bTRPV3 within the epithelium while subepithelial staining was weak (Fig. 4). Staining was observed not only in the cellular membranes of the ruminal epithelium, but also in the cytosol. This is in line with findings in human

keratinocytes or intact epidermis, where similar staining patterns were found [53].

Research in recent years has established that almost all TRP channels studied so far are expressed not only by the plasma membrane as previously thought, but also by intracellular vesicular membranes [19]. Thus, a recent study of the skin suggests expression of TRPV3 by the endoplasmic reticulum (ER) [64] and an involvement of TRPV3 in lysosomal function. It should also be noted that in the course of cell differentiation in stratified squamous epithelia, granules dissociate from the ER via blebbing and grow in size until they become visible as the keratohyalin granules that give the *stratum granulosum* its name [21]. Here, the proteins needed for keratinization are produced, requiring high quantities of glutamine. Accordingly, glutamine synthetase is highly expressed by the skin [16] and the rumen [47]. Within the ER, this enzyme catalyzes formation of glutamine from  $\text{NH}_4^+$ , possibly requiring additional uptake routes from the cytosolic space. TRPV3 would certainly fulfill this role (Fig. 11c).

However this may be, there is convincing evidence to suggest that bTRPV3 mediates transport of  $\text{NH}_4^+$  across the ruminal epithelium. In Ussing chamber experiments, TRPV3 channel agonists stimulate currents carried by  $\text{Na}^+$  and  $\text{NH}_4^+$  and enhance  $\text{Ca}^{2+}$  flux [40, 45] (Fig. 11a). Furthermore, at physiological ruminal pH, exposure to  $\text{NH}_4^+$  acidifies the cytosolic space of native ruminal epithelia from sheep and cattle as measured by pH-sensitive microelectrodes [32, 45]. Flux measurements confirm concomitant stimulation of NHE [3] (Fig. 11c). This has profound implications for the role of this channel in maintaining the pH of the ruminal fluid (Fig. 11b). As mentioned, large quantities of urea are secreted by the rumen and degraded according to:



At physiological ruminal pH of 6.4, over 99.9% of  $\text{NH}_3$  is immediately converted to  $\text{NH}_4^+$ . Absorption of  $\text{NH}_4^+$  via TRPV3 results in a permanent removal of these protons from the rumen. In cattle on high-energy diets with production of large quantities of fermentational acids, influx of urea and efflux of  $\text{NH}_4^+$  via bTRPV3 might represent an essential mechanism for ruminal pH homeostasis [5], explaining the high levels of nitrogen recycling observed in these animals, and the large quantities of ammonia that they excrete into the environment (Fig. 11b).

The current study confirms that bTRPV3 can serve as a pathway for protons bound in the form of  $\text{NH}_4^+$ . Microelectrode studies show a strong acidification of the cytosol of *Xenopus* oocytes expressing bTRPV3 (Fig. 5). Although  $\text{NH}_4\text{Cl}$  generally leads to an increase of the  $\text{pH}_i$  via influx of  $\text{NH}_3$ , an acidification has been observed in a number of systems such as astrocytes [34] or the ruminal epithelium [32, 45] and is generally attributed to influx of  $\text{NH}_4^+$  with subsequent

dissociation to  $\text{H}^+$  and  $\text{NH}_3$  [11] (Fig. 11c). Depending on the pH gradients present across the cellular membrane,  $\text{NH}_3$  can diffuse back into the extracellular space [34], or accumulate in subcellular organelles where it can be detoxified [11]. In our study, we were tempted to calculate the relative permeability ratio of  $\text{NH}_4^+$  vs.  $\text{NH}_3$  from the equilibrium  $\text{pH}_i$  reached in steady state. In principle, this should be possible but would require knowledge of the distribution of ammonia inside and outside of the cell (Eq. 15 in [44] and Fig. 8 in [34]). Furthermore, the system is not in equilibrium but must have ill-defined mechanisms for pH regulation and detoxification of ammonia, further complicating matters.

It should be stressed that control oocytes were also strongly acidified by application of  $\text{NH}_4^+$ , albeit somewhat less rapidly than in oocytes expressing bTRPV3 (Fig. 6). Given that *Xenopus* oocytes have been widely used as expression systems for ammonia-transporting proteins such as Rh-like proteins [12, 24], we did not anticipate the magnitude of the response. It has been noted previously that the lack of a robust expression system for functional analysis of ammonia transport has generally hampered research in the area [35]. Burckhardt and Frömter [11] were among the first to report transport of  $\text{NH}_4^+$  by native *Xenopus* oocytes. In a careful study using pH-sensitive microelectrodes, the authors showed that endogenously expressed non-selective cation channels were involved. Our single-channel patch-clamp measurements confirm the findings of these authors [11] and clearly demonstrate that native *Xenopus* oocytes robustly express channels that are permeable not only to  $\text{K}^+$  and  $\text{Na}^+$ , but also to  $\text{NH}_4^+$ . However, it should also be stressed that these endogenous channels were distinct from the larger channels that were only observed in bTRPV3 overexpressing cells. The conductance values from both groups of channels showed considerable scatter. This certainly reflects both stochastic effects and imprecisions involved with the evaluation and fitting of single-channel data. However, this finding may also reflect the formation of heteromeric channels consisting of bTRPV3 subunits and subunits of smaller endogenous *Xenopus* channels, leading to intermediate conductance levels as previously reported for TRPV1 [14, 15].

In summary, we provide clear evidence for the expression of bTRPV3 by the ruminal epithelium. In conjunction with previous functional studies of the ruminal epithelium [3, 40, 45], a role of this channel in mediating the ruminal transfer of  $\text{NH}_4^+$  can be assumed. The finding that complex proteins are required to mediate ruminal transport not only of urea [50, 65] but also of ammonium across the ruminal wall should end the concept of ruminal nitrogen recycling as the result of a “leaky” epithelium. Instead, nitrogen recycling appears an efficient mechanism to remove protons from the rumen with the energy coming from the liver (Fig. 11b). Given the robust evidence supporting transport of  $\text{Ca}^{2+}$  by TRPV3 [37, 45, 48, 63], bTRPV3 also clearly emerges as a candidate mediating electrogenic  $\text{Ca}^{2+}$  transport by the ruminal epithelium [27, 61, 62].

Certainly, bTRPV3 is not the only  $\text{NH}_4^+$  transporting channel and there is good reason to believe that in the rumen, in *Xenopus* oocytes, and in other parts of the gut, multiple types of non-selective cation channels should be considered when searching for pathways for the uptake of ammonium [58].

**Acknowledgments** Open Access funding provided by Projekt DEAL. We wish to express our gratitude to Prof. Dr. Dorothee Günzel and Dr. Jörg Piontek, Institute of Clinical Physiology, University Medicine, Charité, Berlin for the support in histological imaging. We would also like to thank Gisela Manz, Katharina Söllig, Susanne Trappe, Barbara Drewes, and Edith Gröninger for their expertise and technical help. We would like to cordially thank Prof. Salah Amasheh and Dr. Constanze Vitzthum for providing *Xenopus* oocytes and sharing expertise in handling them. We are also grateful to Prof. Dr. Aschenbach for his continuous support.

**Author contributions** Friederike Stumpff, Franziska Liebe, Hendrik Liebe, and Gerhard Sponder all contributed to the study conception and design, material preparation, data collection, and analysis. The first draft of the manuscript was written by Friederike Stumpff, Franziska Liebe, and Hendrik Liebe. All authors were involved in editing the manuscript and approved the final version.

**Funding information** The study received funding from Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG STU 258/7-1) and Sonnenfeld Stiftung.

## Compliance with ethical standards

**Conflict of interest** The authors declare that they have no conflicts of interest. Friederike Stumpff is the holder of a patent that was transferred to a startup company.

**Ethics approval** The maintenance and surgical treatment of *Xenopus laevis* frogs was in accordance with the guidelines of German legislation, with approval by the animal welfare officer for the Freie Universität Berlin and under the governance of the Berlin Veterinary Health Inspectorate (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, permit G0025/16). Bovine ruminal epithelium was obtained from Holstein-Friesian cattle slaughtered for meat production in a commercial abattoir (Beelitz, Germany), also under control of the German authorities.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

1. Abdoun K, Stumpff F, Martens H (2006) Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim Health Res Rev* 7:43–59. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001156>
2. Abdoun K, Stumpff F, Rabbani I, Martens H (2010) Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and  $\text{CO}_2$ . *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298:G190–G202. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00216.2009>
3. Abdoun K, Stumpff F, Wolf K, Martens H (2005) Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G508–G520. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00436.2004>
4. Abdoun K, Wolf K, Arndt G, Martens H (2003) Effect of ammonia on  $\text{Na}^+$  transport across isolated rumen epithelium of sheep is diet dependent. *Br J Nutr* 90:751–758. <https://doi.org/10.1079/BJN2003957>
5. Aschenbach JR, Penner GB, Stumpff F, Gabel G (2011) Ruminant Nutrition Symposium: role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH. *J Anim Sci* 89:1092–1107. <https://doi.org/10.2527/jas.2010-3301>
6. Barry PH, Lynch JW (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol* 121:101–117. <https://doi.org/10.1007/BF01870526>
7. Bödeker D, Kemkowski J (1996) Participation of  $\text{NH}_4^+$  in total ammonia absorption across the rumen epithelium of sheep (*Ovis aries*). *Comp Biochem Physiol A Physiol* 114:305–310. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(96\)00012-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(96)00012-6)
8. Braun HS, Schrapers KT, Mahlkow-Nerge K, Stumpff F, Rosendahl J (2018) Dietary supplementation of essential oils in dairy cows: evidence for stimulatory effects on nutrient absorption. *Animal*: an international journal of animal bioscience:1–6. <https://doi.org/10.1017/S1751731118001696>
9. Brownjohn PW, Ashton JC (2014) What can be concluded from blocking peptide controls? *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 22:634. <https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e3182a77fe5>
10. Bucking C, Edwards SL, Tickle P, Smith CP, McDonald MD, Walsh PJ (2013) Immunohistochemical localization of urea and ammonia transporters in two confamilial fish species, the ureotelic gulf toadfish (*Opsanus beta*) and the ammoniotelic plainfin midshipman (*Porichthys notatus*). *Cell Tissue Res* 352:623–637. <https://doi.org/10.1007/s00441-013-1591-0>
11. Burckhardt BC, Frömter E (1992) Pathways of  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane. *Pflugers Arch* 420:83–86. <https://doi.org/10.1007/bf00378645>
12. Caner T, Abdounour-Nakhoul S, Brown K, Islam MT, Hamm LL, Nakhoul NL (2015) Mechanisms of ammonia and ammonium transport by rhesus-associated glycoproteins. *Am J Phys Cell Phys* 309:C747–C758. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00085.2015>
13. Cermak R, Lawnitzak C, Scharrer E (2000) Influence of ammonia on sodium absorption in rat proximal colon. *Pflugers Arch* 440:619–626. <https://doi.org/10.1007/s004240000309>
14. Cheng W, Yang F, Liu S, Colton CK, Wang C, Cui Y, Cao X, Zhu MX, Sun C, Wang K, Zheng J (2012) Heteromeric heat-sensitive transient receptor potential channels exhibit distinct temperature and chemical response. *J Biol Chem* 287:7279–7288. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.305045>
15. Cheng W, Yang F, Takanishi CL, Zheng J (2007) Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *J Gen Physiol* 129:191–207. <https://doi.org/10.1085/jgp.200709731>
16. Danielyan L, Zellmer S, Sickinger S, Tolstonog GV, Salvetter J, Lourhmati A, Reissig DD, Gleiter CH, Gebhardt R, Buniatian GH (2009) Keratinocytes as depository of ammonium-inducible glutamine synthetase: age- and anatomy-dependent distribution in human and rat skin. *PLoS One* 4:e4416. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0004416>
17. Denning GM, Ostedgaard LS, Cheng SH, Smith AE, Welsh MJ (1992) Localization of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in chloride secretory epithelia. *J Clin Invest* 89:339–349. <https://doi.org/10.1172/JCI115582>

18. Doerner JF, Hatt H, Ramsey IS (2011) Voltage- and temperature-dependent activation of TRPV3 channels is potentiated by receptor-mediated PI(4,5)P<sub>2</sub> hydrolysis. *J Gen Physiol* 137:271–288. <https://doi.org/10.1085/jgp.200910388>
19. Dong XP, Wang X, Xu H (2010) TRP channels of intracellular membranes. *J Neurochem* 113:313–328. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2010.06626.x>
20. Foskolos A, Moorby JM (2018) Evaluating lifetime nitrogen use efficiency of dairy cattle: a modelling approach. *PLoS One* 13:e0201638. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201638>
21. Freeman SC, Sonthalia S (2020) Histology, keratohyalin granules. In: StatPearls. StatPearls Publishing, Treasure Island (FL),
22. Gärtner K, Decker P, Hill H (1961) Untersuchungen über die Passage von Harnstoff und Ammoniak durch die Pansenwand von Ziegen. *Pflugers Arch* 274:281–288. <https://doi.org/10.1007/BF00362319>
23. Georgi MI, Rosendahl J, Ernst F, Gunzel D, Aschenbach JR, Martens H, Stumpff F (2014) Epithelia of the ovine and bovine forestomach express basolateral maxi-anion channels permeable to the anions of short-chain fatty acids. *Pflugers Arch* 466:1689–1712. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1386-x>
24. Geyer RR, Parker MD, Toye AM, Boron WF, Musa-Aziz R (2013) Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> permeabilities of human RhAG, RhBG and RhCG. *J Membr Biol* 246:915–926. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9593-0>
25. Handlogten ME, Hong SP, Zhang L, Vander AW, Steinbaum ML, Campbell-Thompson M, Weiner ID (2005) Expression of the ammonia transporter proteins Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein in the intestinal tract. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G1036–G1047. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00418.2004>
26. Hartinger T, Gresner N, Sudekum KH (2018) Does intra-ruminal nitrogen recycling waste valuable resources? A review of major players and their manipulation. *J Anim Sci Biotechnol* 9:33. <https://doi.org/10.1186/s40104-018-0249-x>
27. Holler H, Breves G, Kocabatmaz M, Gerdes H (1988) Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro. *Q J Exp Physiol* 73:609–618. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1988.sp003180>
28. Hristov AN, Bannink A, Crompton LA, Huhtanen P, Kreuzer M, McGee M, Noziere P, Reynolds CK, Bayat AR, Yanez-Ruiz DR, Dijkstra J, Kebreab E, Schwam A, Shingfield KJ, Yu Z (2019) Invited review: nitrogen in ruminant nutrition: a review of measurement techniques. *J Dairy Sci* 102:5811–5852. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15829>
29. Leonhard-Marek S, Martens H (1996) Effects of potassium on magnesium transport across rumen epithelium. *Am J Phys* 271:G1034–G1038
30. Leonhard-Marek S, Stumpff F, Brinkmann I, Breves G, Martens H (2005) Basolateral Mg<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg<sup>2+</sup>. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 288:G630–G645. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00275.2004>
31. Levitt MD, Levitt DG (2019) Use Of quantitative modelling to elucidate the roles of the liver, gut, kidney, and muscle in ammonia homeostasis and how lactulose and rifaximin alter this homeostasis. *Int J Gen Med* 12:367–380. <https://doi.org/10.2147/IJGM.S218405>
32. Lu Z, Stumpff F, Deiner C, Rosendahl J, Braun H, Abdoun K, Aschenbach JR, Martens H (2014) Modulation of sheep ruminal urea transport by ammonia and pH. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 307:R558–R570. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00107.2014>
33. McDonald IW (1948) The absorption of ammonia from the rumen of the sheep. *Biochem J* 42:584–587
34. Nagaraja TN, Brookes N (1998) Intracellular acidification induced by passive and active transport of ammonium ions in astrocytes. *Am J Phys* 274:C883–C891. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1998.274.4.C883>
35. Neuhauser B, Dynowski M, Ludewig U (2014) Switching substrate specificity of AMT/MEP/ Rh proteins. *Channels (Austin)* 8:496–502. <https://doi.org/10.4161/19336950.2014.967618>
36. Nilius B, Biro T (2013) TRPV3: a ‘more than skinny’ channel. *Exp Dermatol* 22:447–452. <https://doi.org/10.1111/exd.12163>
37. Nilius B, Biro T, Owsianik G (2014) TRPV3: time to decipher a poorly understood family member! *J Physiol* 592:295–304. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.255968>
38. Ochoa-de la Paz LD, Espino-Saldana AE, Arellano-Ostoa R, Reyes JP, Miledi R, Martinez-Torres A (2013) Characterization of an outward rectifying chloride current of *Xenopus tropicalis* oocytes. *Biochim Biophys Acta* 1828:1743–1753. <https://doi.org/10.1016/j.bbame.2013.03.013>
39. Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:685–717. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406>
40. Rabbani I, Braun HS, Akhtar T, Liebe F, Rosendahl J, Grunau M, Tietjen U, Masood S, Kaesmeyer S, Gunzel D, Rehman H, Stumpff F (2018) A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from *Bos indicus* crossbreds versus *Bos taurus*. *Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaiho*. <https://doi.org/10.1111/asj.13107>
41. Ramsey IS, Delling M, Clapham DE (2006) An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:619–647. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.100431>
42. Reifarth FW, Amasheh S, Claus W, Weber W (1997) The Ca<sup>2+</sup>-inactivated Cl<sup>-</sup> channel at work: selectivity, blocker kinetics and transport visualization. *J Membr Biol* 155:95–104. <https://doi.org/10.1007/s002329900161>
43. Reynolds CK, Kristensen NB (2008) Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. *J Anim Sci* 86:E293–E305. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0475>
44. Roos A, Boron WF (1981) Intracellular pH. *Physiol Rev* 61:296–434. <https://doi.org/10.1152/physrev.1981.61.2.296>
45. Rosendahl J, Braun HS, Schrapers KT, Martens H, Stumpff F (2016) Evidence for the functional involvement of members of the TRP channel family in the uptake of Na<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by the ruminal epithelium. *Pflugers Arch* 468:1333–1352. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1835-4>
46. Rubino JG, Wilson JM, Wood CM (2019) An in vitro analysis of intestinal ammonia transport in fasted and fed freshwater rainbow trout: roles of NKCC, K<sup>+</sup> channels, and Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup> ATPase. *J Comp Physiol B* 189:549–566. <https://doi.org/10.1007/s00360-019-01231-x>
47. Salem HA, Devlin TJ, Marquardt RR (1973) Effects of urea on the activity of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, carbamyl phosphate synthetase, and carbamyl phosphokinase in ruminant tissues. *Can J Anim Sci* 53:503–511
48. Schrapers KT, Sponder G, Liebe F, Liebe H, Stumpff F (2018) The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *PLoS One* 13:e0193519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193519>
49. Schultheiss G, Martens H (1999) Ca-sensitive Na transport in sheep omasum. *Am J Phys* 276:G1331–G1344
50. Stewart GS, Graham C, Cattell S, Smith TP, Simmons NL, Smith CP (2005) UT-B is expressed in bovine rumen: potential role in ruminal urea transport. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289:R605–R612. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00127.2005>
51. Stumpff F, Georgi MI, Mundhenk L, Rabbani I, Fromm M, Martens H, Günzel D (2011) Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins. *J Exp Biol* 214:2871–2882. <https://doi.org/10.1242/jeb.055582>

52. Stumpff F, Lodemann U, Van Kessel AG, Pieper R, Klingspor S, Wolf K, Martens H, Zentek J, Aschenbach JR (2013) Effects of dietary fibre and protein on urea transport across the cecal mucosa of piglets. *J Comp Physiol B* 183:1053–1063. <https://doi.org/10.1007/s00360-013-0771-2>
53. Szollosi AG, Vasas N, Angyal A, Kistamas K, Nanasi PP, Mihaly J, Beke G, Herczeg-Lisztes E, Szegedi A, Kawada N, Yanagida T, Mori T, Kemeny L, Biro T (2018) Activation of TRPV3 regulates inflammatory actions of human epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* 138:365–374. <https://doi.org/10.1016/j.jid.2017.07.852>
54. Vitzthum C, Stein L, Brunner N, Knittel R, Fallier-Becker P, Amasheh S (2019) *Xenopus* oocytes as a heterologous expression system for analysis of tight junction proteins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 33:5312–5319. <https://doi.org/10.1096/fj.201801451RR>
55. Vriens J, Nilius B, Vennekens R (2008) Herbal compounds and toxins modulating TRP channels. *Curr Neuropharmacol* 6:79–96. <https://doi.org/10.2174/157015908783769644>
56. Wang Y, Li X, Yang J, Tian Z, Sun Q, Xue W, Dong H (2018) Mitigating greenhouse gas and ammonia emissions from beef cattle feedlot production: a system meta-analysis. *Environ Sci Technol* 52:11232–11242. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b02475>
57. Weiner ID, Verlander JW (2011) Role of NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in renal acid-base transport. *Am J Physiol Ren Physiol* 300:F11–F23. <https://doi.org/10.1152/ajprenal.00554.2010>
58. Weiner ID, Verlander JW (2019) Emerging features of ammonia metabolism and transport in acid-base balance. *Semin Nephrol* 39:394–405. <https://doi.org/10.1016/j.semnephrol.2019.04.008>
59. Wilkens M, Kunert-Keil C, Brinkmeier H, Schröder B (2008) Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. *Vet J* 182:294–300. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.06.020>
60. Wilkens MR, Mrochen N, Breves G, Schroder B (2011) Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced challenge of calcium homeostasis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 158:199–207. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.008>
61. Wilkens MR, Nelson CD, Hernandez LL, McArt JAA (2020) Symposium review: transition cow calcium homeostasis-health effects of hypocalcemia and strategies for prevention. *J Dairy Sci* 103:2909–2927. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17268>
62. Wilkens MR, Praechter C, Breves G, Schroder B (2016) Stimulating effects of a diet negative in dietary cation-anion difference on calcium absorption from the rumen in sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr* 100:156–166. <https://doi.org/10.1111/jpn.12296>
63. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y, DiStefano PS, Curtis R, Clapham DE (2002) TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature* 418:181–186. <https://doi.org/10.1038/nature00882>
64. Yadav M, Goswami C (2017) TRPV3 mutants causing Olmsted Syndrome induce impaired cell adhesion and nonfunctional lysosomes. *Channels (Austin)* 11:196–208. <https://doi.org/10.1080/19336950.2016.1249076>
65. Zhong C, Farrell A, Stewart GS (2020) Localization of aquaporin-3 proteins in the bovine rumen. *J Dairy Sci* 103:2814–2820. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17735>

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

### 3.1. Supplementary Material (Liebe et al. 2020)

**Supplementary Material**  
**The TRPV3 channel of the bovine rumen -**  
**localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia**  
**transport**

*Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*

Franziska Liebe<sup>1\*</sup>, Hendrik Liebe<sup>1,2\*</sup>, Sabine Kaessmeyer<sup>3</sup>, Gerhard Sponder<sup>1</sup>, Friederike Stumpff<sup>1</sup>

email: stumpff@zedat.fu-berlin.de

<sup>1</sup>Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>2</sup>Department of Biology, Chemistry, and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Germany

<sup>3</sup>Institute of Veterinary Anatomy, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

\*) both authors contributed equally to this study

#### **Immunohistochemical staining**

*Xenopus laevis* oocytes were fixed in paraformaldehyde (4 %, 3 h), washed with PBS (2 times), and dehydrated in increasing concentrations of ethanol (2 times in 70 % (1 h), 70 % (overnight), 3 times in 80 % (1 h), 80 % (72 h), 2 times in 96 % (10 min), 3 times in 99.9 % (10 min)). Xylene was used as intermedium (2 times for 10 min) and finally, oocytes were embedded in paraffin (2 times for 30 min).

Frozen bovine tissue was defrosted in methanol (-20 °C, 1 h). Afterwards, tissue was fixated in formaldehyde (4 % in PBS, 4 °C, 24 h) and dehydrated in increasing ethanol concentrations as follows: 70 % (4 times, each 1 h; last overnight), 80 % (3 times, each 1 h; last overnight), then 80 % (once, 24 h), 96 % (2 times, each 45 min), 99.9 % (3 times, 45 min), methyl benzoate (2 h). Fresh bovine tissues were fixed immediately in formaldehyde and dehydrated with a shorter protocol (70 %, 80 %, 96 %, 99.9 % for 50 min).

For all bovine samples, Xylene was used as intermedium (2x 30 min). The samples were then infiltrated overnight in the incubator at 59°C in paraffin I, afterwards for 2.5h each in paraffin II and III; and finally the samples were embedded in fresh paraffin and stored in the refrigerator. Slices of 5 µm were cut and mounted on glass slides (Superfrost® Plus Menzel-Gläser, Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe, Germany).

Deparaffinization of cuts of ruminal tissues or oocytes was performed in Roti®-Histol (Carl Roth, Karlsruhe, Germany) overnight. Rehydration was completed by incubating the slides in



descending ethanol concentration (99.9 %, 96 %, 90 %, 80 %, 70 %, demineralized water) for 5 minutes respectively.

The slides were washed in PBS (5 min) and boiled in EDTA buffer (1 mmol·L<sup>-1</sup>; oocytes: pH 8.0 adjusted with NaOH; rumen: pH 9.0 adjusted with Tris) for 15 min. Afterwards, the slides were rinsed thrice with PBS (for 1 min and 2 times for 5 min).

HEK-293 cells were seeded onto coverslips, transfected, washed in PBS (2 times), incubated in Roti®-Histofix (4 %, 30 min), and washed again twice in PBS.

Permeabilization of all fixed samples was achieved via incubation in Triton X-100 (0.5 %, 5 min; Merck KGaA, Darmstadt, Germany ). After two washing steps with PBS, followed by incubation in blocking solution (BS, goat serum (5 %; PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) in PBS) in a closed container with humidified atmosphere for 1 hour. Samples were then stained with primary antibody diluted in BS (4 °C, overnight) according to Table 1. Secondary antibody controls were performed with BS only.

To test for binding to the epitope, adjacent slices from the same sample of ruminal tissue were incubated in parallel either with the primary mouse TRPV3 antibody only or with a mix of this antibody and its corresponding blocking peptide (Table 1).

According to Table 1, samples and secondary antibody controls were incubated in diluted secondary antibodies (in BS supplemented with 4', 6-diamidine-2'-phenylindole dihydrochloride (1 µg/mL; DAPI, Roche, Mannheim, Germany), 37 °C, 1 h). Slices were washed with BS (2 times for 5 min), demineralized water, and ethanol, followed by embedding (Mount Flour, Biocyc GmbH & Co. KG, Potsdam, Germany) and covering.

### **Double-barrelled pH-sensitive microelectrode measurements**

pH-sensitive microelectrodes were prepared essentially as described previously [1] with a few alterations. For pH-measurements, SUTTER BF 150-86-10 glass tubing (Science Products GmbH, Hofheim, Germany) was used. The reference barrel was made of filamented bisected GC150F 15 glass tubing (Harvard Apparatus, Kent, UK). Two core cable ends (4×10, 611889, Conrad Bauelemente, Conrad Elektronik, Hirschau, Germany) were pushed into tightly fitting shrink tubing (Ø 3 mm) and used to adjoin the two barrels, leaving the middle section free (~ 3 cm). A small piece of shrink tubing (1 mm; Deray-H-set 1/8", DSG-Canusa, Meckenheim, Germany) was slipped over the end of the reference barrel, slightly separating the barrels at one end. After baking (180°C, 10 min), the piggyback electrodes were pulled with a programmable multipipette puller (PMP-107, Microdata Instrument, South Plainfield, NJ, USA) to give a resistance of ~ 50 MΩ (measured with EPC 9, Heka Elektronik, Lambrecht, Germany). Subsequently, the reference barrel was perfused with pressurized dry air via plastic

tubing pushed over one end (~ 0.9 bar). The pH-sensitive barrel was pushed into a rubber insert in the lid of a heated glass jar and exposed to the vapour formed by a drop (200  $\mu\text{l}$ ) of fresh dichlorodimethylsilane (Sigma-Aldrich) for 30 min. Pipettes were then baked at 180 °C for 2 h. The pH-sensitive barrel was filled with Hydrogen Ionophore I-Cocktail A (0.2  $\mu\text{l}$ ; Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) via a Microliter syringe (type 7000.50C, Hamilton Company, Reno, NV, USA). The electrodes could be stored in a plastic container with silica gel (P077.2, Carl Roth) and light protection for many months. Once opened, Dichlorodimethylsilane had to be replaced frequently.

On the experimental day, the reference barrel was filled with KCl solution (0.5 mol·L<sup>-1</sup>) via a MicroFil micropipette (34Gauge/67 mm, World Precision Instruments, Sarasota, FL, USA), while the pH-sensitive barrel was filled with KCl/HEPES-buffer (in mmol·L<sup>-1</sup>: 500 KCl, 20 HEPES, pH 7.2 adjusted with Tris). Microelectrodes were then trimmed (0.5-30 M $\Omega$ ) to remove clogging silane residues using a beveller (BV-10, Sutter Instrument, Novato, CA, USA).

Measurements were performed in a continuously perfused bath chamber. Via chlorinated silver wires, the two barrels were connected to an amplifier (F-223 A Dual Electrometer, World Precision Instruments). The bath was grounded to a common technical earth via a chlorinated silver wire. In addition, the bath was connected to a commercial electrode (Metrohm, Filderstadt, Germany) via a KCl (3 mol·L<sup>-1</sup>) agar bridge to minimize liquid junction potential effects (ground signal) [2]. All three signals were measured versus the technical earth and recorded using LabChart 7 software (ADInstruments Ltd, Oxford, UK). The potential difference between the two barrels was used to determine the intracellular pH (pH<sub>i</sub>), while the potential difference between the reference barrel and the ground signal from the bath corresponded to the membrane potential ( $U_{\text{mem}}$ ).

Electrodes were calibrated before and after each measurement using solution NaCl (pH 7.4) and NaCl-6.4 (pH 6.4). Suitable electrodes showed a stable potential difference of 45 mV or higher measured by the pH-sensitive barrel with effects at the reference electrode < 0.3 mV. A micromanipulator (Mini 25, Luigs & Neumann, Ratingen, Germany) was used to insert the microelectrode into the oocyte. Impalement was considered to be successful if a sharp drop in the potential across the reference channel to values under -10 mV could be observed.

### **Analysis of single-channel data**

For analysis of single-channel data, an Igor macro (Igor Pro 6.2.2.2; WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA) was used to fit amplitude histograms to a Gaussian distribution with the distance of the maxima giving the unitary current of one channel opening and cross-checked

by direct measurements. The unitary currents were then plotted against the clamped pipette potentials (IV-plot), which were corrected for liquid junction potentials throughout. For symmetrical solutions, the slope of the linear regression equals the conductance. For asymmetrical solutions, GHK theory was used to fit the IV-plot, yielding the permeability for two ions ( $P_A$  and  $P_B$ ) as described in detail in [3].

$$(1) \quad I = \frac{U \cdot F^2}{R \cdot T} \cdot \left( \frac{P_A \cdot [A]_i + P_B \cdot [B]_i - (P_A \cdot [A]_o + P_B \cdot [B]_o) \cdot \exp\left(-U \cdot \frac{F}{R \cdot T}\right)}{1 - \exp\left(-U \cdot \frac{F}{R \cdot T}\right)} \right)$$

The values for  $P_x$  resulting from the fit of currents in asymmetrical solutions were used to predict the conductances ( $G_x$ ) in symmetrical oocyte Ringer solution at  $96 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  according to:

$$(2) \quad G_x = \frac{I}{U} = \frac{F^2}{R \cdot T} \cdot P_x \cdot 96 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$$

To compare these conductance values with data obtained in a previous study with HEK-293 cells in standard Ringer solutions ( $145 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) [3],  $G_x$  in oocyte solution was multiplied by the concentration ratio yielding:

$$(3) \quad G_x (145 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}) = G_x (96 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}) \times \frac{145 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}}{96 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}}$$

## **References**

1. Abdoun K, Stumpff F, Rabbani I, Martens H (2010) Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO<sub>2</sub>. American journal of physiology Gastrointestinal and liver physiology 298:G190-202. doi:10.1152/ajpgi.00216.2009
2. Barry PH, Lynch JW (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. J Membr Biol 121:101-117. doi:10.1007/BF01870526
3. Schrapers KT, Sponder G, Liebe F, Liebe H, Stumpff F (2018) The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. PLoS One 13:e0193519. doi:10.1371/journal.pone.0193519

4. Effects of butyrate<sup>-</sup> on ruminal Ca<sup>2+</sup> transport: evidence for the involvement of apically expressed TRPV3 and TRPV4 channels. (Liebe et al. 2022)

Name	Bezeichnung	Erläuterung Anteil Leistung
Franziska Liebe	Erstautorin	Konzeption des Studiendesigns, der Vorbereitung und Durchführung der Experimente Auswertung und Erstellung der Erstfassung des Manuskriptes Überarbeitung des Manuskriptes Sequenzierung von bTRPV4 und Klonierung des Vektors Sequenzierung von bTRPA1 HEK-293 Zellkultur und Transfektion Immunofluoreszenz und Mikroskopie whole-cell Patch-Clamp Ussing Kamer Messungen Erstellen der Graphiken
Hendrik Liebe	Co Autor	Konzeption des Studiendesigns, der Vorbereitung und Durchführung der Experimente HEK-293 Zellkultur und Transfektion Immunoblotting Überarbeitung des Manuskriptes
Gerhard Sponder	Co Autor	Konzeption, Beratung und Unterstützung in Klonierung und Sequenzierung Überarbeitung des Manuskriptes
Stefan Mergler	Co Autor	Beratung beim intrazellulären Calcium-Imaging Überarbeitung des Manuskriptes
Friederike Stumpff	Co Autorin	Konzeption des Studiendesigns Beratung bei Durchführung und Auswertung der Experimente Unterstützung bei der Erstellung der Erstfassung des Manuskriptes Überarbeitung des Manuskriptes

This article has been published in: Pflügers Archiv: European journal of physiology; 474(3):S. 315-342.

CC BY 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Manuscript received at the Pflügers Archiv: 1 September 2021

Revised: 4 November 2021

Accepted: 24 November 2021

Published: 31 January 2022

DOI: 10.1007/s00424-021-02647-7

<https://doi.org/10.1007/s00424-021-02647-7>

Authors:

Franziska Liebe, Hendrik Liebe, Gerhard Sponder, Stefan Mergler, Friederike Stumpff

Reproduced with permission from Springer Nature.



# Effects of butyrate<sup>-</sup> on ruminal Ca<sup>2+</sup> transport: evidence for the involvement of apically expressed TRPV3 and TRPV4 channels

Franziska Liebe<sup>1</sup> · Hendrik Liebe<sup>1,2</sup> · Gerhard Sponder<sup>1</sup> · Stefan Mergler<sup>3</sup> · Friederike Stumpff<sup>1,4</sup>

Received: 1 September 2021 / Revised: 4 November 2021 / Accepted: 24 November 2021 / Published online: 31 January 2022  
© The Author(s) 2021

## Abstract

The ruminal epithelium absorbs large quantities of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. A role for TRPV3 has emerged, but data on TRPV4 are lacking. Furthermore, short-chain fatty acids (SCFA) stimulate ruminal Ca<sup>2+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> uptake in vivo and in vitro, but the pathway is unclear. Sequencing of the bovine homologue (bTRPV4) revealed 96.79% homology to human TRPV4. Two commercial antibodies were tested using HEK-293 cells overexpressing bTRPV4, which in ruminal protein detected a weak band at the expected ~ 100 kDa and several bands ≤ 60 kDa. Immunofluorescence imaging revealed staining of the apical membrane of the *stratum granulosum* for bTRPV3 and bTRPV4, with cytosolic staining in other layers of the ruminal epithelium. A similar expression pattern was observed in a multilayered ruminal cell culture which developed resistances of > 700 Ω · cm<sup>2</sup> with expression of *zonula occludens-1* and claudin-4. In Ussing chambers, 2-APB and the TRPV4 agonist GSK1016790A stimulated the short-circuit current across native bovine ruminal epithelia. In whole-cell patch-clamp recordings on HEK-293 cells, bTRPV4 was shown to be permeable to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, and Na<sup>+</sup> and highly sensitive to GSK1016790A, while effects of butyrate<sup>-</sup> were insignificant. Conversely, bTRPV3 was strongly stimulated by 2-APB and by butyrate<sup>-</sup> (pH 6.4 > pH 7.4), but not by GSK1016790A. Fluorescence calcium imaging experiments suggest that butyrate<sup>-</sup> stimulates both bTRPV3 and bTRPV4. While expression of bTRPV4 appears to be weaker, both channels are candidates for the ruminal transport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. Stimulation by SCFA may involve cytosolic acidification (bTRPV3) and cell swelling (bTRPV4).

**Keywords** TRPV4 · TRPV3 · Rumen · SCFA · Butyric acid · GSK1016790A · GSK2193874 · 2-APB · Calcium · Ammonia · Ammonium

## Introduction

Arguably, the era of modern transport physiology began with Ussing's famous discovery of active transport across amphibian skin [105]. Over 70 years later, we still know very little about transport processes across stratified squamous epithelia

of mammalian species. Extraordinarily tight due to multiple layers of cells interconnected by tight junction proteins, such epithelia play a formidable role in the formation of a barrier between the external and the internal milieu of the body as in the human skin [8]. However, it is frequently overlooked that cells are also interconnected by gap junctions [65], the mutation of which induces a spectrum of hereditary diseases [10]. By facilitating exchanges of ions, molecules, and water, gap junctions interconnect cells to form a functional syncytium which in principle can mediate epithelial transport.

A classic example for a transporting cornified stratified epithelium in mammals is the ruminal epithelium of cattle and sheep [37, 93]. Interest in this tissue has historically been high since insufficient transport capacity of the rumen may lead to malnutrition and disease in ruminants [6, 63]. Apart from the suffering of the animals, inefficient use of nutrients is associated with economic losses and a negative environmental impact [22]. There is thus a direct interest in understanding more about the underlying ruminal transport processes, with potential

A Commentary to this article is available online at <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02660-w>

✉ Friederike Stumpff  
stumpff@zedat.fu-berlin.de

<sup>1</sup> Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Department of Biology, Chemistry, and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>3</sup> Institute of Experimental Ophthalmology, Charité - Universitätsmedizin Berlin, Berlin, Germany

<sup>4</sup> Institute of Physiology, Health and Medical University, Schiffbauergasse 14, 14467 Potsdam, Germany

repercussions for understanding the function of these proteins in other tissues, such as the oesophageal mucosa or the skin.

The rumen must be considered a fairly “modern” organ, with adaptation of pre-existing pathways to their current use. Triggered by the replacement of primordial forests by grasslands [94], the rumen evolved from the oesophagus about 50 million years ago [39], roughly at the same time when primates entered the stage. Within the rumen, microbes break up plant material such as grass that cannot be digested by mammalian enzymes [9]. The rumen can thus be seen as a fermentation vat to produce microbiota that are digested in the stomach and intestine, providing the ruminant with protein, fat, and vitamins. Simultaneously, fermentation products such as SCFA and ammonia ( $\text{NH}_4^+$  or  $\text{NH}_3$ ) are continuously absorbed across the ruminal wall into the hepatic circulation [1, 6, 95], where they can be utilized for the synthesis of sugars, fats, non-essential amino acids, and urea. Furthermore, ruminants have perfected the ability to absorb  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , and  $\text{Mg}^{2+}$  from the rumen [55, 63, 83, 118]. Despite this and due to the large quantities lost with milk, cows frequently have deficiencies in  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ .

The mechanisms behind ruminal magnesium transport have been studied in detail. Hypomagnesemia in cattle is usually associated with an oversupply of  $\text{K}^+$  in conjunction with deficiencies in dietary  $\text{Na}^+$  and  $\text{Mg}^{2+}$  content [63, 64]. In contrast, hypocalcaemia continues to be a poorly understood although very frequent problem in dairy cattle, affecting 25–50% of the animals at the onset of lactation [24, 118]. Even if death during the acute episode can be averted by treatment, follow-up problems are severe. The rapid decrease in blood  $\text{Ca}^{2+}$  observed under parturition in cattle appears to be related primarily to the failure to mobilize sufficient  $\text{Ca}^{2+}$  from bone to compensate for the large quantities lost with milk. An important co-factor is the metabolic alkalosis of the ruminant, which interferes with parathyroid hormone activity [36]. Treatment options include lowering the cation–anion difference of the diet, thus inducing a shift in acid–base balance towards metabolic acidosis. A classical approach is adding ammonium salts to the feed [72]. As will be discussed below, ruminal absorption of ammonium occurs primarily in the form of  $\text{NH}_4^+$ , thus shifting protons from the rumen into blood—a process that should simultaneously stabilize systemic and ruminal acid–base balance. On the other hand, loss of ammonium from the rumen in more physiological feeding situations decreases the amount of nitrogen available for microbial protein synthesis [77]. In animals on physiological, low-protein diets, most of this nitrogen will re-enter the rumen as urea with subsequent conversion to buffering  $\text{NH}_3$  [1, 77]. However, in most contemporary feeding situations, large quantities of nitrogen are excreted into the environment, leading to nitrification of surface waters and formation of climate gas, both with catastrophic consequences [23, 106].

Decades of research on animals in vivo and epithelia in vitro have established that uptake of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and ammonia from the rumen requires transcellular, protein-mediated transport pathways [55]. The ruminal uptake of  $\text{Mg}^{2+}$  involves the classical  $\text{Mg}^{2+}$  channels TRPM6 and TRPM7 [78, 85] and possibly other non-selective TRP channels [99]. Despite numerous attempts by different authors, mRNA for the classical epithelial calcium channels TRPV5 or TRPV6 could not be found in rumen of cattle or sheep [32, 78, 83, 116, 117]. Furthermore, the short-circuit current ( $I_{\text{sc}}$ ) across the epithelium is mediated by a non-selective cation channel that is very poorly sensitive to amiloride or aldosterone [62] and thus distinct from the epithelial sodium channels found in other epithelia. Functional data argue for an efflux of ammonia in the form of  $\text{NH}_4^+$  via this pathway, explaining the high losses of nitrogen from the rumen even at an acidic ruminal pH [3, 11, 76, 78]. Note that when ruminal pH drops from 6.4 to 5.5, the concentration of  $\text{NH}_3$  drops from 0.5% of total ammonia to 0.06%. The failure to observe a corresponding decrease in ammonia absorption argues against simple diffusive efflux.

Due to its lone pair of electrons, the  $\text{NH}_3$  molecule is highly polar which severely limits diffusion across lipid bilayers [114]. Instead, it has emerged that transport proteins such as Rh glycoproteins or aquaporins (AQP) are required to mediate transport of  $\text{NH}_3$  across biological membranes [14, 34, 114]. Furthermore, both  $\text{K}^+$  channels [19] and  $\text{K}^+$  transporters such as NKCC [50] can transport  $\text{NH}_4^+$ , which is not surprising since the biophysical properties of both ions are similar. Functional data from in vitro studies of the ruminal epithelium show that at an unphysiologically high pH of 7.4, absorption of ammonia involves diffusion of  $\text{NH}_3$  [3]—possibly via AQP3 [120] since Rh glycoproteins do not appear to be expressed [119]. However, at the more physiological pH of ~6.4 found in vivo, uptake of  $\text{NH}_4^+$  clearly predominates [3, 11, 13]. The non-selective cation channel TRPV3 has emerged as a likely candidate mediating transport not only of  $\text{Na}^+$  but also of  $\text{NH}_4^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  across the ruminal epithelium [56, 78, 79], with possible participation of other channels.

Mammals express genes for at least 28 different transient receptor potential (TRP) subunits which form homomeric or heteromeric assemblies around a pore region with variable selectivity for monovalent and divalent cations [18]. The first member of this family was identified in retinae of *Drosophila* flies which showed a transient rather than a sustained receptor potential in response to light [67]. Perhaps this is why most initial research was devoted to understanding more about the involvement of TRP channels in sensory functions and signalling. Thus, TRPV3 was originally associated with thermosensation, although later studies of knockout mice and human mutations suggest a role in the cornification of the skin via pathways that have not been completely clarified

[69]. In the rumen and the intestine, a role in cation transport has emerged [32, 61, 76, 78, 79]—although this certainly does not rule out other functions.

In addition to TRPV3, we have previously detected mRNA for TRPV4 in the bovine rumen. This channel is typically expressed by epithelia and has functions that range from osmosensing in the gut [45] to promoting barrier function of the skin [10]. However, detection of mRNA does not always mean that the protein is actually expressed [16] and gives no clues on the localization within a tissue. Furthermore, it is unclear if TRPV4 conducts  $\text{NH}_4^+$ . Accordingly, we sequenced the bovine TRPV4 (bTRPV4), overexpressed the channel in HEK-293 cells, established corresponding antibodies, and investigated the protein expression of bTRPV4 in rumen. Immunofluorescence staining was used to localize bTRPV3 and bTRPV4 in native ruminal epithelia and in a ruminal cell culture model. To test for functional expression, agonists were used on ruminal tissues in the Ussing chamber. Furthermore, we determined the conductance of bTRPV4 to  $\text{NH}_4^+$ . Given that studies *in vivo* and *in vitro* have shown a strong stimulatory effect of SCFA on the transport of  $\text{Ca}^{2+}$  [44, 54, 81–83, 104, 110, 117] and ammonia [12, 13] across the rumen, we finally investigated if bTRPV3, bTRPV4, or both channels are candidates for this SCFA sensitive pathway for the uptake of cations.

## Materials and methods

### Chemicals

If not stated otherwise, all chemicals were obtained from Carl Roth (Karlsruhe, Germany) or Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany).

### Animal welfare

For Ussing chamber experiments, ruminal epithelium was obtained from 5 Holstein–Friesian cows that were euthanized within the context of another study in accordance with the guidelines of German legislation, with approval by the animal welfare officer of the Bundesinstitut für Risikobewertung and under the governance of the Berlin Veterinary Health Inspectorate (Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin, permit T 0111/20).

For immunofluorescence staining and immunoblotting, bovine ruminal epithelium was obtained from Holstein–Friesian cattle slaughtered for meat production in a commercial abattoir (Beelitz, Germany) under control of the German authorities.

## Ruminal tissue

Tissues were removed from the ventral rumen as rapidly as possible after death (< 20 min). After stripping to remove submucosal layers, the tissue was washed rigorously in Ringer solution. For Ussing chamber measurements, tissues were transported in warm (37 °C) and gassed (95%  $\text{O}_2$ /5%  $\text{CO}_2$ ) buffer (pH 7.4, 300 mosmol ·  $\text{kg}^{-1}$ ) which contained (in mmol ·  $\text{L}^{-1}$ ) 70 NaCl, 40 NaGlu (sodium gluconate), 25  $\text{NaHCO}_3$ , 5 glucose, 5 HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), 2.4  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 1.2  $\text{CaCl}_2$ , 1.2  $\text{MgCl}_2$ , and 0.4  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , all as described previously [78]. The Ussing chamber experiments started roughly 2 h after extraction of the tissue.

For cell isolation, a 5  $\text{cm}^2$  piece of stripped ruminal mucosa was washed thoroughly in phosphate-buffered saline (PBS) without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$ , containing 4% penicillin and streptomycin (Biochrom, Berlin, Germany) and transported to the laboratory in fresh PBS at 4 °C. For protein extraction, samples were packed in aluminium foil and shock frozen in liquid nitrogen (–80 °C). For immunofluorescence staining, tissues were stored in formaldehyde solution (Roti@-Histofix 4%).

## Ruminal cell culture

Papillae were cut from bovine ruminal tissue, repeatedly washed in PBS without  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  (4% penicillin and streptomycin), and processed as described previously [30, 96] and in [Supplement Part A](#).

## Sequencing and cloning

After sequencing (GenBank: MZ028088.1), the 2613 base pairs coding sequence of the bovine homologue of *TRPV4* (*bTRPV4*) was synthesized by Thermo Fisher Scientific (Regensburg, Germany). The *bTRPV4* gene was tagged with a twin streptavidin tag (*Strep*) placed at the C-terminus followed by a sequence for yellow fluorescent protein (*YFP*). Successfully transfected cells showed yellow fluorescence (excitation peak: 514 nm; emission peak: 527 nm). For transfection of HEK-293 cells, the *bTRPV4-Strep-YFP* construct was subcloned into a pcDNA<sup>TM</sup>5/TO vector (p5TO, Life Technologies, Darmstadt, Germany) using the restriction sites HindIII and XbaI ([Supplement, Part B](#)). The resulting fusion protein of bTRPV4, Strep, and YFP consisted of 1144 amino acids with a calculated molecular weight of 128.55 kDa. The two tags therefore caused a size shift of ~30 kDa compared to the native bTRPV4 channel protein.



Cloning of the pIRES2-*Strep-bTRPV3-AcGFP1* vector and the p5TO-*Strep-bTRPV3* vector was performed as described in detail in Schrapers et al. [79]. Successfully transfected pIRES2-*Strep-bTRPV3-AcGFP1* cells could be identified by the green fluorescence (excitation peak: 395 and 475 nm; emission peak: 509 nm).

## HEK-293 cell culture and transfection

HEK-293 cells (DSMZ, Braunschweig, Germany, 2016/06/08) were cultivated under standard conditions in Dulbecco's modified Eagle's medium (FG0445) supplemented with 10% FBS and 1% penicillin and streptomycin (all Biochrom) [79]. For transient transfection of HEK-293 cells, PEI (polyethylenimine, linear, MW 25,000, Polysciences, Inc., Hirschberg an der Bergstrasse, Germany) was used in a calculated protocol (<http://www.cytographica.com/lab/PEItransfect.html>). For characterization of bTRPV4 in whole-cell patch-clamp and fluorescence calcium imaging experiments, p5TO-*bTRPV4-Strep-YFP* and control p5TO HEK-293 cells were used 1 or 2 days after transfection. For characterization of bTRPV3 in patch-clamp experiments, HEK-293 cells were transfected with the pIRES2-*Strep-bTRPV3-AcGFP1* vector or the empty pIRES2-*AcGFP1* vector (control) 2 days before the experiment. For calcium imaging, HEK-293 cells were transfected with the p5TO-*Strep-bTRPV3* or the empty p5TO vector (control) 1 or 2 days prior to experiments to prevent interference between staining of GFP and fura-2.

## Immunoblotting

HEK-293 cells or bovine ruminal tissue were prepared as described in Supplement Part C and in Liebe et al. [57].

To detect successful overexpression, a primary mouse antibody directed against the Strep tag expressed by the p5TO-*bTRPV4-Strep-YFP* vector (1:2500; Anti Strep, #34,850, Qiagen, Hilden, Germany) was used with subsequent horseradish peroxidase-conjugated secondary horse anti-mouse IgG antibody (1:1000; #7076, Cell Signaling Technology, Frankfurt, Germany).

For direct staining of bTRPV4 protein in immunoblots of HEK-293 cells and native ruminal epithelium, two commercial TRPV4 antibodies were selected after epitope screening. The first, subsequently referred to as "Thermo" (polyclonal, rabbit TRPV4 antibody, 1:500; OSR00136W, Thermo Fisher scientific), interacted with an epitope between the amino acid 300 and 400 of human TRPV4 which has 100% identity with our sequenced bovine TRPV4. The second one "ABIN"

(polyclonal, rabbit TRPV4 antibody, 1:500; ABIN1049441, antibodies-online GmbH, Aachen, Germany) recognized an epitope of 20 amino acids within the internal region of human TRPV4 with stated 100% identity to cattle. For visualization, a secondary goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to horseradish peroxidase (1:1000; #7074, Cell Signaling Technology) was applied.

## Immunofluorescence staining

All preparation steps were performed as described in detail in Liebe et al. [56]. HEK-293 cells were stained for bTRPV4 with the Thermo (1:500) or the ABIN (1:500) antibody, diluted in goat serum (5% in PBS with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup>; PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Germany), and incubated overnight (4 °C). The corresponding secondary Alexa Fluor® 594-conjugated goat anti-rabbit antibody (1:1000; A-11037, Thermo Fisher scientific) was diluted in goat serum (5% in PBS) and applied for 1 h at 37 °C. To stain cell nuclei, DAPI (4',6-diamidino-2'-phenylindole dihydrochloride, 0.2 µg/mL; Roche, Mannheim, Germany) was used. The YFP signal occupied the third channel of the confocal laser microscope.

Likewise, native ruminal tissues were stained with the primary antibodies Thermo (1:300) or ABIN (1:200) and secondary Alexa Fluor® 594-conjugated goat anti-rabbit antibody supplemented with DAPI. Additional slices of rumen were stained with Anti TRPV3 (monoclonal, mouse TRPV3 antibody, 1:1000; ABIN863127, antibodies-online GmbH) in conjunction with Anti claudin-4 (polyclonal, rabbit claudin-4 antibody, 1:1000; AB53156, Abcam, Cambridge, UK). In contrast to Liebe et al. [56], secondary antibodies were switched using Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-rabbit and Alexa Fluor® 594-conjugated goat anti-mouse antibodies (both 1:1000, A-11034 and A-11032, Thermo Fisher scientific).

The ruminal cell culture model that was grown in inserts was stained with ABIN (1:200) and Anti ZO-1 (monoclonal, mouse *zonula occludens-1* antibody, 1:400; 33-9100, Thermo Fisher scientific). In addition, inserts were stained with Anti TRPV3 (1:1000) in conjunction with Anti claudin-4 (1:250). As secondary antibodies, Alexa Fluor® 594 goat anti-rabbit antibody (1:1000) and Alexa Fluor® 488-conjugated goat anti-mouse antibody (1:1000; A-11029, Thermo Fisher scientific) were used, all as established in Liebe et al. [56].

All images were obtained using a confocal laser scanning microscope (LSM 710, Carl Zeiss, Jena, Germany). Secondary antibody controls were routinely performed in parallel with goat serum (5% in PBS) only and typically showed a discreet green auto fluorescence which needed to be corrected in all samples (data not shown).

## Experiments in Ussing chambers

The measurements were performed essentially as in Rosendahl et al. [78]. Small pieces of fresh ruminal mucosa were mounted in Ussing chambers, resulting in an exposure area of 3.14 cm<sup>2</sup>. The serosal and mucosal sides were each exposed to 15 mL buffer solution (37 °C) gassed with 95% O<sub>2</sub> and 5% CO<sub>2</sub>. All solutions were adjusted to an osmolality of 300 mosmol · kg<sup>-1</sup> with D-mannitol. In analogy to the physiological scenario, the serosal buffers were adjusted to pH 7.4 and mucosal buffers to pH 6.4. The serosal solution contained (in mmol · L<sup>-1</sup>): 70 NaCl, 40 NaGlu, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 5 glucose, 5 KCl, 2.4 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.2 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 0.4 NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, and 10 mmol · L<sup>-1</sup> of the buffer MOPS (3-(N-morpholino) propanesulfonic acid) [78]. In the mucosal buffer, 40 NaGlu were replaced by 25 sodium acetate, 10 sodium propionate, and 5 sodium butyrate, buffered to pH 6.4 with 10 mmol · L<sup>-1</sup> MES (2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid). The potent TRPV4 agonist GSK1016790A or the TRP channel agonist 2-APB (Supplement, Part D) were diluted in DMSO (dimethyl sulfoxide) and directly added to the mucosal bath at ≤ 1:1000. Control tissues were treated with a corresponding amount of DMSO.

One animal was used on each experimental day. After an equilibration period of ~20 min in open-circuit mode, the potential was clamped to 0 mV in the short-circuit mode (Mussler Scientific Instruments, Aachen, Germany). The equivalent short-circuit current ( $I_{sc}$ ) represents the negative of the current required to clamp the potential to zero. Cations transported from the apical side (mucosal) to the basolateral side (serosal) produced a positive  $I_{sc}$ . The conductance ( $G_t$ ) was continuously determined from the potential response to a short 100 μA current pulse and varied between 5 and 21 mS · cm<sup>-2</sup>. Ruminal tissues with similar transepithelial  $G_t$  were paired in treatment groups.

## Whole-cell experiments

Whole-cell patch-clamp measurements were performed in a continuously perfused bath chamber at 23 °C [33, 56, 78, 79] (Supplement, Part E). Experimental solutions for patch-clamp experiments were modifications of established recipes [27, 109] (Supplement, Part D). Including Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> in the pipette and/or the bath generally resulted in higher seal rates, higher seal stability, and lower currents (Supplement, Part D).

## Intracellular calcium fluorescence imaging

Single cell calcium fluorescence imaging was performed as described in Walcher et al. [111] using an inverted microscope (Olympus BW50WI, Olympus) connected to

a digital camera (XM-10, Olympus) and CellSens Dimension software (Olympus Europa Holding GmbH, Hamburg, Germany). Excitation was continuously switched between 340 (for 2.8 s) and 380 nm (for 900 ms) via cutoff filters from light provided by a LED light source (LED-Hub by Omicron, Rodgau-Dudenhofen, Germany). Emission was detected at 510 nm and used to calculate an emission fluorescence ratio ( $f_{340\text{ nm}}/f_{380\text{ nm}}$ ) which functions as an index of relative intracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>) levels [38].

HEK-293 cells were seeded onto coverslips and transfected as described above. After 1 or 2 days, cells were at semi-confluence (50–70%) and were loaded with fura-2 AM (1 μmol · L<sup>-1</sup>; PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany) for 25–40 min (37 °C, in incubator). Cells were washed and placed in a bath chamber at 23 °C using NaCl solution at pH 6.4 (Supplement, Part D, IV). The chamber was connected via tubing to a syringe and a pumping system to allow rapid and complete changes of the bath solution. After selection of cells using the software (~10 min), the bath solution (Supplement, Part D, IV) was switched from NaCl 6.4 to NaBu 6.4 and back to NaCl 6.4, in 4-min intervals. For the determination of the minimum fluorescence ratio ( $R_{min}$ ), 13 mmol · L<sup>-1</sup> EGTA replaced MgCl<sub>2</sub> and CaCl<sub>2</sub> in the NaCl 6.4 solution. For the determination of the maximum fluorescence ratio ( $R_{max}$ ), NaCl 6.4 solution with 20 mmol · L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> (but no MgCl<sub>2</sub> or EGTA) was applied. The [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> was calculated from the emission ratio ( $f_{340\text{ nm}}/f_{380\text{ nm}}$ ) according to Grynkiewicz et al. [38] using Igor Pro Software.

## Data analysis and statistical analysis

Data evaluation was performed using Igor Pro 6.37 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA) using the equations in Supplement Part F.

Statistical evaluation was carried out with SigmaPlot 11.0 (Systat Software, Erkrath, Germany). Within the same group, data were tested using the Friedman repeated measures analysis of variance on ranks test, followed by the Student–Newman–Keuls method. Comparisons of several groups were performed using the Kruskal–Wallis one-way analysis of variance (ANOVA) on ranks. Comparison of two groups occurred via the Mann–Whitney rank sum test. Significance of differences was assumed when  $p \leq 0.05$ . Values were given as means ± standard error of the mean (SEM), rounding as recommended by the DIN 1333 [25]. The  $N$ -value represents the number of individual cattle in Ussing chamber experiments or, in the case of calcium imaging, the number of coverslips. The  $n$ -value represents the number of individual samples.

## Results

### Sequencing and overexpression of bTRPV4

The bovine homologue of *TRPV4* (*bTRPV4*) was sequenced from ruminal tissue (GenBank: MZ028088.1, encoding for the protein QXI66840.1). HEK-293 cells were transfected with the *bTRPV4-Strep-YFP* construct in a p5TO vector (Supplement, Part B).

### Immunoblot: bTRPV4 HEK-293 cells

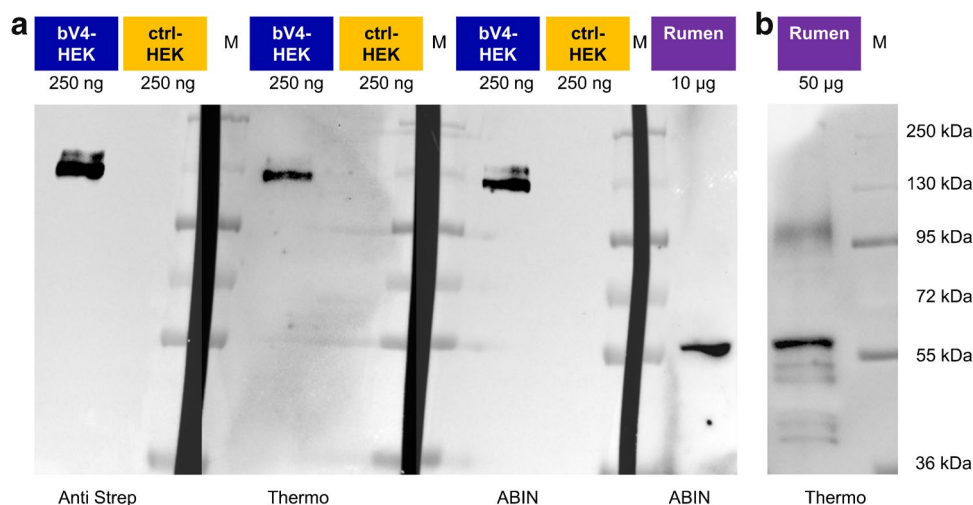
Two antibodies directed against TRPV4 (Thermo and ABIN) both stained bTRPV4 protein from overexpressing HEK-293 cells at a similar height of ~130 kDa (Fig. 1a,  $n=4$ ). This height reflects the sum of the predicted molecular weight of bTRPV4 (~100 kDa) and the Strep and YFP tags. The doubling of the band most likely reflects glycosylation, as reported for TRPV4 from mouse oesophageal epithelium [87]. Bands of similar height appeared after staining against the Strep tag ( $n=4$ ). No band was visible in the lanes with protein of empty p5TO transfected control HEK-293 cells ( $n=4$ ).

### Immunoblot: native bovine ruminal epithelium

Both TRPV4 antibodies were used for detection in protein samples of the native bovine rumen (Fig. 1a, b). A strong ~60 kDa band could be observed using either Thermo ( $n/N=12/5$ ) or ABIN ( $n/N=5/3$ ). At high concentrations and longer exposure times, a weaker band occurred at a molecular weight of ~100 kDa, corresponding to the predicted native bTRPV4 sequence (Fig. 1b). The ~60 kDa band could again be observed, along with a number of signals with a lower molecular weight, possibly reflecting breakdown products.

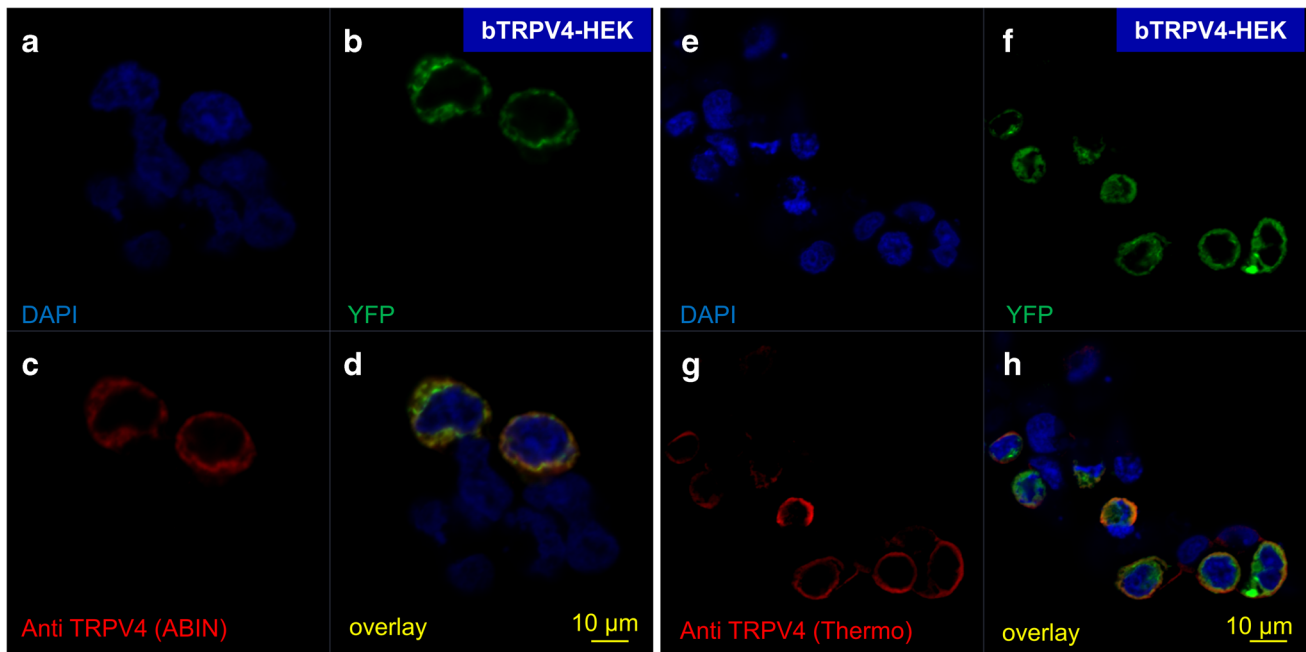
### Confocal laser microscopy: HEK-293 cells

HEK-293 cells successfully overexpressing bTRPV4 showed fluorescence for YFP, which was fused to the bTRPV4 protein and thus appeared in the cell membrane (Fig. 2b, f, green). Similarly, staining of the membrane with the ABIN (Fig. 2c) or Thermo (Fig. 2g) antibodies was observed (each  $n=2$ ). Since the transfection rate of PEI is estimated to be ~30%, a number of cells in the same cell dish did not express the bTRPV4-YFP fusion protein (Fig. 2d, h). These cells and controls exclusively showed DAPI staining.



**Fig. 1** Immunoblots: detection of bTRPV4 in overexpressing HEK-293 cells and in bovine rumen. Immunoblots using the Anti Strep, ABIN, and Thermo antibodies as indicated at the bottom. Lane titles and the corresponding amount of total protein are indicated at the top. **a** Three lanes each of protein from Strep tagged bTRPV4 HEK-293 cells (bV4-HEK), control HEK-293 cells (ctrl-HEK), and marker protein (M) were blotted onto one membrane, followed by a lane with protein from the bovine rumen (rumen). This membrane

was cut along the marker lanes (M, black gaps) and incubated separately using different primary antibodies. Each membrane piece was processed independently to gain ideal exposure times. Afterwards, images were gamma corrected and merged. **b** At a higher concentration of 50 µg protein from bovine rumen (rumen), a band was visible at the expected height of bTRPV4 (~100 kDa). Image was gamma corrected



**Fig. 2** Confocal laser microscopy: localization of bTRPV4 in bTRPV4 HEK-293 cells. Cell nuclei were stained with DAPI (blue) (a, e). The YFP signal (green) indicates successful transfection with expression of the fusion protein bTRPV4-Strep-YFP (b, f). The ABIN

(c) and the Thermo antibody (g) selectively stained bTRPV4 (red). Overlay with co-localization of staining for bTRPV4 and YFP is shown in yellow, primarily in the cell membrane (d, h). Cells not successfully transfected only stained for DAPI

### Confocal laser microscopy: bovine ruminal epithelium

Bovine rumen was obtained from slaughterhouse cattle and showed a typical structure with the *stratum basale* (①), *stratum spinosum* (②), and *stratum granulosum* (③) (Fig. 3a). The *stratum corneum* (④) was partially or totally detached (Fig. 3a, b, white arrows) and contained residual cell nuclei (Fig. 3b, blue arrow). These are signs of parakeratosis, a condition associated with high-grain finishing diets [5, 53, 92, 97].

Tissues were first stained for bTRPV3 in conjunction with the tight junction protein claudin-4. Localization was essentially as reported previously [56, 96] (Fig. 3,  $n/N=3/1$ ). Weak claudin-4 staining could be seen in the cytosol of the *stratum basale*, increasingly shifting to cell boundaries in the *stratum spinosum*. Cells of the *stratum granulosum* were flat but showed clear membrane-bound staining for claudin-4 (Fig. 3). Conversely, the *stratum corneum* does not express functional tight junction proteins [8, 97]. The ubiquitous faint staining of this layer for claudin-4 and bTRPV3 without demarcation of cell boundaries almost certainly reflects dysfunctional membrane proteins dislodged by the corneocyte envelope (see 31).

All three basal layers of the ruminal epithelium (①, ②, ③) showed cytosolic staining for bTRPV3 which most likely reflects processing of bTRPV3 in the endoplasmic reticulum

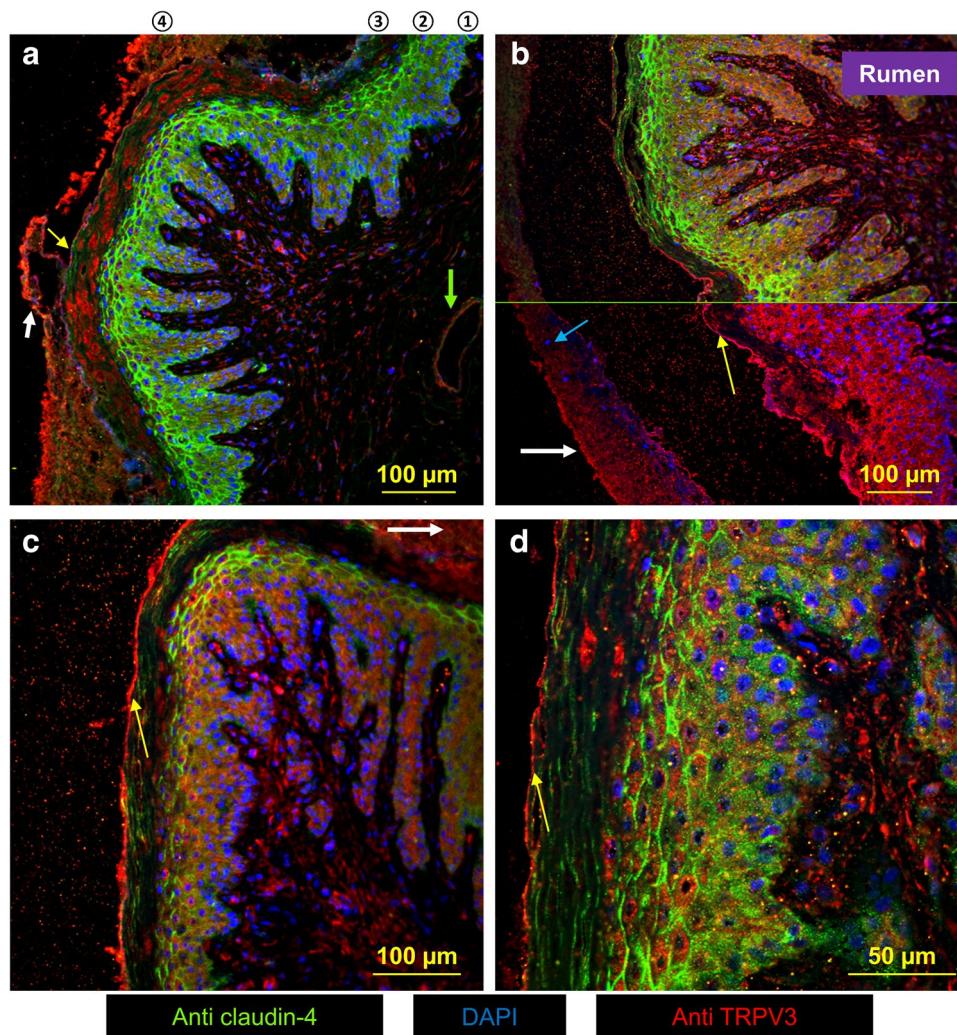
or expression by cell organelles. Any overlay with claudin-4 was very discrete. The apical membrane of the *stratum granulosum* appeared as a distinct red line reflecting accumulated expression of bTRPV3 (Fig. 3, yellow arrows). Apart from the strong signal in the apical membrane, staining for bTRPV3 was poor in the *stratum granulosum*. This suggests that the channel protein is mainly produced and assembled in the underlying cell layers and trafficked to the apical membrane of the functional syncytium.

A similar staining pattern was observed when using the antibodies for bTRPV4, with cytosolic staining visible in the epithelial layers and intense staining of the apical membrane belonging to the *stratum granulosum* (Fig. 4,  $n=38/4$ ).

In comparison to the epithelium, the staining of the sub-epithelium was weak. However, pronounced staining was visible around blood vessels (Fig. 3a and 4b), indicating bTRPV3 and bTRPV4 expression by the vascular endothelium as described previously [91, 98].

### Multilayered ruminal cell culture

Ruminal keratinocytes from the bovine rumen could be cultured in inserts to form multilayered model epithelia expressing tight junction proteins, as shown in a previous study using material from sheep [96]. Interestingly, feeder cells were not needed. Four inserts with keratinocytes from 2



**Fig. 3** Confocal laser microscopy: localization of bTRPV3 and claudin-4 in native ruminal epithelium. bTRPV3 was stained in red (Anti TRPV3), claudin-4 in green (Anti claudin-4), and cell nuclei in blue (DAPI). **a** Staining for claudin-4 can be seen weakly in the cytosol of the *stratum basale* (④), shifting into the cell membrane in the *stratum spinosum* (②), while delicately demarcating the flat cells of *stratum granulosum* (③). Note the line of bTRPV3 staining in the apical membrane (yellow arrow). Above this line, bTRPV3 staining is dysmorphic in the *stratum corneum* (④). The *stratum corneum* has detached partially (white arrow). In the subepithelial space, a blood vessel shows pronounced bTRPV3 staining (green arrow). **b** Staining for claudin-4 is only shown in the top part of the figure above the green line. The *stratum corneum* (white arrow) has detached completely,

with residual cell nuclei (blue arrow) that are typical signs of parakeratosis. The point of detachment is again lined by intense bTRPV3 staining (yellow arrow). In the *stratum spinosum* and *basale*, staining for bTRPV3 is cytosolic. **c** Ruminal papillae with *stratum corneum* that has detached almost completely, except at the top right (white arrow). Note the claudin-4-stained cell boundaries in the *stratum granulosum* and the bright apical staining for bTRPV3 (yellow arrow). **d** The higher magnification shows the apical membrane of the *stratum granulosum* with intense staining for bTRPV3 (yellow arrow). Staining for claudin-4 can be seen in the cell boundaries of the *stratum granulosum* and *spinosum*. The cytosol of the *stratum granulosum* shows very little staining for bTRPV3

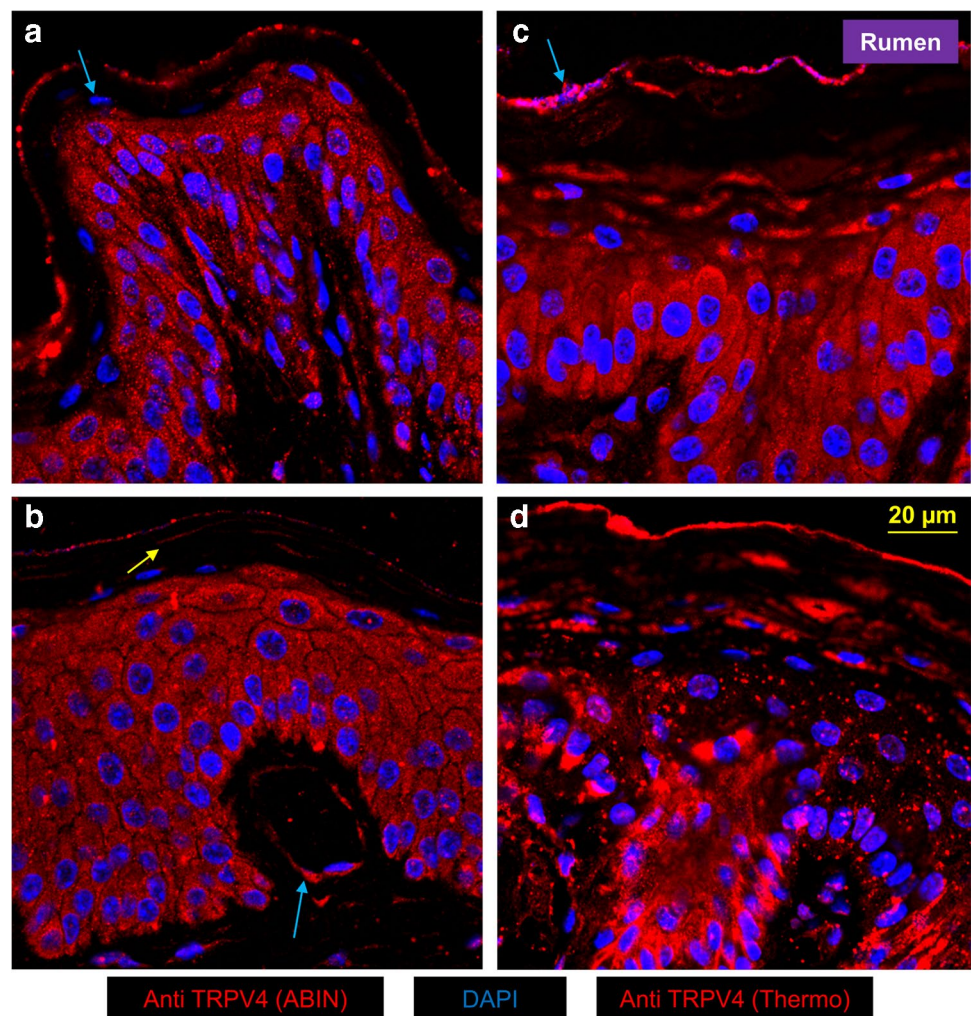
completely, with residual cell nuclei (blue arrow) that are typical signs of parakeratosis. The point of detachment is again lined by intense bTRPV3 staining (yellow arrow). In the *stratum spinosum* and *basale*, staining for bTRPV3 is cytosolic. **c** Ruminal papillae with *stratum corneum* that has detached almost completely, except at the top right (white arrow). Note the claudin-4-stained cell boundaries in the *stratum granulosum* and the bright apical staining for bTRPV3 (yellow arrow). **d** The higher magnification shows the apical membrane of the *stratum granulosum* with intense staining for bTRPV3 (yellow arrow). Staining for claudin-4 can be seen in the cell boundaries of the *stratum granulosum* and *spinosum*. The cytosol of the *stratum granulosum* shows very little staining for bTRPV3

cows were produced. Three inserts developed transepithelial electrical resistance (TEER) values of 750, 741, and 705  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  on day 20, after which they were stained. The fourth filter dropped from 510  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  on day 20 to 270  $\Omega \cdot \text{cm}^2$  on day 24, after which it was also stained.

All filters showed staining for bTRPV3 and bTRPV4 (Fig. 5, 6, and supplemental films). Expression of ZO-1, claudin-4, and bTRPV4 was rudimentary in the basal layers near the filter (Fig. 5f, 6c), in contrast to the strong cytosolic

staining for bTRPV3 (Fig. 5e, f), possibly reflecting endoplasmic processing prior to trafficking. As cells grew upwards, they began expressing claudin-4 (Fig. 5c, d), ZO-1, and bTRPV4 (Fig. 6a, d) within the cytosol. More apically, the tight junction proteins claudin-4 and ZO-1 began to stain the cell boundaries until in the most apical layers, membrane-bound staining for bTRPV3 (Fig. 5a) and bTRPV4 (Fig. 6b) became visible, all in striking resemblance to what was found in the native epithelium. However, in cell culture,

**Fig. 4** Confocal laser microscopy: localization of bTRPV4 in native ruminal epithelium. bTRPV4 was stained in red using ABIN (a, b) or Thermo (c, d), and cell nuclei were stained in blue using DAPI. Despite some variability, the cytosol tended to be intensely stained for bTRPV4 in the *stratum spinosum* and *stratum basale*. Towards the top layers, staining intensity decreased strongly. Note the small strips of bTRPV4 staining (b, yellow arrow). At the apical membrane of the *stratum granulosum*, an intense line of bTRPV4 staining is visible with rudimentary cell nuclei (c, blue arrow). Subepithelial staining was very discrete, except around blood vessels (b, blue arrow)



there were signs of a co-localization of bTRPV3 and claudin-4 as well as of bTRPV4 and ZO-1.

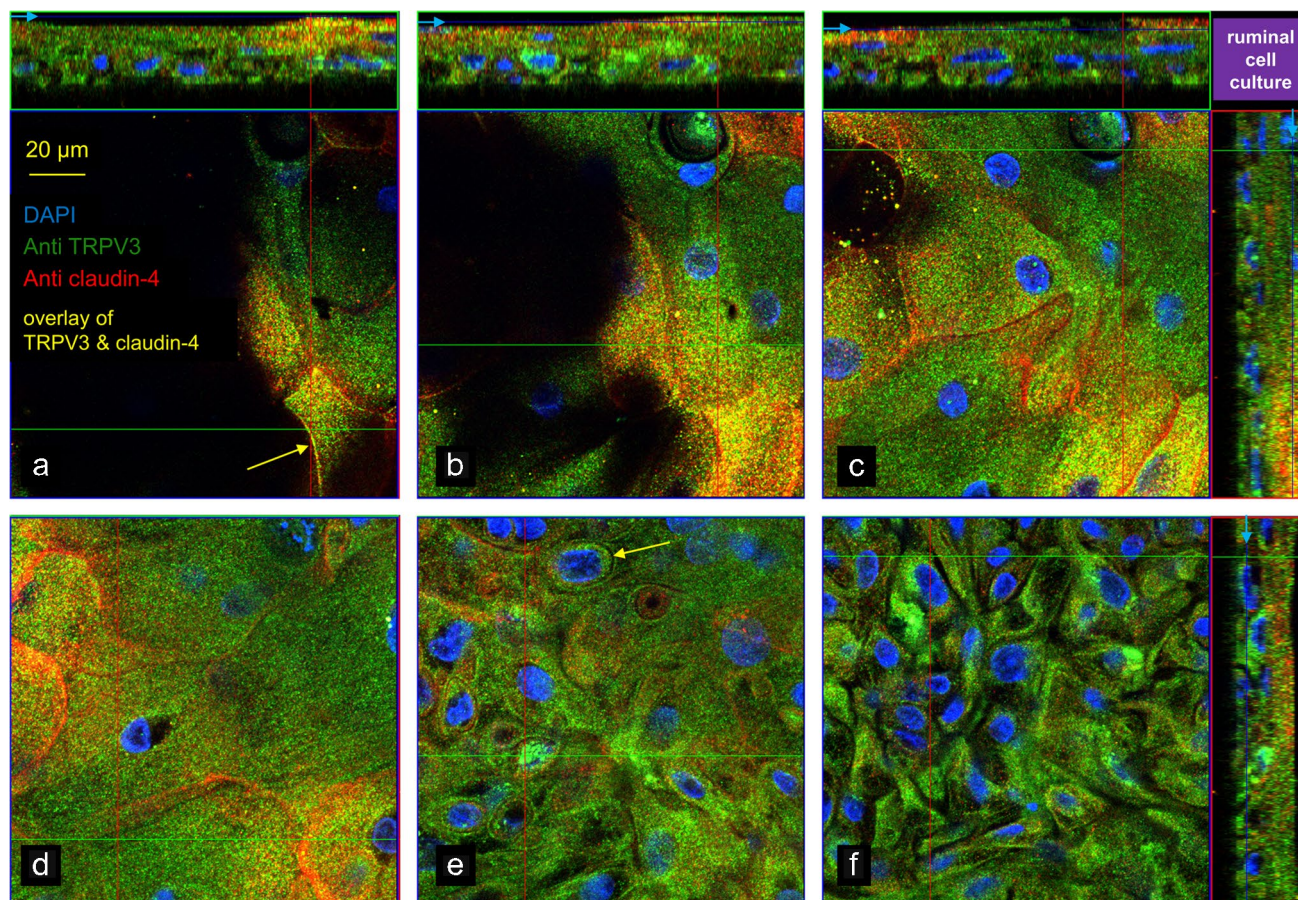
### Functional studies of bovine ruminal epithelium in the Ussing chamber

To screen for functional expression of bTRPV4 in native tissues, Ussing chamber experiments were performed using the specific TRPV4 agonist GSK1016790A [7, 107] in ruminal tissues of 5 cows. To ensure vitality of the tissues, we tested effects of 2-APB in parallel. This is a classical agonist which activates a number of TRP channels including TRPV3, but not TRPV4 [46].

All ruminal tissues were superfused with physiological NaCl Ringer solutions (see methods) and equilibrated until the short-circuit current ( $I_{sc}$ ), and the conductance ( $G_t$ ) levels were stable. Initially, all tissues showed similar  $I_{sc}$  and  $G_t$  (Table 1). Subsequently, either GSK1016790A (0.2 or 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 2-APB (500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), or an equivalent amount of the solvent DMSO (1:1000, control) was added

to the mucosal buffer. At 0.2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GSK1016790A showed no effect ( $n/N = 5/1$ , data not shown). At 2  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GSK1016790A triggered a transient increase in  $I_{sc}$  (“peak”) followed by a decrease and stabilizing at a plateau, while  $G_t$  did not change significantly (Fig. 7 and Table 1). Similar changes in  $I_{sc}$  were visible after application of 2-APB although here,  $G_t$  increased continuously to a plateau level that was significantly higher than initially observed. The effects of 2-APB on  $I_{sc}$  and  $G_t$  are very similar to those observed in a previous study investigating other TRPV3 agonists on ruminal epithelia [78]. Control tissues showed no response (Fig. 7 and Table 1).

Since no chemical gradient was present across the tissues, the increase in  $I_{sc}$  observed after application of these TRP agonists must reflect transcellular transport. Theoretically, the increase in  $I_{sc}$  might involve a tightening of the paracellular pathway. However,  $G_t$  either rose (2-APB) or remained the same (GSK1016790A), so that this explanation can be ruled out. Most likely, the agonists opened apical TRP channels with influx of  $\text{Na}^+$  (and small amounts of  $\text{Ca}^{2+}$ ), leading to the observed  $I_{sc}$  peak. The apical depolarization should



**Fig. 5** Confocal laser microscopy: localization of bTRPV3 and claudin-4 in a multilayered ruminal cell culture. Immunofluorescence staining shows bTRPV3 in green using ABIN, claudin-4 in red using Anti claudin-4 with co-expression of both proteins resulting in a yellow staining, and cell nuclei in blue using DAPI ( $n/N=3/2$ ). At the top and at the right-hand side, z-stack panels can be seen. The blue line and arrows indicate the position at which the section plane in the main panel was taken in **a**, **b**, **c**, and **f**. **a** The view of the top layer of cells showed cytosolic staining for both bTRPV3 and claudin-4, with considerable overlay. In places, co-staining is clearly visible in the

cell membrane (yellow arrow). **b**, **c**, and **d** These images were taken at different points below panel **a**. Note the predominant claudin-4 staining of the cell boundaries, suggesting that membrane expression of bTRPV3 is weak. **e** A step further down, membrane expression of bTRPV3 is visible in some places (yellow arrow), becoming stronger in the cytosol, while claudin-4 is only visible in the cytosol. **f** In the bottom layer of cells, any staining for claudin-4 is rudimentary, while the cytosol continues to show staining for bTRPV3. For more detail, see the film in the [supplement](#)

stimulate efflux of  $K^+$ , leading to the observed  $I_{sc}$  decrease, with current level finally stabilizing at a plateau with equal influx of  $Na^+$  and efflux of  $K^+$ . In the case of 2-APB, the subsequent decrease in  $I_{sc}$  can additionally reflect an opening of the paracellular pathway. In the case of GSK1016790A,  $G_t$  remained the same so that this explanation is not an option.

### Studies of bTRPV4 and bTRPV3 HEK-293 cells in the whole-cell configuration of the patch-clamp technique

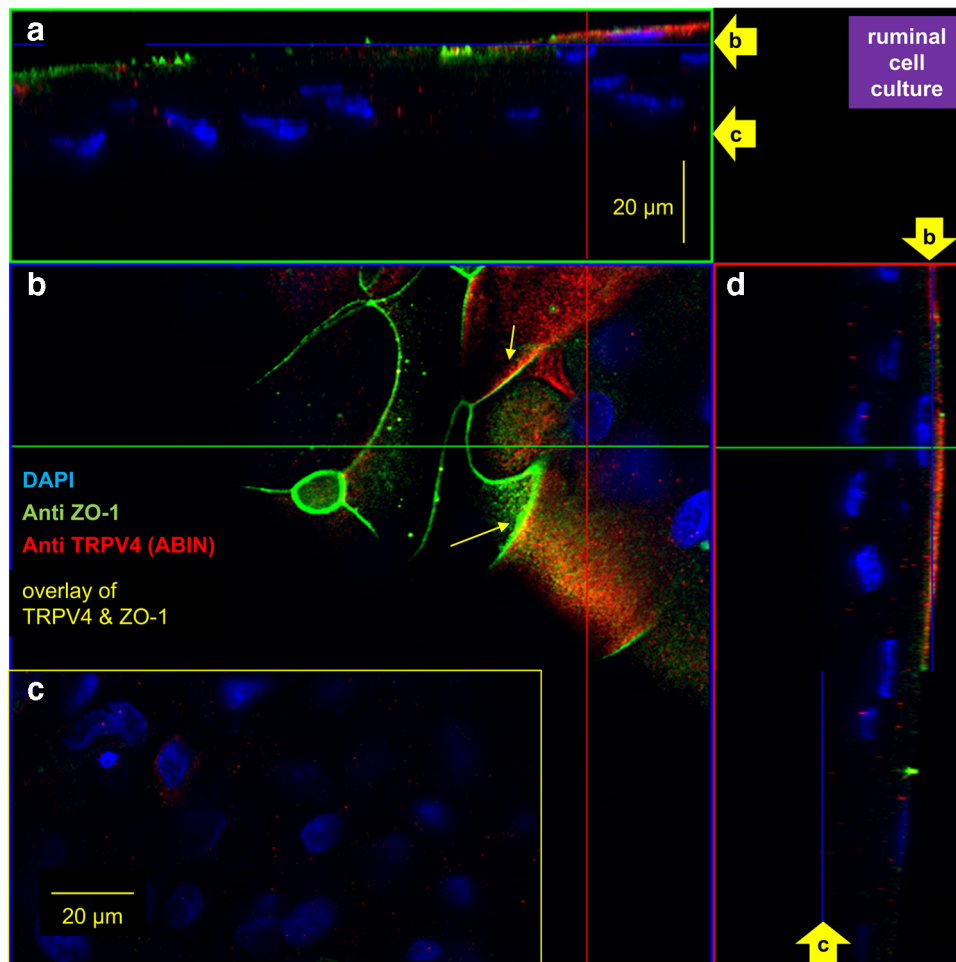
Previous studies from our laboratory suggest a role for bTRPV3 in the ruminal absorption of cations such as  $Na^+$ ,  $NH_4^+$ , and  $Ca^{2+}$  and in the secretion of  $K^+$  [56, 78, 79].

Since bTRPV4 may also contribute, we investigated the properties of this channel in comparison to bTRPV3 in over-expressing HEK-293 cells using the patch-clamp technique.

#### NaCl solution

Functional expression of bTRPV4 by HEK-293 cells was confirmed via patch-clamp experiments with NaGlu in the pipette and in NaCl bath solution applying known TRPV4 modulators ([Supplement, Part D, I](#)) [107]. The concentration of  $Na^+$  was equal on both sides of the membrane with a Nernst equilibrium potential ( $V_{eq}$ ) of 0 mV, while  $Cl^-$  concentrations result in a calculated  $V_{eq}$  of  $-51.05$  mV.

In NaCl, the outward current of bTRPV4 cells was  $24 \pm 12$  pA  $\cdot$  pF $^{-1}$  at a pipette potential of +100 mV, and



**Fig. 6** Confocal laser microscopy: localization of bTRPV4 and ZO-1 in multilayered ruminal cell culture. Immunofluorescence staining shows ZO-1 in green using Anti ZO-1, bTRPV4 in red using ABIN with co-expression of both proteins resulting in a yellow staining, and cell nuclei in blue using DAPI ( $n/N=5/2$ ). Similar images were obtained using the Thermo antibody (not shown,  $n/N=2/1$ ). **a** Cross-section through the preparation (z-stack). The filter is at the bottom of the image, and cells in this location only show staining for cell nuclei. In the top layers, additional staining for bTRPV4 and ZO-1 emerges, with little sign of co-expression. The arrows “b” and “c” at the side

indicate the locations of the section planes (**b**, **c**). **b** View of a slice through the top layer. A number of cells show intense staining for ZO-1, associated with the cell membrane. At the top right, membrane staining for bTRPV4 can be seen. In a few places, discrete co-expression of bTRPV4 and ZO-1 is visible (yellow arrows). The green line shows the localization of the cross-section seen in **a**. **c** View of a slice through the bottom layer. Rudimentary cytosolic staining for bTRPV4 can be seen around the blue cell nuclei. **d** Cross-section along the red line in **a** and **b**. Again, arrows indicate the position of panels **b** and **c**. For more detail, see the film in the [supplement](#)

the inward current was  $-29 \pm 14 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$  at  $-120 \text{ mV}$ , while the reversal potential ( $V_{\text{rev}}$ ) was  $8 \pm 4 \text{ mV}$  ( $n=12$ ). Mean capacitance was  $10.5 \pm 2.1 \text{ pF}$  and the mean series resistance  $8.1 \pm 1.5 \text{ M}\Omega$ . The positive  $V_{\text{rev}}$  argues for a contribution of  $\text{Ca}^{2+}$  to total permeability. The application of GSK1016790A ( $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) led to a significant rise in inward and outward currents. Outward current rose to  $226 \pm 56 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$  at  $+100 \text{ mV}$  ( $p \leq 0.001$ ), and inward current rose to  $-220 \pm 49 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$  ( $p \leq 0.001$ ) at  $-120 \text{ mV}$ , reflecting increases in the efflux and influx of  $\text{Na}^+$ . The  $V_{\text{rev}}$  dropped slightly to  $0.8 \pm 2.3 \text{ mV}$  ( $p=0.042$ ), close to the  $V_{\text{eq}}$  for  $\text{Na}^+$ . Addition of the TRPV4 antagonist GSK2193874 ( $1 \text{ }\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) partially reversed the current

effects. At  $+100 \text{ mV}$ , the current amplitude decreased significantly ( $177 \pm 34 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ ;  $p=0.04$ ), while at  $-120 \text{ mV}$ , the decrease was just numerical ( $-176 \pm 32 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ ;  $p=0.11$ ).  $V_{\text{rev}}$  did not change ( $p=0.3$ ). Washout in NaCl was partial, with currents at  $148 \pm 30 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$  (at  $+100 \text{ mV}$ ) and  $-159 \pm 34 \text{ pA} \cdot \text{pF}^{-1}$  (at  $-120 \text{ mV}$ ), while  $V_{\text{rev}}$  remained at  $1 \pm 4 \text{ mV}$  ( $p=0.6$ ).

#### ***NH<sub>4</sub>Cl* solution**

To test for permeability of bTRPV4 to  $\text{NH}_4^+$ , HEK-293 cells expressing bTRPV4, bTRPV3, and controls were investigated in parallel (Table 2), again using a NaGlu pipette



**Table 1** Ussing chamber measurements: native bovine ruminal epithelium. Tissues were treated with either 2-APB ( $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), GSK1016790A ( $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), or an equivalent amount of solvent (control, 1:1000). Data are given as means  $\pm$  SEM. The values in the “untreated” column reflect the short-circuit current ( $I_{\text{sc}}$ ) and the transcellular conductance ( $G_t$ ) measured 10 min prior to addition of the agonist. The maximum  $I_{\text{sc}}$  in the 15-min interval after treatment is given in the “peak” column. The “60-min” column gives  $I_{\text{sc}}$  and  $G_t$  measured 60 min after each addition. Superscripts within a row indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) within one experimental group. The  $p$  values below reflect the results comparing all groups (ANOVA), followed by pairwise testing. The number of tissues are indicated by  $n$  and the number of cattle by  $N$

$I_{\text{sc}}$ ( $\text{mEq} \cdot \text{cm}^{-2} \cdot \text{h}^{-1}$ )				
Treatment	Untreated	Peak	60 min	$n/N$
GSK1016790A	$2.2 \pm 0.6^a$	$7.8 \pm 1.7^b$	$-1.4 \pm 0.6^c$	17/4
2-APB	$4.8 \pm 0.9^a$	$7.0 \pm 1.2^b$	$1.4 \pm 0.9^c$	19/5
ctrl	$2.6 \pm 0.8^a$	$2.8 \pm 0.8^a$	$2.6 \pm 0.8^a$	16/5
	$p_1$	$p_2$	$p_3$	
ANOVA	0.12	0.016	0.002	
GSK vs ctrl	0.6	0.011	$\leq 0.001$	
2-APB vs ctrl	0.2	0.015	0.3	
2-APB vs GSK	0.05	0.9	0.016	
$G_t$ ( $\text{mS} \cdot \text{cm}^{-2}$ )				
Treatment	Untreated	(No peak)	60 min	$n/N$
GSK1016790A	$10.6 \pm 0.6^a$		$10.7 \pm 0.7^a$	17/4
2-APB	$10.0 \pm 0.7^a$		$11.0 \pm 0.7^b$	19/5
ctrl	$10.2 \pm 0.8^a$		$9.9 \pm 0.7^a$	16/5
	$p_1$		$p_3$	
ANOVA	0.7		0.4	
GSK vs ctrl	0.6		0.6	
2-APB vs ctrl	0.9		0.16	
2-APB vs GSK	0.4		0.5	

solution, and superfused with NaCl and then  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bath solutions (Supplement, Part D, II). Stimulation switched between the pulse protocols I (Fig. 8e) and II (Fig. 9d), with the latter merged to yield Figs. 9a, b, and c.

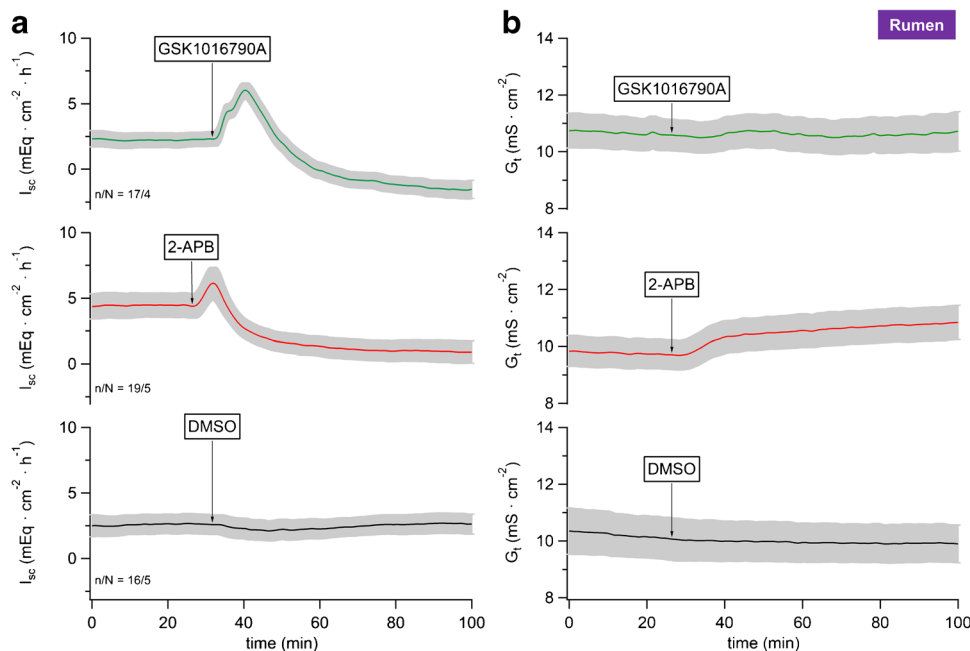
Currents of bTRPV4 cells were outwardly rectifying in NaCl and in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution (Fig. 8f), most likely reflecting block by extracellular  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  [71]. In all three groups, inward currents (at  $-120 \text{ mV}$ ) increased in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  with a rise of  $V_{\text{rev}}$  (Fig. 8 and 9, Table 2), reflecting influx of  $\text{NH}_4^+$ . The increase in outward current (at  $+100 \text{ mV}$ ) should reflect efflux of  $\text{Na}^+$  and/or influx of  $\text{Cl}^-$  induced by swelling, pH changes, or the classical stimulatory effect of a permeant ion on channel conductance [40].

Differences between the groups became significant after application of GSK1016790A ( $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  bath. Both inward and outward currents of bTRPV4 cells rose significantly in contrast to those of control or bTRPV3 cells (Fig. 8c, f, Fig. 9). Some bTRPV4 cells responded strongly to the TRPV4 antagonist GSK2193874 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Fig. 8d, f, 9a), but overall, effects were limited and did not test for significance (Table 2). Possibly, ongoing activation of current by  $\text{NH}_4\text{Cl}$  obscured the GSK2193874 effect. Partial washout could be observed.

After the first solution change,  $V_{\text{rev}}$  of bTRPV3 cells was significantly higher than that of bTRPV4 cells or controls, the latter not having been previously observed [79]. A possible reason might be the absence of  $\text{Mg}^{2+}$  in the pipette solution of our current study, leading to a higher influx of  $\text{Ca}^{2+}$ .

In all groups, the permeability of  $\text{NH}_4^+$  was greater than that of  $\text{Na}^+$  (Table 2; for calculation, see Supplement, Part F). This suggests involvement of poorly selective channels with permeability determined by the energy required for the

**Fig. 7** Ussing chamber measurements: native bovine ruminal epithelium. The mean  $I_{\text{sc}}$  (a) and the corresponding  $G_t$  (b) were plotted over time, both  $\pm$  SEM (grey). After  $\sim 30 \text{ min}$ , the agonists GSK1016790A (green,  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 2-APB (red,  $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), or an equivalent amount of solvent DMSO (black) were applied. The number of tissues ( $n$ ) and the number of animals ( $N$ ) are indicated in the figure. An rise in  $I_{\text{sc}}$  reflects an increase in cations transported from the mucosal to the serosal side



**Table 2** Whole-cell recordings: bTRPV3, bTRPV4, and control HEK-293 cells in  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution. bTRPV4 (V4), bTRPV3 (V3), and control (ctrl) HEK-293 cells were filled with a NaGlu pipette solution and superfused with solutions (Supplement, Part D, II) to which GSK1016790A (“GSK”,  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and GSK2193874 (“Anta”,  $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) were added (left column). The numbers in parentheses indicate consecutive applications of the same solution. Data are given as means  $\pm$  SEM. The superscripts indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) within each group or column. The  $p$  values obtained via ANOVA (all three groups) and via pairwise testing between the groups are given in the subsequent columns. The number of cells ( $n$ ) in each group is given in the column headings. Positive currents reflect cations flowing out of the cell into the bath solution

NaGlu pipette/ bath	bTRPV4 ( $n=10$ )	Control ( $n=8$ )	bTRPV3 ( $n=7$ )	ANOVA (all)	$p_1$ V4/ctrl	$p_2$ V4/V3	$p_3$ V3/ctrl
Current density at +100 mV ( $\text{pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ )							
NaCl (1)	$48 \pm 19^a$	$17 \pm 5^a$	$9 \pm 3^a$	0.3	0.9	0.27	0.13
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (1)	$58 \pm 20^b$	$32 \pm 7^b$	$17 \pm 3^b$	0.4	0.9	0.5	0.1
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{GSK}$	$286 \pm 68^c$	$33 \pm 7^b$	$20 \pm 4^b$	0.002	0.009	0.004	0.1
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Anta}$	$271 \pm 63^c$	$38 \pm 8^c$	$23 \pm 5^b$	0.001	0.007	0.003	0.13
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (2)	$279 \pm 65^c$	$39 \pm 9^c$	$28 \pm 7^c$	0.003	0.007	0.005	0.4
NaCl (2)	$224 \pm 49^d$	$29 \pm 8^b$	$22 \pm 7^b$	0.005	0.011	0.007	0.4
Current density at –120 mV ( $\text{pA} \cdot \text{pF}^{-1}$ )							
NaCl (1)	$-47 \pm 20^a$	$-17 \pm 6^a$	$-7.5 \pm 2.6^a$	0.5	0.7	0.27	0.4
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (1)	$-64 \pm 24^a$	$-29 \pm 9^b$	$-13 \pm 4^b$	0.5	0.8	0.4	0.4
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{GSK}$	$-332 \pm 80^b$	$-32 \pm 10^b$	$-16 \pm 5^c$	0.004	0.009	0.007	0.24
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Anta}$	$-315 \pm 75^b$	$-38 \pm 11^b$	$-16 \pm 5^c$	0.004	0.011	0.007	0.16
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (2)	$-322 \pm 77^b$	$-39 \pm 12^b$	$-21 \pm 6^d$	0.005	0.011	0.007	0.4
NaCl (2)	$-232 \pm 55^c$	$-30 \pm 9^b$	$-17 \pm 8^b$	0.007	0.015	0.01	0.29
Reversal potential (mV)							
NaCl (1)	$-5 \pm 9^a$	$-7 \pm 5^a$	$13 \pm 10^a$	0.3	0.7	0.3	0.13
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (1)	$5 \pm 7^a$	$8 \pm 4^b$	$26 \pm 6^a$	0.04	0.7	0.04	0.014
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{GSK}$	$3.0 \pm 2.3^a$	$11 \pm 4^b$	$25 \pm 5^a$	0.005	0.12	0.005	0.08
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{Anta}$	$3.6 \pm 2.2^a$	$11 \pm 4^b$	$24 \pm 5^a$	0.003	0.2	0.002	0.08
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (2)	$3.3 \pm 2.4^a$	$11 \pm 3^b$	$22 \pm 4^a$	0.004	0.3	0.004	0.04
NaCl (2)	$-10 \pm 4^b$	$0 \pm 3^a$	$11 \pm 6^b$	0.022	0.2	0.013	0.13
Relative permeability ratio $p(\text{NH}_4^+)/p(\text{Na}^+)$							
$\text{NH}_4\text{Cl}$ (1)	$1.6 \pm 0.2^a$	$2.0 \pm 0.4^a$	$2.0 \pm 0.5^a$	0.7	0.4	0.6	0.9
$\text{NH}_4\text{Cl} + \text{GSK}$	$2.1 \pm 0.7^a$	$2.3 \pm 0.6^a$	$2.0 \pm 0.5^a$	0.5	0.17	0.7	0.7

removal of the hydration shell of the permeating cations [73]. In the case of bTRPV3, data were in good agreement with the ratio that can be calculated from the single-channel conductance for  $\text{NH}_4^+$  ( $\sim 240 \text{ pS}$ ) and  $\text{Na}^+$  ( $\sim 128 \text{ pS}$ ) from a previous inside-out patch-clamp study [56, 79].

In conjunction, bTRPV4 channels conduct  $\text{Na}^+$ , but have an even higher permeability to  $\text{NH}_4^+$ . Furthermore, the TRPV4 agonist GSK1016790A strongly stimulated bTRPV4, but had no effects on bTRPV3 or control cells, which is not trivial.

### K-Gluconate pipette solution

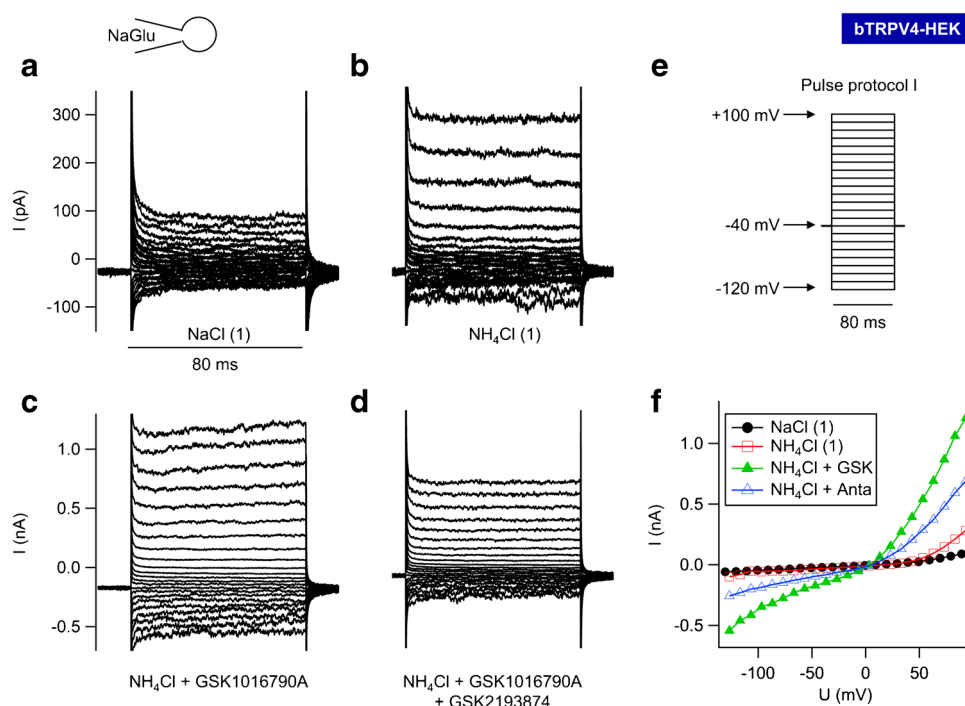
The Ussing chamber experiments suggest that GSK1016790A ( $2 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and 2-APB ( $500 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) stimulated not only influx of  $\text{Na}^+$  but also efflux of  $\text{K}^+$ , resulting in a biphasic  $I_{\text{sc}}$  response. To test this hypothesis, whole-cell experiments with a KGlu pipette solution were performed with HEK-293 cells that overexpressed bTRPV3 or bTRPV4 (Fig. 10, Table 3). In addition to KGlu, the pipette solution contained  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ , and ATP (Supplement, Part D, III).

Currents in bTRPV4 cells were significantly higher than in control or bTRPV3 cells even before application of an

agonist (Table 3), possibly due to inclusion of ATP in the pipette solution [74]. GSK1016790A ( $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) significantly enhanced bTRPV4 currents at both positive and negative potentials with subsequent washout, while 2-APB ( $300 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) stimulated bTRPV3 currents. No effects were seen in the two control groups, which did not differ from each other ( $p > 0.3$ ). In a previous study, agonist induced responses were decreased by NaGlu [74]. This could not be confirmed, most likely because TRP channels typically respond more strongly to the second application of an agonist than to its primary application [57, 60, 74]. In our experiments, the effects in NaGlu strongly suggest that both agonists stimulate efflux of  $\text{K}^+$  rather than influx of  $\text{Cl}^-$ . Furthermore, replacement of  $\text{Cl}^-$  by the poorly permeable gluconate $^-$  made it possible to estimate the relative permeability ratio for  $\text{K}^+$  relative to  $\text{Na}^+$  (Table 3). As expected of non-selective cation channels, the overexpressing cells were significantly less able to discriminate between  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  than the controls.

### Butyrate $^-$ solutions

Microbial fermentation of plant material within the rumen releases large quantities of short-chain fatty acids (SCFA),



**Fig. 8** Whole-cell recording: bTRPV4 HEK-293 cell exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution. This experiment was performed with a NaGlu pipette solution and stimulated by the pulse protocol I (e). **a** Currents in NaCl bath solution. **b** A switch to extracellular  $\text{NH}_4\text{Cl}$  led to an enhanced current response at negative potentials (influx of  $\text{NH}_4^+$ ) and positive potentials (efflux of  $\text{Na}^+$ ). **c** GSK1016790A ( $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) led to a significant increase in both inward and outward currents. Note

the larger scaling. **d** Application of GSK2193874 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in continued presence of GSK1016790A partially reduced current level. **f** Current–voltage plot of the traces in **a** to **d**. Currents after stimulation with GSK1016790A (“GSK”, green-filled triangles) were partially reduced after additional application of GSK2193874 (“Anta”, blue blank triangles). Note the outward rectification with much higher currents at  $+100 \text{ mV}$  than at  $-100 \text{ mV}$

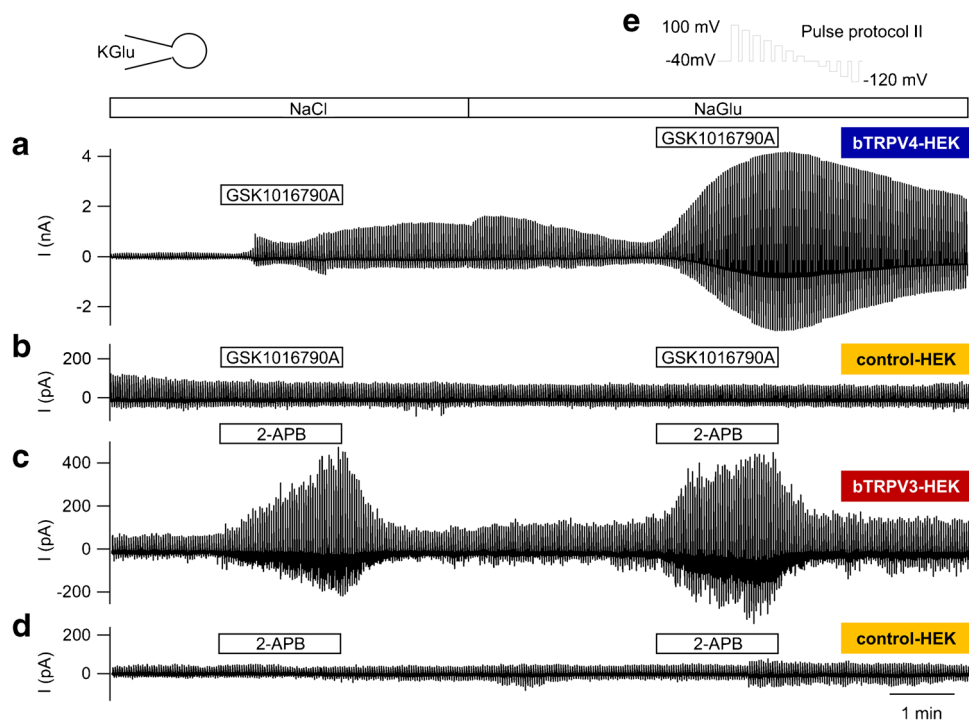
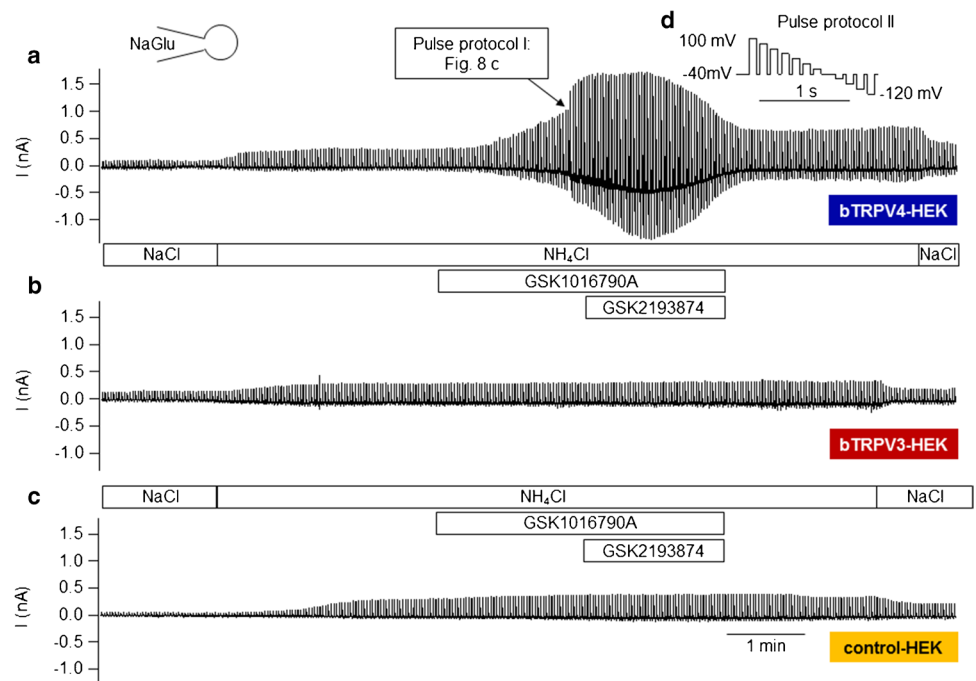
which stimulate the transport of  $\text{Na}^+$  across native ruminal epithelia as shown in Ussing chamber experiments [2, 103]. This involves stimulation of an electroneutral mechanism ( $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange), but also stimulation of an electrogenic pathway [55], with the increase in  $I_{\text{sc}}$  reduced by concomitant activation of an  $\text{H}^+$ -ATPase [52]. Furthermore, SCFA stimulate transport of ammonia [12, 13], and in cultured ruminal epithelial cells, we observed stimulation of cation currents by SCFA [33]. Both bTRPV3 and bTRPV4 are potential candidates for these effects. We investigated the response of HEK-293 cells overexpressing bTRPV3, bTRPV4, and controls to application of solutions containing the SCFA sodium butyrate (NaBu) ( $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) [82] at a pH of 7.4 and at the pH of 6.4 that is physiologically found in rumen (Supplement, Part D, IV). Note that when pH drops from 7.4 to 6.4, the amount of protonated butyrate<sup>-</sup> (butyric acid) increases tenfold from 0.25 to 2.45%.

In control and bTRPV4 cells, the effects of NaBu tended to be small and variable (Table 4). After application of NaBu 7.4, a small increase in currents at positive potentials was seen in some bTRPV4 and control cells that persisted after washout with NaCl 7.4 and NaCl 6.4 (Fig. 11). Somewhat surprisingly, the subsequent addition of NaBu 6.4 induced

a reduction of current in these cells (Fig. 11). In bTRPV4 cells, the decrease in inward current tested for significance (Table 4). Conversely, in bTRPV3 cells, a stimulatory effect of butyrate<sup>-</sup> on inward and outward currents could be observed that was highly significant at the more acidic pH, with partial washout (Fig. 12).  $V_{\text{rev}}$  did not change significantly, although for unclear reasons,  $V_{\text{rev}}$  of bTRPV4 cells was higher than  $V_{\text{rev}}$  of controls or bTRPV3 cells, reaching significant  $p$  values in some bath solutions.

In total, 15 bTRPV3 cells survived exposure not only to NaBu 7.4 but also to NaBu 6.4 (Fig. 12). In some cells, pH had no effect on the NaBu response (Fig. 12a), while other cells responded more strongly to the second application at pH 6.4 (Fig. 12c). The butyrate<sup>-</sup>-activated currents showed strong outward rectification (Fig. 12b, 13c), time-dependent activation, and pronounced tail currents (Fig. 13b), most likely reflecting the effects of a voltage-dependent block by divalent cations. Since the greater effects of NaBu 6.4 might be due to the prior stimulation of bTRPV3 as observed above for 2-APB, further 7 cells were directly exposed to NaCl 6.4 and NaBu 6.4 without pretreatment. Compared to the 17 cells initially exposed to NaBu 7.4, effects of NaBu were greater at pH 6.4 than at pH 7.4 (Fig. 12d).

**Fig. 9** Whole-cell recordings: bTRPV3, bTRPV4, and control HEK-293 cells exposed to  $\text{NH}_4\text{Cl}$  solution. Experiments were performed with a NaGlu pipette solution. Shown are the merged original recordings of bTRPV4 (**a**, same cell as in Fig. 8), bTRPV3 (**b**), and control HEK-293 cells (**c**) obtained by stimulating the cells with pulse protocol II (**d**). Intermittently, pulse protocol I (Fig. 8e) was applied, occasionally leading to visible gaps (arrow in **a**). Bath solutions are indicated by the bars. GSK1016790A ( $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) stimulates currents of bTRPV4 cells, with inhibitory effects of GSK2193874 ( $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Cells expressing bTRPV3 or controls show a conductance to  $\text{NH}_4^+$ , but were not affected by GSK1016790A



**Fig. 10** Whole-cell recordings: bTRPV3, bTRPV4, and control HEK-293 cells filled with K-Gluconate solution. Experiments were performed with a KGlu pipette solution and initial in a NaCl bath. Shown are the merged original recordings of bTRPV4 (**a**), control (**b**), bTRPV3 (**c**), and control HEK-293 cells (**d**) obtained by stimulating the cells with protocol II (**e**). To rule out a possible participa-

tion of  $\text{Cl}^-$  in the response, cells were superfused with NaGlu solution in the latter half of the experiment, as indicated by the bar at the top. bTRPV4 HEK-293 cells showed a pronounced response after exposition to GSK1016790A (**a**) in contrast to unresponsive controls (**b**), requiring a different scale. Using 2-APB, bTRPV3 currents were significantly stimulated (**c**) in contrast to controls (**d**)

**Table 3** Whole-cell recordings: bTRPV3, bTRPV4, and control HEK-293 cells filled with K-Gluconate pipette solution Cells were filled with a KGlu pipette solution and superfused with various solutions (Supplement, Part D, III) to which GSK1016790A (50 nmol · L) and 2-APB (300 μmol · L) were added as indicated in the left column. All else is essentially presented as in Table 2

Pipette KGlu Bath	bTRPV4 (n = 10)	control (n = 8)	p <sub>1</sub> V4/ctrl	p <sub>2</sub> V3/V4	bTRPV3 (n = 10)	control V3/ctrl	p <sub>3</sub> V3/ctrl	ANOVA (all)
Current density at +100 mV (pA · pF <sup>-1</sup> )								
NaCl (1)	33 ± 9 <sup>a</sup>	10 ± 4 <sup>a</sup>	0.007	0.006	10.3 ± 2.4 <sup>a</sup>	11.5 ± 2.9 <sup>a</sup>	0.8	0.008
NaCl + agonist	GSK1016790A				2-APB			
	178 ± 45 <sup>b</sup>	9 ± 3 <sup>a</sup>	≤ 0.001	0.004	52 ± 20 <sup>b</sup>	11 ± 4 <sup>a</sup>	0.009	≤ 0.001
NaCl (2)	168 ± 33 <sup>b</sup>	9.1 ± 2.7 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	17 ± 7 <sup>a</sup>	13 ± 5 <sup>a</sup>	0.28	≤ 0.001
NaGlu (1)	105 ± 11 <sup>c</sup>	10 ± 3 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	21 ± 7 <sup>a</sup>	13 ± 6 <sup>a</sup>	0.13	≤ 0.001
NaGlu + agonist	GSK1016790A				2-APB			
	555 ± 109 <sup>d</sup>	11 ± 4 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	87 ± 29 <sup>c</sup>	14 ± 6 <sup>a</sup>	0.004	≤ 0.001
NaGlu (2)	473 ± 63 <sup>d</sup>	11 ± 4 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	57 ± 29 <sup>b</sup>	16 ± 6 <sup>a</sup>	0.08	≤ 0.001
NaCl (3)	193 ± 28 <sup>c</sup>	9.8 ± 2.7 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	38 ± 17 <sup>a</sup>	19 ± 8 <sup>a</sup>	0.22	≤ 0.001
Current density at -120 mV (pA · pF <sup>-1</sup> )								
NaCl (1)	-33 ± 9 <sup>a</sup>	-4.6 ± 1.5 <sup>a</sup>	0.001	0.003	-6.5 ± 1.9 <sup>a</sup>	-5.4 ± 2.3 <sup>a</sup>	0.4	0.001
NaCl + agonist	GSK1016790A				2-APB			
	-129 ± 37 <sup>b</sup>	-5.1 ± 2.0 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	-14 ± 5 <sup>a</sup>	-6.9 ± 2.8 <sup>a</sup>	0.11	≤ 0.001
NaCl (2)	-98 ± 23 <sup>c</sup>	-4.5 ± 1.7 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	-12 ± 5 <sup>a</sup>	-8 ± 4 <sup>a</sup>	0.28	≤ 0.001
NaGlu (1)	-73 ± 11 <sup>d</sup>	-5.1 ± 2.1 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	-14 ± 6 <sup>a</sup>	-7 ± 4 <sup>a</sup>	0.05	≤ 0.001
NaGlu + agonist	GSK1016790A				2-APB			
	-387 ± 88 <sup>e</sup>	-5.3 ± 1.9 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	-55 ± 26 <sup>b</sup>	-8 ± 4 <sup>a</sup>	0.013	≤ 0.001
NaGlu (2)	-280 ± 41 <sup>f</sup>	-5.2 ± 1.7 <sup>a</sup>	≤ 0.001	≤ 0.001	-21 ± 8 <sup>a</sup>	-8 ± 4 <sup>a</sup>	0.012	≤ 0.001
NaGlu (3)	-211 ± 81 <sup>g</sup>	-5.3 ± 1.7 <sup>a</sup>	≤ 0.001	0.002	-30 ± 15 <sup>a</sup>	-8 ± 4 <sup>a</sup>	0.014	≤ 0.001
Reversal potential (mV)								
NaCl (1)	-5.2 ± 2.4 <sup>a</sup>	-25 ± 4 <sup>a</sup>	≤ 0.001	0.05	-19 ± 6 <sup>a</sup>	0.30 ± 6 <sup>a</sup>	0.25	0.001
NaCl + agonist	GSK1016790A				2-APB			
	-3.4 ± 1.6 <sup>a</sup>	-27 ± 5 <sup>a</sup>	≤ 0.001	0.22	-7.7 ± 2.8 <sup>b</sup>	-26 ± 7 <sup>a</sup>	0.004	≤ 0.001
NaCl (2)	-2.3 ± 1.1 <sup>b</sup>	-25 ± 5 <sup>a</sup>	≤ 0.001	0.026	-15 ± 4 <sup>a</sup>	-25 ± 5 <sup>a</sup>	0.13	≤ 0.001
NaGlu (1)	-2.8 ± 1.5 <sup>b</sup>	-23 ± 5 <sup>a</sup>	0.001	0.06	-10 ± 4 <sup>b</sup>	-23 ± 3 <sup>a</sup>	0.014	≤ 0.001
NaGlu + agonist	GSK1016790A				2-APB			
	-6.2 ± 1.5 <sup>a</sup>	-21 ± 5 <sup>b</sup>	0.006	1.0	-6 ± 2 <sup>b</sup>	-20 ± 4 <sup>a</sup>	0.003	≤ 0.001
NaGlu (2)	-6.1 ± 1.4 <sup>a</sup>	-20 ± 5 <sup>b</sup>	0.006	0.5	-9 ± 4 <sup>b</sup>	-23 ± 4 <sup>a</sup>	0.013	0.001
NaCl (3)	-7.1 ± 1.8 <sup>a</sup>	-24 ± 5 <sup>a</sup>	≤ 0.001	0.4	-10 ± 4 <sup>a</sup>	-29 ± 5 <sup>a</sup>	0.013	≤ 0.001
Relative permeability ratio p(NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> )/p(Na <sup>+</sup> )								
NaGlu (1)	1.23 ± 0.08 <sup>a</sup>	3.1 ± 0.7 <sup>a</sup>	0.001	0.06	1.72 ± 0.21 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.014	≤ 0.001
NaGlu + agonist	GSK1016790A				2-APB			
	1.4 ± 0.1 <sup>b</sup>	3.0 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.006	0.8	1.36 ± 0.11 <sup>a</sup>	2.8 ± 0.6 <sup>a</sup>	0.002	≤ 0.001
NaGlu (2)	1.40 ± 0.09 <sup>b</sup>	2.9 ± 0.7 <sup>b</sup>	0.006	0.7	1.58 ± 0.22 <sup>a</sup>	2.9 ± 0.4 <sup>a</sup>	0.007	≤ 0.001

**Table 4** Whole-cell recording: bTRPV3, bTRPV4, and control HEK-293 cells in butyrate<sup>-</sup> solution. bTRPV3 (V3), bTRPV4 (V4), and control (ctrl) HEK-293 cells were filled with a NaGlu pipette solution and superfused with solutions as indicated in left column (Supplement, Part D, IV) in order to investigate the effect of NaBu (30 mmol · L<sup>-1</sup>) at pH 7.4 and pH 6.4. The numbers in parentheses indicate consecutive applications of the same solution. The data represent means ± SEM. The superscripts indicate significant differences ( $p \leq 0.05$ ) within each group or column. The  $p$  values obtained via ANOVA (all three groups) and via pairwise testing between the groups are given in the last four columns. The number of cells ( $n$ ) is given in the rows above each subset of data

NaGlu pipette/ bath, pH	bTRPV4	control	bTRPV3	$p_1$ V4/ctrl	$p_2$ V4/V3	$p_3$ V3/ctrl	ANOVA (all)
Current density at +100 mV (pA · pF <sup>-1</sup> )							
	n = 12	n = 22	n = 17				
NaCl 7.4 (1)	5.8 ± 1.7 <sup>a</sup>	7.2 ± 1.8 <sup>a</sup>	5.3 ± 1.2 <sup>a</sup>	1.0	0.7	0.6	0.4
NaBu 7.4	6.1 ± 1.3 <sup>a</sup>	21 ± 11 <sup>a</sup>	17 ± 5 <sup>b</sup>	0.5	0.4	0.9	0.4
NaCl 7.4 (2)	7.8 ± 1.3 <sup>a</sup>	17 ± 9 <sup>a</sup>	11.1 ± 2.7 <sup>b</sup>	0.6	0.9	0.7	0.5
	n = 11	n = 21	n = 22				
NaCl 6.4 (1)	8.7 ± 2.6 <sup>a</sup>	17 ± 7 <sup>a</sup>	9.1 ± 1.2 <sup>b</sup>	0.19	0.5	0.6	0.26
NaBu 6.4	5.9 ± 2.2 <sup>a</sup>	9.9 ± 2.1 <sup>a</sup>	61 ± 13 <sup>c</sup>	0.18	≤ 0.001	≤ 0.001	0.026
NaCl 6.4 (2)	4.8 ± 1.7 <sup>b</sup>	9.5 ± 2.6 <sup>a</sup>	51 ± 14 <sup>b</sup>	0.5	0.002	0.007	0.20
Current density at -120 mV (pA · pF <sup>-1</sup> )							
	n = 12	n = 22	n = 17				
NaCl 7.4 (1)	-6.1 ± 1.6 <sup>a</sup>	-6.5 ± 1.5 <sup>a</sup>	-4.7 ± 1.1 <sup>a</sup>	0.8	0.26	0.23	0.9
NaBu 7.4	-5.5 ± 1.4 <sup>b</sup>	-9.3 ± 2.7 <sup>a</sup>	-7.9 ± 2.3 <sup>a</sup>	0.25	1.0	0.29	0.6
NaCl 7.4 (2)	-5.7 ± 1.3 <sup>b</sup>	-7.8 ± 1.9 <sup>a</sup>	-5.6 ± 1.3 <sup>a</sup>	0.4	0.7	0.28	0.9
	n = 11	n = 21	n = 22				
NaCl 6.4 (1)	-4.2 ± 1.3 <sup>c</sup>	-7.6 ± 2.1 <sup>a</sup>	-5.3 ± 0.9 <sup>a</sup>	0.13	0.23	0.5	0.5
NaBu 6.4	-4.1 ± 1.3 <sup>d</sup>	-5.4 ± 1.0 <sup>a</sup>	-21 ± 10 <sup>b</sup>	0.17	0.014	0.1	≤ 0.001
NaCl 6.4 (2)	-4.1 ± 1.4 <sup>d</sup>	-7.0 ± 2.0 <sup>a</sup>	-18 ± 7 <sup>a</sup>	0.18	0.09	0.6	0.002
Reversal potential (mV)							
	n = 12	n = 22	n = 17				
NaCl 7.4 (1)	19 ± 7 <sup>a</sup>	6 ± 6 <sup>a</sup>	-5 ± 9 <sup>ab</sup>	0.19	0.08	0.5	0.19
NaBu 7.4	22 ± 5 <sup>a</sup>	3 ± 5 <sup>a</sup>	-6 ± 9 <sup>b</sup>	0.012	0.016	0.17	0.012
NaCl 7.4 (2)	22 ± 5 <sup>a</sup>	7 ± 5 <sup>a</sup>	-2 ± 9 <sup>ab</sup>	0.05	0.05	0.4	0.28
	n = 11	n = 21	n = 22				
NaCl 6.4 (1)	17 ± 7 <sup>a</sup>	7 ± 7 <sup>a</sup>	-2 ± 7 <sup>a</sup>	0.4	0.05	0.5	0.18
NaBu 6.4	20 ± 8 <sup>a</sup>	12 ± 10 <sup>a</sup>	0 ± 5 <sup>a</sup>	0.7	0.006	0.5	0.10
NaCl 6.4 (2)	16 ± 9 <sup>a</sup>	2 ± 9 <sup>a</sup>	3 ± 6 <sup>a</sup>	0.16	0.14	0.8	0.26

A possible hypothesis is that influx of butyric acid caused volume changes. However, the capacitance of cells expressing bTRPV3 dropped slightly during the application of butyrate<sup>-</sup>, with values at 14.8<sup>a</sup> ± 1.7 pF (NaCl 7.4), 14.6<sup>a</sup> ± 1.7 pF (NaBu 7.4), 14.5<sup>b</sup> ± 1.7 pF (NaCl 7.4) for  $n = 17$ , 14.9<sup>c</sup> ± 1.5 pF (NaCl 6.4), 13.2<sup>c</sup> ± 1.0 pF (NaBu 6.4), and 12.7<sup>c</sup> ± 1.0 pF (NaCl 6.4) for  $n = 22$ , where different superscripts designate significant differences (ANOVA on ranks). Values for control cells (in pF and same order as above) are 12.4<sup>a</sup> ± 1.7, 12.4<sup>a</sup> ± 1.6, 12.2<sup>a</sup> ± 1.6 (for  $n = 22$ ), 12.9<sup>b</sup> ± 1.7, 13.1<sup>b</sup> ± 1.6, and 12.9<sup>c</sup> ± 1.6 (for  $n = 21$ ). Most likely, back flux into the pipette prevented any cell swelling, and the changes are spurious.

The capacitances of bTRPV4 cells were marginally lower ( $p \leq 0.05$ , ANOVA on ranks) than those of bTRPV3 cells or controls ( $p > 0.2$ , controls versus bTRPV3), with a slight tendency to rise during the experiment (9.1<sup>a</sup> ± 1.0, 9.1<sup>a</sup> ± 1.0, 8.9<sup>a</sup> ± 0.9 for  $n = 12$ , 9.4<sup>b</sup> ± 0.7, 9.4<sup>c</sup> ± 0.7, 9.2<sup>b</sup> ± 0.7 for  $n = 11$ ). Most likely, this difference is spurious although it is also tempting to speculate that the outstanding ability of TRPV4 to sense changes in cell volume played a role [99].

Volume regulation might also have influenced the very variable outcomes of experiments on individual cells.

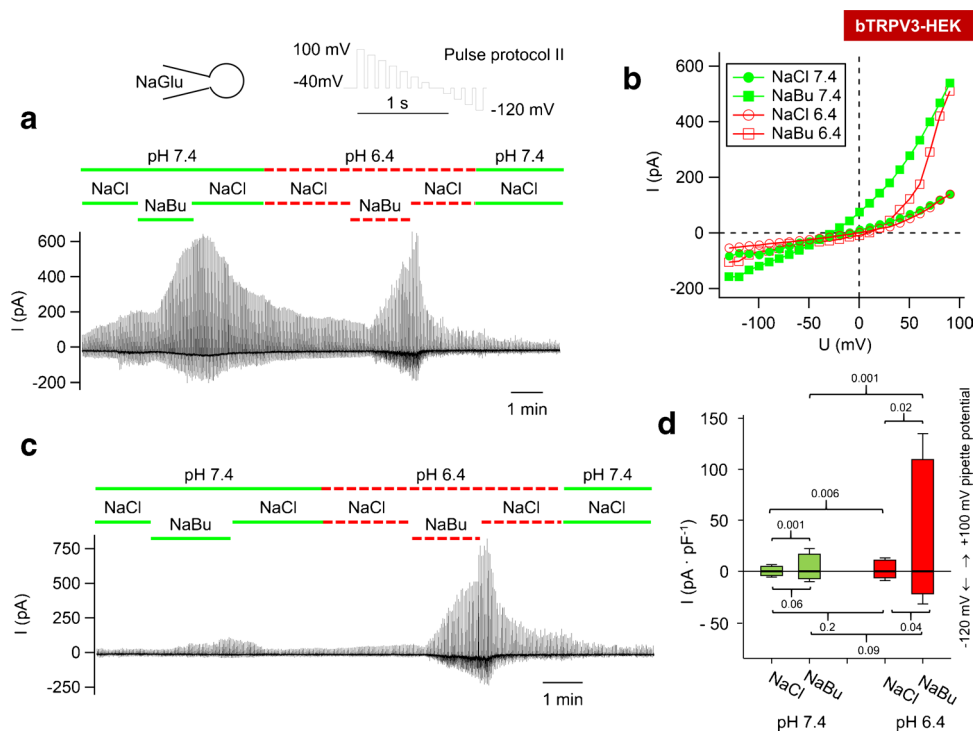
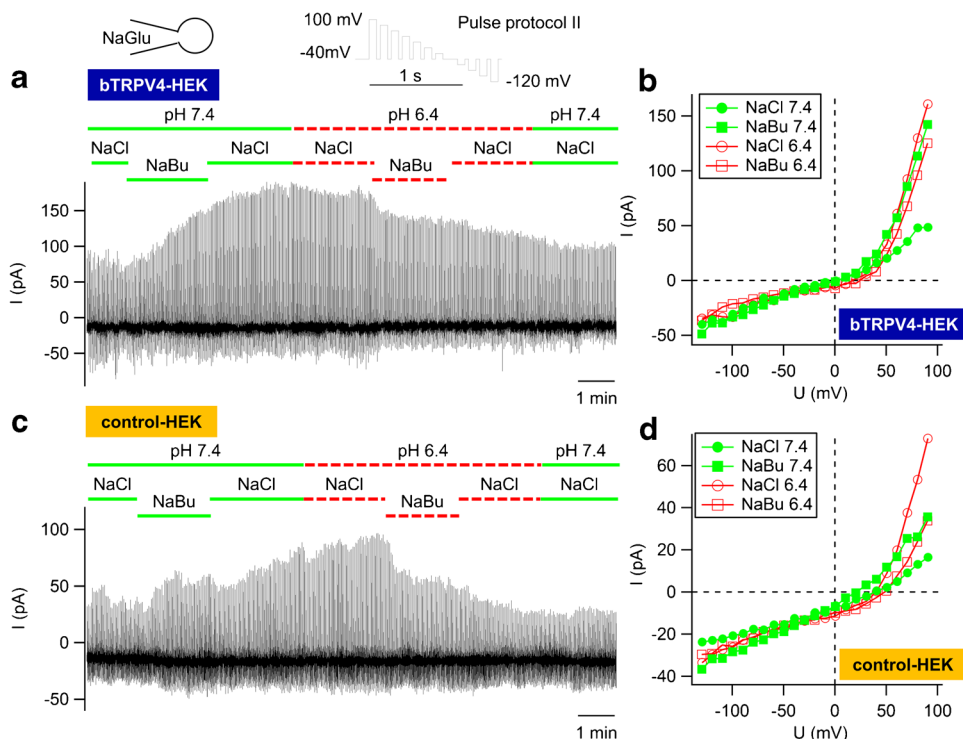
### Effect of butyrate<sup>-</sup> on intracellular Ca<sup>2+</sup> ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>)

SCFA stimulate the ruminal absorption of Ca<sup>2+</sup> in vitro and in vivo [82, 83, 104, 110]. To investigate possible uptake mechanisms, HEK-293 cells transfected with p5TO-*bTRPV4*, p5TO-*bTRPV3*, or the empty p5TO vector (controls) were examined using an intracellular calcium fluorescence imaging technique allowing measurements on single cells. The solutions had a pH of 6.4 and were otherwise identical to those above (Supplement, Part D, IV).

In initial NaCl 6.4, all three groups showed similar [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, suggesting efficient mechanisms for regulating Ca<sup>2+</sup> influx and efflux (Fig. 14, Table 5). Significant [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> increases were observed in all three groups after exposure to NaBu 6.4. However, effects were significantly higher in bTRPV3 and bTRPV4

**Fig. 11** Whole-cell recordings: bTRPV4 and control HEK-293 cells in butyrate<sup>-</sup> solution.

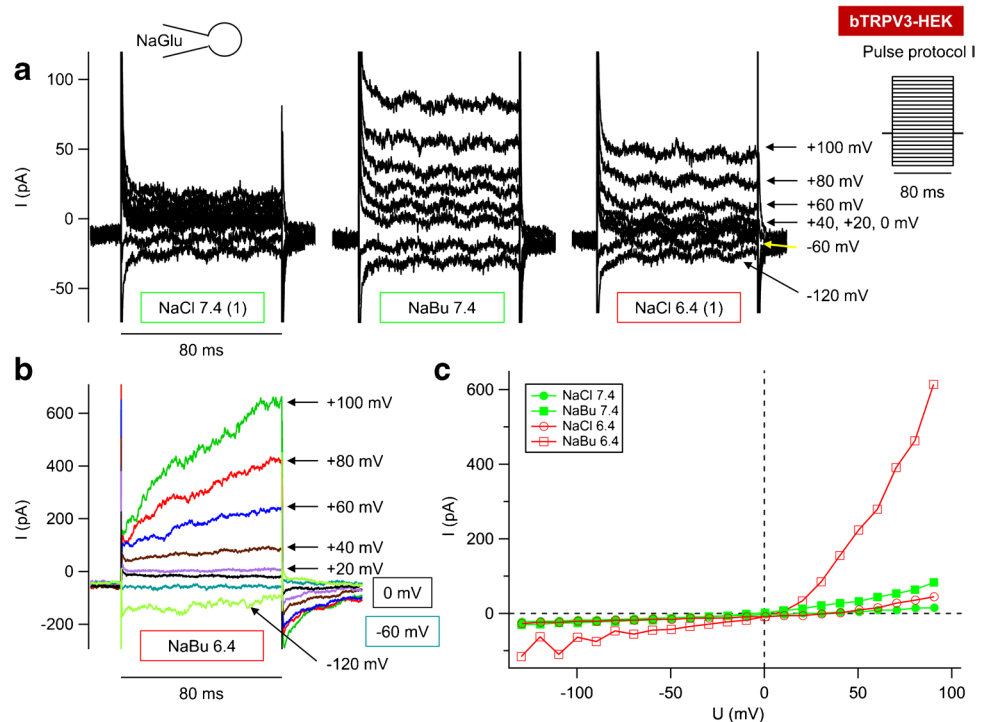
Experiments were performed with a NaGlu pipette solution. A HEK-293 cell overexpressing bTRPV4 (a) and a control cell (c) were exposed to pulse protocol II, with the corresponding current–voltage plots in b and d. Cells were filled with NaGlu pipette solution and superfused with solutions as indicated at the top. After incubation in NaCl, cells were exposed to NaBu (30 mmol · L<sup>-1</sup>) at pH 7.4 (green) and pH 6.4 (red). The responses of individual cells were quite variable, and the rise in currents at positive potentials seen in response to NaBu 7.4 in a or c did not test for significance, in contrast to the subsequent current decrease in response to NaBu 6.4 in bTRPV4 group (see Table 4)



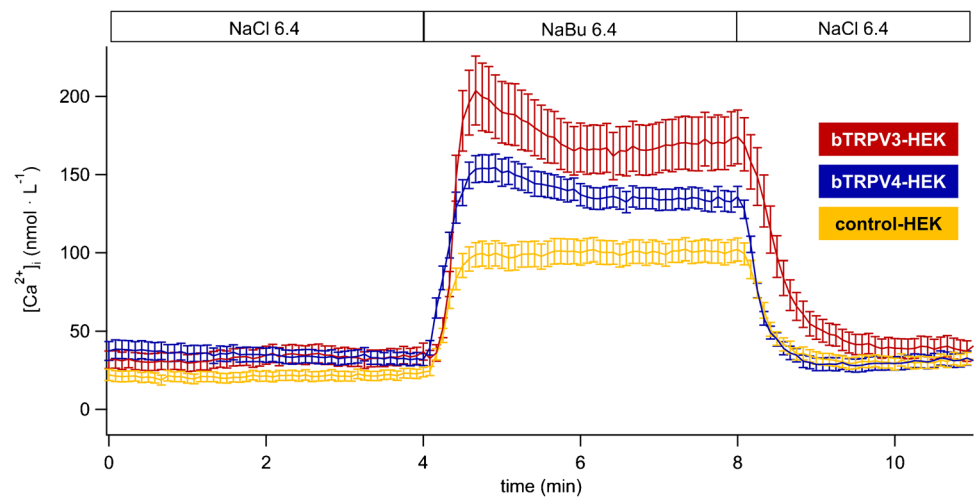
**Fig. 12** Whole-cell recording: bTRPV3 HEK-293 cells in butyrate<sup>-</sup> solution. Experiments were performed with a NaGlu pipette solution. Data obtained by applying protocol II are merged. a In this cell, a large response to NaBu (30 mmol · L<sup>-1</sup>) could be seen, the magnitude of which did not depend on the pH. b The corresponding current–voltage (IV) plot of the cell in a. c This cell is more typical and showed a much larger response to NaBu at pH 6.4 than at pH 7.4.

(For IV plot and current kinetics, see Fig. 13). d Comparison of the mean ( $\pm$ SEM) current responses to NaBu at +100 and -120 mV pipette potential. To rule out effects of a repeated exposure, the graph only includes data from the first exposure to NaBu. A total of  $n = 17$  cells were exposed to NaCl and NaBu at pH 7.4 (green), while  $n = 7$  cells were exposed to NaCl and NaBu at pH 6.4 (red). (For statistics of all data, see Table 4, and for solutions, Supplement, Part D, IV)

**Fig. 13** Whole-cell recording: bTRPV3 HEK-293 cell in butyrate<sup>-</sup> solution. The kinetics of currents obtained with pulse protocol I (a, b) and corresponding current–voltage plot (c) are displayed for the bTRPV3 HEK-293 cell (same cell as in Fig. 12c). For clarity, only traces for the indicated voltage steps are shown (arrows). **a** The current responses in NaCl 7.4, NaBu 7.4 and NaCl 6.4 were small (< 100 pA), and currents did not show time-dependent activation. **b** A change to NaBu at pH 6.4 induced higher currents (higher scaling). Note the time-dependent current increases after each depolarization and the pronounced tail currents after a return to -40 mV



**Fig. 14** Intracellular calcium fluorescence imaging: bTRPV3, bTRPV4, and control HEK-293 cells in butyrate<sup>-</sup> solution. The figure shows means  $\pm$  SEM of  $[Ca^{2+}]_i$  in HEK-293 cells overexpressing bTRPV3 ( $n/N=62/5$ ), bTRPV4 ( $n/N=145/11$ ), and control HEK-293 cells ( $n/N=143/9$ ,  $n$ : number of cells,  $N$ : number of coverslips) illustrating the significantly higher effect of NaBu 6.4 on bTRPV3 and bTRPV4 than on control cells



cells than in controls, with no significant difference between bTRPV3 and bTRPV4 (Table 5). Interestingly, in both bTRPV3 and bTRPV4 HEK-293 cells,  $[Ca^{2+}]_i$  rose within 1 min after application of NaBu 6.4 to a “peak” and subsequently dropped slightly to a lower plateau, which may reflect partial block of the channel after binding of  $Ca^{2+}$  to a calmodulin binding domain (Fig. 14) [74, 113]. In contrast,  $[Ca^{2+}]_i$  of controls remained constant after the initial increase (Fig. 14).

## Discussion

In previous studies of ruminal transport, it has emerged that many of the transport proteins typically expressed by gastrointestinal epithelia such as ENaC, CFTR, TRPV5, or TRPV6 are not involved [55]. Instead, the tissue expresses a non-selective, divalent-sensitive cation conductance that physiologically serves as a route for the uptake of  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ , and  $NH_4^+$ . A similar, amiloride-insensitive cation conductance has previously been observed in the omasum [84], in



**Table 5** Intracellular calcium fluorescence imaging: bTRPV3, bTRPV4, and control HEK-293 cells in butyrate<sup>-</sup> solution. bTRPV3 (V3), bTRPV4 (V4), and control (ctrl) HEK-293 cells were loaded with fura-2. Cells were superfused with solutions as indicated in left column (Supplement, Part D, IV) to investigate the effect of NaBu (30 mmol · L<sup>-1</sup>) at pH 6.4. Data are given as means ± SEM and were obtained 3.5 min in each solution, with the exception of NaBu 6.4

Intracellular calcium concentration [Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub> (nmol · L <sup>-1</sup> )							
Bath, pH	bTRPV3 (62/5)	bTRPV4 (145/11)	control (143/9)	ANOVA (all)	<i>p</i> <sub>1</sub> V4/ctrl	<i>p</i> <sub>2</sub> V4/V3	<i>p</i> <sub>3</sub> V3/ctrl
NaCl 6.4 (1)	33 ± 6 <sup>a</sup>	33 ± 5 <sup>a</sup>	21 ± 3 <sup>a</sup>	0.2	0.1	0.6	0.1
NaBu 6.4(peak)	190 ± 20 <sup>b</sup>	151 ± 9 <sup>b</sup>	98 ± 8 <sup>b</sup>	≤0.001	≤0.001	0.5	≤0.001
NaBu 6.4(plateau)	170 ± 18 <sup>c</sup>	135 ± 7 <sup>c</sup>	101 ± 8 <sup>c</sup>	≤0.001	≤0.001	0.5	≤0.001
NaCl 6.4 (2)	38 ± 7 <sup>a</sup>	31 ± 5 <sup>a</sup>	31 ± 4 <sup>d</sup>	0.7	0.4	0.9	1.0

(peak), which reflects the maximal change measured within the first minute after the switch to NaBu 6.4. The superscripts indicate significant differences (*p* ≤ 0.05) within each group or column. The *p* values obtained via ANOVA (all three groups) and via pairwise testing between the groups are given in the last four columns. The number of individual cells and coverslips is given in brackets (*n/N*) in the column headings

rabbit and rat cecum [75, 86], in the proximal colon of rats [29], and in colon of *Xenopus laevis* frogs [51]. There is also evidence for a similar pathway in the colon and cecum of pigs [61].

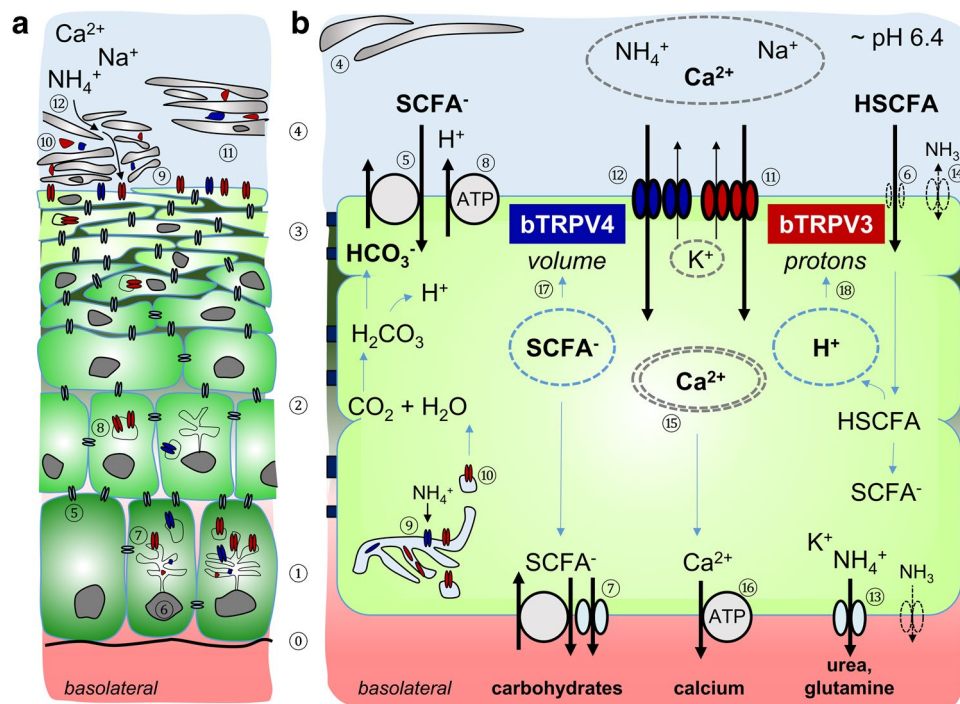
In rumen, mRNA and protein of TRPV3 was detected, and Ussing chamber studies using various different TRP agonists point towards a functional involvement of TRPV3 in this non-selective cation conductance [32, 56, 76, 78]. However, in addition to TRPV3, the bovine rumen also expresses mRNA for the non-selective cation channel TRPV4 [78]. A major goal of the current study was to sequence the bovine homologue (bTRPV4) and to investigate its functional expression and localization within the native ruminal epithelium. Furthermore, given the large quantities of ammonia (NH<sub>4</sub><sup>+</sup> or NH<sub>3</sub>) absorbed by the rumen in the cationic form (NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) [1, 3, 11], we wished to determine the permeability of bTRPV4 to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. Since short-chain fatty acids (SCFA) stimulate the ruminal uptake of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> [12, 13] and Ca<sup>2+</sup> [44, 54, 81–83, 104, 110, 117] in vivo and in vitro, we finally investigated whether butyrate<sup>-</sup> stimulates bTRPV3 and/or bTRPV4. Based on our data and literature, we present a model for the stimulation of ruminal cation transport by SCFA (Fig. 15).

### Expression of the bovine homologue of TRPV4 (bTRPV4) by the ruminal epithelium

Sequencing of bTRPV4 yielded a protein (QXI66840.1) with ~97% homology to that of humans (NP\_067638.3), ~93% homology to the porcine TRPV4 (XM\_013982949.2), and ~89% homology to that of the mouse (XM\_006530432), all of which have an almost identical calculated molecular weight of ~98 kDa. Functionally important sites, such as the binding sites for protons [31, 112] or GSK1016790A [15], were conserved, as well as the

pore region [108] which differed from that of TRPV3 by two amino acids (Supplement, Part G).

Two different antibodies (Thermo and ABIN) were established using overexpressing HEK-293 cells. In immunoblots, staining could be seen at ~130 kDa, reflecting the sum of bTRPV4 construct and its fused Strep and YFP tags (Fig. 1). Glycosylation is the most likely reason for the doubling of the band [87]. Control cells did not show staining. Likewise, in immunofluorescence imaging, only the overexpressing cells showed staining, which was localized in the cell membrane (Fig. 2). In immunoblots of protein from the bovine ruminal epithelium, a strong band emerged at ~60 kDa (Fig. 1). Since this band was observed using both established antibodies, it appears unlikely that it reflects non-specific binding. A more likely reason for the additional band is breakdown or splicing. In humans, many different splice variants of TRPV4 have been identified [4]. At higher protein concentrations and higher exposure times, a band emerged at ~100 kDa, reflecting the expected height for the untagged bTRPV4. The ~60 kDa band could again be detected, followed by bands of smaller molecular weight. In the mouse, a TRPV4 splice variant of ~66 kD has been identified (XP\_036021298.1, 592 amino acids), possibly identical to an additional ~50 kDa band reported by the supplier of the Thermo antibody. In our study of the expression of TRPV4 by porcine gastrointestinal tissues [61], staining for TRPV4 was observed at a slightly lower level than expected. While this may reflect different splicing or breakdown, it should also be noted that in that study, we used a commercial gel with a higher polyacrylamide percentage (10%) instead of a freshly made gel with 7.5% as in the current study. Furthermore, in the current study, the duration of electrophoresis was longer. All of these factors influence the separation of proteins and the accuracy with which band height can be determined [35], so that differences should not be overinterpreted.



**Fig. 15** Model: bTRPV3 and bTRPV4 function in rumen. **a** Schematic representation showing the various layers of the ruminal epithelium. Starting from the basolateral side at the bottom, the basal lamina (④) which are the replicating cells of the epithelium. As cells grow upwards, they differentiate into cells of the *stratum basale* (①) which are the replicating cells of the epithelium. As cells grow upwards, they differentiate into cells of the *stratum spinosum* (②), *stratum granulosum* (③), and finally *stratum corneum* (④). Cells of the bottom three layers (①, ②, ③) are interconnected by gap junction proteins (⑤), forming a functional syncytium across which ions, molecules, and water can be transported. Tight junction proteins largely prevent paracellular transport. Cell nuclei (⑥) are in every cell of the *stratum basale* and *stratum spinosum*. Channel proteins are transcribed from mRNA within the endoplasmic reticulum (⑦). After assembly, the channels are incorporated into the lipid membrane of vesicles (⑧) for trafficking into the apical membrane of the *stratum granulosum* (⑨). Cells of the *stratum corneum* are surrounded by a protein envelope (shown in black) which displaces the lipid membrane (blue) and its now dysfunctional proteins (⑩). In parakeratosis, premature maturation leads to reinforced flattening of the cells of the *stratum granulosum*, often with loss of the endoplasmic reticulum and cell nuclei, while cells from the *stratum corneum* show residual cell nuclei and frequently detach from the underlying layers (⑪). In absorptive stratified epithelia, substrates can pass through the paracellular pathway between corneocytes to reach the apical membrane of the *stratum granulosum* (⑫). **b** Simplified transport model of the ruminal epithelium showing the functional syncytium between

the *stratum basale* (①) *stratum spinosum* (②), and *stratum granulosum* (③). The *stratum corneum* is partially detached (④). SCFA from fermentation processes within the rumen supply energy to the animal and serve for carbohydrate anabolism. Apical uptake occurs as the anion (SCFA<sup>-</sup>) via transporters (⑤) or in the undissociated form (HSCFA, ⑥). Basolateral efflux involves anion channels or transporters (⑦). Dissociation of HSCFA leads to acidification with stimulation of pH regulatory mechanisms such as NHE and H<sup>+</sup>-ATPases (⑧). Following synthesis and assembly in the endoplasmic reticulum (⑨), some channels may be required for local functions (e.g. uptake of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> for glutamine synthesis), while others are trafficked in vesicles (⑩) to the apical membrane of the *stratum granulosum*. After membrane insertion, bTRPV3 (red, ⑪) and bTRPV4 (blue, ⑫) mediate the apical uptake of cations including NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup>. Basolateral efflux of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> probably involves K<sup>+</sup> channels (⑬). At the physiological pH of the rumen, transport of NH<sub>3</sub> plays a minor role, with backflow possible if the NH<sub>3</sub> gradient is inverted by a low luminal and a high cytosolic pH (⑭). After uptake (⑪, ⑫), Ca<sup>2+</sup> is transported to the basolateral membrane bound to cytosolic buffers (⑮). Basolateral efflux may involve both Na<sup>+</sup>-dependent and Na<sup>+</sup>-independent mechanisms (⑯). When SCFA concentrations in the rumen are high, changes in cell volume (⑰) and cytosolic protons (⑱) open bTRPV4 (⑪) and bTRPV3 (⑫), respectively, leading to an increase in the transport of Ca<sup>2+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> across the rumen as observed in vivo and in vitro. Functionally, the coupling of Ca<sup>2+</sup> transport via TRP channels with proton extrusion may resemble Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup> exchange

### Localization of bTRPV3 and bTRPV4 in the native bovine ruminal epithelium and in a cell culture model

Immunofluorescence staining was used for localization of bTRPV3 and bTRPV4 in the intact bovine ruminal epithelium (Fig. 3, 4). The apical staining pattern for bTRPV3 and bTRPV4 resembles that found in the (monolayered)

porcine intestine [61, 102] and suggests a role in transport (See model in Fig. 15). Note that the cells of the *stratum corneum* are surrounded by a protein envelope, while the lipid membrane and its proteins are pushed out into the intercellular space. In the skin, secretion of further lipids seals the paracellular pathway to prevent loss of fluid [8]. Conversely, in mucous membranes such as the oral mucosa [115] or the rumen, the intercellular space of the *stratum corneum*

remains permeable. The cells reaching from the *stratum basale* to the *stratum granulosum* are interconnected by gap junctions to form a functional syncytium [37]. Interestingly, keratinocytes grown in multiple layers on inserts showed an organizational structure that surprisingly resembled that of the native epithelium (Fig. 5, 6, and supplemental films). As in our previous study [96], the model expressed tight junction proteins with TEER values  $> 700 \Omega \cdot \text{cm}^2$ .

In line with previous investigations of bovine rumen [53, 92], our preparations showed clear signs of parakeratosis. In cattle, this condition is induced by feeding diets rich in rapidly digestible carbohydrates with increased rates of fermentation, low ruminal pH, and high levels of SCFA and ammonia. This requires an adaption of the ruminal mucosa to allow a more rapid rate of transport [5]. Higher rates of mitosis are found in the *stratum basale*. Cells are pushed upwards into the *stratum spinosum* where they prematurely begin to form keratin within keratohyalin granules that are normally typical of the *stratum granulosum*. The granular cells within that layer prematurely lose cell organelles and cell nuclei [97], become very flat, and resemble cells of the *stratum corneum*, which conversely will frequently continue to express cell nuclei [92]. Furthermore, the *stratum corneum* may detach from the underlying layers [53, 97]. This may make it difficult to distinguish between cells of the two upper layers, but one of the most reliable properties of cells of the *stratum granulosum* persists, namely the expression of tight junction proteins, which are never found in the *stratum corneum* [97].

Judging from Figs. 3 and 4, in the ruminal epithelium, the boundary between the *stratum corneum* and the *stratum granulosum* is the point at which bTRPV3 and bTRPV4 are inserted into the membrane. Below this line, cells are tightly adjoined by properly inserted tight junctions [33, 97], while above, staining shows a disorganized pattern, reflecting the displacement of the lipid membrane and its proteins by the corneocyte envelope. It is possible to speculate that the enzymatic processes involved degrade not only the membrane lipids but also the proteins within, which might explain the high number of weak bands  $< 60 \text{ kDa}$  in Fig. 1b and the dysmorphic staining of the *stratum corneum* in Fig. 3.

### Functional studies in Ussing chambers and using the patch-clamp technique

To test for functional expression of bTRPV4, the potent agonist GSK1016790A was used that is currently thought to be specific for TRPV4 [7]. Indeed, whole-cell experiments confirmed that at  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , GSK1016790A significantly stimulates  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  currents in HEK-293 cells expressing bTRPV4, but not in bTRPV3 cells or controls (Tables 2 and 3, Figs. 8, 9, and 10). According to a recent study, the specific action of GSK1016790A on TRPV4 requires three

binding sites [15], one of which (N474) is not conserved in TRPV3 (Supplement, Part G).

These experiments further show that the bTRPV4 conducts the  $\text{NH}_4^+$  ion (Table 2 and Fig. 8 and 9). Given the high homology, this is also likely to be true for the human variant.

To test effects of GSK1016790A on native ruminal epithelia, Ussing chamber measurements were carried out with no electrochemical gradient present. In this situation, a current has to be energized by primary or secondary active transport. Accordingly, a rise in short-circuit current ( $I_{\text{sc}}$ ) will reflect an increase in transcellular transport—unless the transcellular conductance ( $G_t$ ) drops, which was not the case in any of the experiments (Fig. 7 and Table 1).

The concentration of GSK1016790A had to be raised to  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  before a response occurred. The response consisted of an initial increase in  $I_{\text{sc}}$  followed by a subsequent decrease. The  $I_{\text{sc}}$  rise is to be expected if GSK1016790A opens an apical non-selective cation channel. Influx of  $\text{Na}^+$  will depolarize the tissue, stimulating the efflux of  $\text{K}^+$  through the same pathway until the  $I_{\text{sc}}$  reverses sign, all as observed. The response strikingly resembled our observations for 2-APB (Fig. 7 and Table 1) and for menthol and thymol in previous studies [76, 78]. However, no effect on  $G_t$  was observed in contrast to what was seen with these agonists. It is tempting to speculate that the barrier-enhancing effects of bTRPV4 compensated for any increase in  $G_t$  [90].

Although non-specific effects cannot be ruled out, the simplest explanation is that GSK1016790A opened the non-selective bTRPV4 channel.

For comparison and to test the vitality of the tissues, 2-APB ( $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was used. Unfortunately, there is currently no specific TRPV3 agonist, but based on patch-clamp and molecular biological data, a robust response was expected. While seen in isolation, a response to 2-APB certainly does not prove expression of bTRPV3, a failure to see a response would argue against functional expression of bTRPV3. Furthermore, 2-APB does not activate TRPV4 [46]. Note that expression of bTRPV3 by the rumen has been demonstrated on the level of the protein in a previous publication [56]. Furthermore, we have previously tested the effects of a number of less promiscuous TRPV3 agonists on the ruminal epithelium, but 2-APB was missing on our list [78].

Both the  $I_{\text{sc}}$  and the  $G_t$  response to 2-APB mirrored the previous observations after application of menthol or thymol [76, 78], arguing for a common pathway. As above, this response involved an initial increase in  $I_{\text{sc}}$ , most likely reflecting influx of  $\text{Na}^+$ , followed by a decrease caused by efflux of  $\text{K}^+$ . A simultaneous increase in  $G_t$  may reflect both an opening of apical ion channels and an additional opening of the paracellular pathway, as discussed previously for other TRPV3 agonists [78]. Patch-clamp experiments

on HEK-293 cells overexpressing bTRPV3 confirmed the stimulation of both  $\text{Na}^+$  and  $\text{K}^+$  conductances by a similar concentration of 2-APB ( $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) (Fig. 10, Table 3).

Mutagenesis analysis has shown that the effect of 2-APB on TRPV3 implicates two amino acid residues that are conserved when comparing the bovine to the human TRPV3 (Supplement, Part G) [46]. Apart from various other effects [43], 2-APB activates TRPV1, TRPV2, TRPV3, and TRPA1 and inhibits TRPC4, TRPC5, TRPC6, TRPM8, and TRPP1, while it has no effect on TRPV4, TRPV5, or TRPV6 [20, 21, 41, 46, 47]. As discussed, the rise in both  $I_{\text{sc}}$  and  $G_t$  argues against a channel block. Since no mRNA for either TRPV1 or TRPV2 was detected in the rumen [78], this leaves bTRPV3 and bTRPA1 as high ranking candidates for the effects of 2-APB.

It is certainly tempting to speculate that bTRPA1 is involved in the previously observed stimulatory effects of menthol on ruminal  $\text{Ca}^{2+}$  transport in Ussing chambers [32, 78]. Micromolar concentrations of menthol stimulate not only bTRPV3, but also bTRPA1 [49]. At a higher concentration  $> 0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , however, menthol should inhibit bTRPA1 [49]. Conversely, ruminal tissues treated with 0.1 or 1  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  of menthol showed an  $I_{\text{sc}}$  and  $G_t$  response that mirrored the effects of 2-APB in the current study [76, 78]. Since bTRPM8 is not expressed by the rumen [32, 78], the response to menthol argues for an involvement of bTRPV3 that clearly exceeds any involvement of bTRPA1.

In this context, it should also be noted that while mRNA signals for TRPV3 and TRPV4 are robust, mRNA encoding for bTRPA1 was frequently weak [32] or even near the limit of detection [76]. Possibly, expression levels of TRPA1 are low because its role is primarily in signalling, rather than in bulk transport of cations. In the gut, the activation of TRPA1 by a plethora of membrane-permeable substances may help with the detection of noxious substances [49]. In the colon, activation of TRPA1 induced EP4-mediated signalling with anion secretion [48, 61]. A role for TRPA1 in signalling is also suggested by the fact that gain-of-function mutations of TRPA1 cause hereditary pain syndromes with no signs of dermal disease [49]. However, we do not exclude participation in cation transport [61], and further investigations are clearly required.

### Stimulation of $\text{Na}^+$ and $\text{Ca}^{2+}$ transport by butyrate<sup>-</sup>

Our interest was triggered by the fact that SCFA, in general, and butyrate<sup>-</sup>, in particular, stimulate  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the rumen [44, 54, 81–83, 104, 110, 117] and by the colon of rats [59] and humans [100], all of which express TRPV3 and TRPV4. Since in the rumen, effects of butyrate<sup>-</sup> have been shown to be stronger than those of acetate<sup>-</sup> or propionate<sup>-</sup> [82], we tested the effects of this SCFA on HEK-293 cells expressing bTRPV3 or bTRPV4

and control cells via the whole-cell configuration of the patch-clamp technique and via  $\text{Ca}^{2+}$  imaging.

In monogastric species, it has been solidly established that the major site of  $\text{Ca}^{2+}$  absorption is the duodenum and the upper jejunum, where the bulk of  $\text{Ca}^{2+}$  is apically taken up via TRPV6, crosses the cytosol bound to calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$ , and is basolaterally extruded via a  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (PMCA1b), all under the control of calcitriol [42, 80]. Conversely, in cattle and sheep, it has been estimated that roughly 50% of total  $\text{Ca}^{2+}$  absorption takes place pre-intestinally [80], although these amounts may vary [118]. Ruminal uptake is almost exclusively transcellular and energized via basolateral  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$  exchange [44, 55, 82] and possibly also PMCA1 [83]. Expression of calbindin- $\text{D}_{9\text{K}}$  was detected in goat rumen [88] but not in the rumen of sheep [116, 117]. Although apical uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  involves an electrogenic component [44, 54, 118], no mRNA for the epithelial calcium channels TRPV5 and TRPV6 was detected [32, 78, 83, 116, 117]. Furthermore, and despite considerable interest by researchers and farmers alike, there is no sign of a stimulation of ruminal  $\text{Ca}^{2+}$  absorption by calcitriol [117, 118] or vitamin D [88].

The protonated form of butyrate<sup>-</sup> (butyric acid) is a weak acid with a  $\text{pK}_a \sim 4.8$ . At pH 7.4, 0.25% is present in butyric acid, rising to 2.45% at pH 6.4. In the classical model, the uncharged butyric acid diffuses into the cytosol, where it dissociates, releasing butyrate<sup>-</sup> and a proton [95] (Fig. 15). Since effects of SCFA are higher at low pH, protons are likely a key factor for the stimulation of  $\text{Ca}^{2+}$  transport. In similar fashion, elevation of mucosal chloride—which acidifies the cytosol via stimulation of  $\text{Cl}^-/\text{HCO}_3^-$  exchange—enhances ruminal  $\text{Ca}^{2+}$  transport [54]. In that study, it could also be shown that both electrogenic and electroneutral mechanisms are involved in proton-sensitive  $\text{Ca}^{2+}$  transport. Furthermore, acidification of the cytosol by application of amiloride blocks extrusion of protons via  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  exchange (NHE) and stimulates  $\text{Ca}^{2+}$  transport. These findings led to the postulation of a  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$  exchanger [59, 82], the identity of which continues to remain unclear. The model was recently challenged by a study in which NHE was blocked by replacing  $\text{Na}^+$  with  $\text{NMDG}^+$ , leading to a drop in net  $\text{Ca}^{2+}$  flux [32]. In various members of the TRP family including TRPV3,  $\text{NMDG}^+$  can enter the pore in response to triggers that include membrane stretch, interfering with the passage of other cations [28, 79]. The blocking effects of  $\text{NMDG}^+$  suggest that the stimulatory effects of SCFA on ruminal  $\text{Ca}^{2+}$  transport may involve TRP channels. The whole-cell patch-clamp data suggest that intracellular protons activate bTRPV3 (Table 4 and Fig. 12). Capacitance measurements in these experiments suggest that volume-related effects were of minor importance, which may explain the failure of butyrate<sup>-</sup> to significantly stimulate bTRPV4. However, an involvement of volume changes in

the responses of individual cells overexpressing the highly stretch-sensitive bTRPV4 appears possible [68] (Fig. 11).

Our finding that TRPV3, but not TRPV4, is opened by intracellular protons is not new [17, 31]. Single-channel data suggest that of the four channels TRPV1, TRPV2, TRPV3, and TRPV4, only TRPV3 is directly activated by intracellular protons. Mutagenesis analysis showed that key cytoplasmic residues of the TRPV3 channel are required [17, 31, 112] (Supplement, Part G). Conversely, extracellular protons do not activate the channels, although they may augment the activity of agonists [17, 89].

In light of these deliberations, it is somewhat surprising that in the calcium imaging experiments, all three groups of cells showed a significant and reversible increase in  $[Ca^{2+}]_i$  due to NaBu 6.4. However, effects were significantly higher in the cells overexpressing bTRPV3 or bTRPV4. The reason for the butyrate<sup>-</sup>-induced rise of  $[Ca^{2+}]_i$  in the control cells may simply reflect the classical release of  $Ca^{2+}$  from intracellular buffers after binding of  $H^+$  [66]. Proton-induced opening of bTRPV3 is a plausible explanation for the high rise in  $[Ca^{2+}]_i$  observed in the bTRPV3 expressing cells [17, 31]. The peak and subsequent drop possibly reflect negative feedback after binding of  $Ca^{2+}$  to a calmodulin binding site in the ankyrin repeat domain [74, 113].

The positive  $[Ca^{2+}]_i$  response of the bTRPV4 cells to NaBu 6.4 was not expected. However, while in the whole-cell experiments, changes in volume were largely prevented by backflow into the pipette, this outlet was not available to the intact, fura-2-loaded cells. Influx of butyrate<sup>-</sup> should lead to swelling—which can be expected to activate the volume sensor TRPV4 [68].

### TRPV3 and TRPV4: team players in ruminal cation transport?

The functional expression of TRPV4 by keratinocytes is well-documented, notably also in the oesophageal epithelium [87, 101]. The current study clearly confirms expression of TRPV4 by the ruminal epithelium, which evolved from the oesophagus. However, both the relatively weak band for the full-length protein at ~100 kDa in the immunoblots and the high concentrations of GSK1016790A required to observe a functional response in Ussing chambers suggest that functional expression of bTRPV4 by the rumen may be lower than that of bTRPV3. In this context, it is interesting to note that neither a gain- nor a loss-of-function of TRPV4 causes skin disease, although pathologies of skeletal growth and neuropathy are observed [10, 99]. Conversely, gain-of-function mutations of TRPV3 lead to mutilating hyperkeratosis in humans [26, 69]. Since loss-of-function mutations of TRPV3 have a mild phenotype [70], it is possible to speculate that TRPV4 and/or other channels are upregulated for compensation.

Likewise, in the rumen, the relative importance of TRPV4 in ensuring an adequate efflux of cations from the rumen might rise under certain conditions—such as high ruminal osmolarity. As mentioned, TRPV4 channels are outstanding volume sensors (e.g. after a hypotonic challenge) [99]. Furthermore, a role in the formation of intercellular junctions between keratinocytes is discussed [10, 90]. Both functions might be involved in the impressive and reversible changes in ruminal barrier function observed in response to hyperosmotic challenges [58]. Maybe TRPV3 and TRPV4 are team players—with TRPV3 doing most of the work under normal circumstances and TRPV4 stepping in when it is necessary.

In conclusion, we present evidence for the expression of bTRPV4 by the apical membrane of the *stratum granulosum* of the ruminal epithelium, with cytosolic staining in the epithelial layers below (Fig. 15a). Based on the weak bands for the full-length protein and the high amounts of GSK1016790A required to stimulate the channel in the native epithelium, its functional role in cation transport across the rumen may lag behind that of bTRPV3. Stimulation of ruminal  $Ca^{2+}$  transport by SCFA may primarily involve bTRPV3, which is opened by cytosolic protons (Fig. 15b). Activation of bTRPV4 after membrane stretch may contribute. In conjunction with the apically expressed  $H^+$ -ATPase [52], a functionally coupled exchange of protons with cations including  $Ca^{2+}$  and  $Na^+$  can be expected to occur [59, 82]. This mechanism might also explain functional exchange of  $Na^+$  with protons in situations where mucosal pH is very low with an insufficient driving force for NHE.

When SCFA concentrations become excessive or the ruminal pH drops low, as in cattle fed high-soluble carbohydrate, ruminal hyperkeratosis and parakeratosis may develop [5, 6, 92]. The histological changes show similarities to those observed in humans suffering from a gain-of-function mutation of TRPV3 [69]. Future work will have to determine whether or not influx of  $NH_4^+$  has a role to play in these changes [57]. Furthermore, more work is necessary to determine the quantitative roles of TRPV3 and TRPV4 in mediating transport of  $NH_4^+$  and  $Ca^{2+}$ , respectively. This will require more specific agonists and antagonists. A greater understanding of the precise mechanisms involved and tools suitable for selectively modulating them may help ruminants and humans alike.

**Supplementary Information** The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02647-7>.

**Acknowledgements** We wish to express our gratitude to Gisela Manz for her continuous support and encouragement and her technical expertise in performing patch-clamp experiments. We would also like to thank Julius Dahl for help in the patch-clamp laboratory as well as Susanne Trappe and Valeria Cornelius for expert help in immunofluorescence staining. We are very grateful to Katharina Söllig, who helped with immunoblots, and Martin Grunau and Sebastian Geiger who helped with the Ussing chamber experiments. Our profound thanks also

to Marah Ba Salem for help with calcium imaging. Manfred Sommerer kept all computers running. We would also like to cordially thank Robert Pieper for providing access to bovine tissue. Finally, we are grateful to Salah Amasheh and Jörg Aschenbach for the inspiring discussions.

**Author contribution** F. Stumpff and F. Liebe conceived and designed the study; F. Liebe, H. Liebe, G. Sponder, and F. Stumpff performed the research; F. Liebe, H. Liebe, G. Sponder, and F. Stumpff analysed data; F. Stumpff was responsible for the software; F. Liebe and F. Stumpff wrote the paper; and H. Liebe, G. Sponder, and S. Mergler corrected the draft.

**Funding** Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL. We would like to express our gratitude for funding by the Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG STU 258/7–1) and the Sonnenfeld Stiftung.

**Data availability** All data generated and/or analysed during the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

**Code availability** Available on reasonable request from F.S.

## Declarations

**Ethics approval** Ruminal epithelium was obtained from a commercial slaughterhouse under the control of the German authorities or from animals euthanized within the context of another study (permit T 0111/20).

**Consent to participate** Not applicable.

**Consent for publication** Not applicable.

**Conflict of interest** The authors declare no competing interests.

**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## References

1. Abdoun K, Stumpff F, Martens H (2006) Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review. *Anim Health Res Rev* 7:43–59. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001156>
2. Abdoun K, Stumpff F, Rabbani I, Martens H (2010) Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO<sub>2</sub>. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 298:G190–202. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00216.2009>
3. Abdoun K, Stumpff F, Wolf K, Martens H (2005) Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 289:G508–520. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00436.2004>
4. Arniges M, Fernandez-Fernandez JM, Albrecht N, Schaefer M, Valverde MA (2006) Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking. *J Biol Chem* 281:1580–1586. <https://doi.org/10.1074/jbc.M511456200>
5. Aschenbach JR, Zebeli Q, Patra AK, Greco G, Amasheh S, Penner GB (2019) Symposium review: the importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and productive cow. *J Dairy Sci* 102:1866–1882. <https://doi.org/10.3168/jds.2018-15243>
6. Baaske L, Gäbel G, Dengler F (2020) Ruminal epithelium: a checkpoint for cattle health. *J Dairy Res* 87:322–329. <https://doi.org/10.1017/S0022029920000369>
7. Baratchi S, Keov P, Darby WG, Lai A, Khoshmanesh K, Thurgood P, Vahidi P, Ejendal K, McIntyre P (2019) The TRPV4 agonist GSK1016790A regulates the membrane expression of TRPV4 channels. *Front Pharmacol* 10:6. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00006>
8. Basler K, Bergmann S, Heisig M, Naegel A, Zorn-Kruppa M, Brandner JM (2016) The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption. *J Control Release* 242:105–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2016.08.007>
9. Bergman EN (1990) Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. *Physiol Rev* 70:567–590. <https://doi.org/10.1152/physrev.1990.70.2.567>
10. Blyndon DC, Kelsell DP (2014) Defective channels lead to an impaired skin barrier. *J Cell Sci* 127:4343–4350. <https://doi.org/10.1242/jcs.154633>
11. Bödeker D, Kemkowski J (1996) Participation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in total ammonia absorption across the rumen epithelium of sheep (*Ovis aries*). *Comp Biochem Physiol A Physiol* 114:305–310. [https://doi.org/10.1016/0300-9629\(96\)00012-6](https://doi.org/10.1016/0300-9629(96)00012-6)
12. Bödeker D, Shen Y, Kemkowski J, Höller H (1992) Influence of short-chain fatty acids on ammonia absorption across the rumen wall in sheep. *Exp Physiol* 77:369–376. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1992.sp003597>
13. Bödeker D, Winkler A, Höller H (1990) Ammonia absorption from the isolated reticulo-rumen of sheep. *Exp Physiol* 75:587–595. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1990.sp003434>
14. Boron WF (2010) Sharpey-Schafer lecture: gas channels. *Exp Physiol* 95:1107–1130. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2010.055244>
15. Botte M, Ulrich AKC, Adaixo R, Gnutt D, Brockmann A, Bucher D, Chami M, Bocquet N, Ebbinghaus-Kintscher U, Puetter V, Becker A, Egner U, Stahlberg H, Hennig M, Holton SJ (2020) Cryo-EM structural studies of the agonist complexed human TRPV4 ion-channel reveals novel structural rearrangements resulting in an open-conformation. *bioRxiv:2020.2010.2013.334797*. <https://doi.org/10.1101/2020.10.13.334797>
16. Buccitelli C, Selbach M (2020) mRNAs, proteins and the emerging principles of gene expression control. *Nat Rev Genet* 21:630–644. <https://doi.org/10.1038/s41576-020-0258-4>
17. Cao X, Yang F, Zheng J, Wang K (2012) Intracellular proton-mediated activation of TRPV3 channels accounts for the exfoliation effect of  $\alpha$ -hydroxyl acids on keratinocytes. *J Biol Chem* 287:25905–25916. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.364869>
18. Caterina MJ, Pang Z (2016) TRP channels in skin biology and pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel)* 9. <https://doi.org/10.3390/ph9040077>
19. Chepilko S, Zhou H, Sackin H, Palmer LG (1995) Permeation and gating properties of a cloned renal K<sup>+</sup> channel. *Am J Physiol* 268:C389–401. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.1995.268.2.C389>
20. Clapham DE (2007) SnapShot: mammalian TRP channels. *Cell* 129:220. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.03.034>

21. Colton CK, Zhu MX (2007) 2-Aminoethoxydiphenyl borate as a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3 channels. *Handb Exp Pharmacol*:173–187. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7\\_10](https://doi.org/10.1007/978-3-540-34891-7_10)
22. Connor EE (2015) Invited review: improving feed efficiency in dairy production: challenges and possibilities. *Animal* 9:395–408. <https://doi.org/10.1017/S17511731114002997>
23. Coskun D, Britto DT, Shi W, Kronzucker HJ (2017) Nitrogen transformations in modern agriculture and the role of biological nitrification inhibition. *Nat Plants* 3:17074. <https://doi.org/10.1038/nplants.2017.74>
24. Couto Serrenho R, DeVries TJ, Duffield TF, LeBlanc SJ (2021) Graduate student literature review: what do we know about the effects of clinical and subclinical hypocalcemia on health and performance of dairy cows? *J Dairy Sci* 104:6304–6326. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19371>
25. DIN (2019) DIN e.V. (Hrsg.) (DIN 1333–1992–02): Zahlenangaben, Kapitel 4 (Runden), Beuth-Verlag, Berlin, 2019.
26. Duchatelet S, Hovnanian A (2015) Olmsted syndrome: clinical, molecular and therapeutic aspects. *Orphanet J Rare Dis* 10:33. <https://doi.org/10.1186/s13023-015-0246-5>
27. Everaerts W, Zhen X, Ghosh D, Vriens J, Gevaert T, Gilbert JP, Hayward NJ, McNamara CR, Xue F, Moran MM, Strassmaier T, Uykyl E, Owsianik G, Vennekens R, De Ridder D, Nilius B, Fanger CM, Voets T (2010) Inhibition of the cation channel TRPV4 improves bladder function in mice and rats with cyclophosphamide-induced cystitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:19084–19089. <https://doi.org/10.1073/pnas.1005333107>
28. Ferreira LG, Faria RX (2016) TRPping on the pore phenomenon: what do we know about transient receptor potential ion channel-related pore dilation up to now? *J Bioenerg Biomembr* 48:1–12. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9634-8>
29. Fromm M, Hegel U (1978) Segmental heterogeneity of epithelial transport in rat large intestine. *Pflügers Arch* 378:71–83. <https://doi.org/10.1007/BF00581960>
30. Gálfi P, Gäbel G, Martens H (1993) Influences of extracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture. *Res Vet Sci* 54:102–109. [https://doi.org/10.1016/0034-5288\(93\)90018-b](https://doi.org/10.1016/0034-5288(93)90018-b)
31. Gao L, Yang P, Qin P, Lu Y, Li X, Tian Q, Li Y, Xie C, Tian JB, Zhang C, Tian C, Zhu MX, Yao J (2016) Selective potentiation of 2-APB-induced activation of TRPV1-3 channels by acid. *Sci Rep* 6:20791. <https://doi.org/10.1038/srep20791>
32. Geiger S, Patra AK, Schrapers KT, Braun HS, Aschenbach JR (2021) Menthol stimulates calcium absorption in the rumen but not in the jejunum of sheep. *J Dairy Sci* 104:3067–3081. <https://doi.org/10.3168/jds.2020-19372>
33. Georgi MI, Rosendahl J, Ernst F, Gunzel D, Aschenbach JR, Martens H, Stumpff F (2014) Epithelia of the ovine and bovine forestomach express basolateral maxi-anion channels permeable to the anions of short-chain fatty acids. *Pflügers Arch* 466:1689–1712. <https://doi.org/10.1007/s00424-013-1386-x>
34. Geyer RR, Parker MD, Toye AM, Boron WF, Musa-Aziz R (2013) Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> permeabilities of human RhAG, RhBG and RhCG. *J Membr Biol* 246:915–926. <https://doi.org/10.1007/s00232-013-9593-0>
35. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV (2014) The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics* 11:549–560. <https://doi.org/10.1586/14789450.2014.939635>
36. Goff JP, Liesegang A, Horst RL (2014) Diet-induced pseudohypoparathyroidism: a hypocalcemia and milk fever risk factor. *J Dairy Sci* 97:1520–1528. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7467>
37. Graham C, Simmons NL (2005) Functional organization of the bovine rumen epithelium. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 288:R173–181. <https://doi.org/10.1152/ajpregu.00425.2004>
38. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY (1985) A new generation of Ca<sup>2+</sup> indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 260:3440–3450
39. Hackmann TJ, Spain JN (2010) Invited review: ruminant ecology and evolution: perspectives useful to ruminant livestock research and production. *J Dairy Sci* 93:1320–1334. <https://doi.org/10.3168/jds.2009-2071>
40. Hille B (2001) Ion channels of excitable membranes. 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. <https://doi.org/10.4236/jbm.2020.82005>
41. Hinman A, Chuang HH, Bautista DM, Julius D (2006) TRP channel activation by reversible covalent modification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:19564–19568. <https://doi.org/10.1073/pnas.0609598103>
42. Hoenderop JG, Nilius B, Bindels RJ (2005) Calcium absorption across epithelia. *Physiol Rev* 85:373–422. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2004>
43. Hofer A, Kovacs G, Zappatini A, Leuenberger M, Hediger MA, Lochner M (2013) Design, synthesis and pharmacological characterization of analogs of 2-aminoethyl diphenylborinate (2-APB), a known store-operated calcium channel blocker, for inhibition of TRPV6-mediated calcium transport. *Bioorg Med Chem* 21:3202–3213. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2013.03.037>
44. Höller H, Breves G, Kocobatmaz M, Gerdes H (1988) Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro. *Q J Exp Physiol* 73:609–618. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1988.sp003180>
45. Holzer P (2011) Transient receptor potential (TRP) channels as drug targets for diseases of the digestive system. *Pharmacol Ther* 131:142–170. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2011.03.006>
46. Hu H, Grandl J, Bandell M, Petrus M, Patapoutian A (2009) Two amino acid residues determine 2-APB sensitivity of the ion channels TRPV3 and TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1626–1631. <https://doi.org/10.1073/pnas.0812209106>
47. Hu HZ, Gu Q, Wang C, Colton CK, Tang J, Kinoshita-Kawada M, Lee LY, Wood JD, Zhu MX (2004) 2-aminoethoxydiphenyl borate is a common activator of TRPV1, TRPV2, and TRPV3. *J Biol Chem* 279:35741–35748. <https://doi.org/10.1074/jbc.M404164200>
48. Kaji I, Yasuoka Y, Karaki S, Kuwahara A (2012) Activation of TRPA1 by luminal stimuli induces EP4-mediated anion secretion in human and rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 302:G690–701. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00289.2011>
49. Karashima Y, Damann N, Prenen J, Talavera K, Segal A, Voets T, Nilius B (2007) Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1. *J Neurosci* 27:9874–9884. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2221-07.2007>
50. Knepper MA, Packer R, Good DW (1989) Ammonium transport in the kidney. *Physiol Rev* 69:179–249. <https://doi.org/10.1152/physrev.1989.69.1.179>
51. Krattenmacher R, Voigt R, Clauss W (1990) Ca-sensitive sodium absorption in the colon of *Xenopus laevis*. *J Comp Physiol B* 160:161–165. <https://doi.org/10.1007/BF00300948>
52. Kuzinski J, Zitnan R, Warnke-Gurgel C, Schweigel M (2010) The vacuolar-type H-ATPase in ovine rumen epithelium is regulated by metabolic signals. *J Biomed Biotechnol* 2010:525034. <https://doi.org/10.1155/2010/525034>
53. Lavker R, Chalupa W, Dickey JF (1969) An electron microscopic investigation of rumen mucosa. *J Ultrastruct Res* 28:1–15. [https://doi.org/10.1016/s0022-5320\(69\)90002-1](https://doi.org/10.1016/s0022-5320(69)90002-1)
54. Leonhard-Marek S, Becker G, Breves G, Schröder B (2007) Chloride, gluconate, sulfate, and short-chain fatty acids affect calcium flux rates across the sheep forestomach epithelium. *J*

- Dairy Sci 90:1516–1526. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(07\)71637-5](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(07)71637-5)
55. Leonhard-Marek S, Stumpff F, Martens H (2010) Transport of cations and anions across forestomach epithelia: conclusions from in vitro studies. *Animal* 4:1037–1056. <https://doi.org/10.1017/s1751731110000261>
  56. Liebe F, Liebe H, Kaessmeyer S, Sponder G, Stumpff F (2020) The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport. *Pflügers Arch* 472:693–710. <https://doi.org/10.1007/s00424-020-02393-2>
  57. Liebe H, Liebe F, Sponder G, Hedtrich S, Stumpff F (2021) Beyond Ca<sup>2+</sup> signalling: the role of TRPV3 in the transport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *Pflügers Arch*. <https://doi.org/10.1007/s00424-021-02616-0>
  58. Lodemann U, Martens H (2006) Effects of diet and osmotic pressure on Na<sup>+</sup> transport and tissue conductance of sheep isolated rumen epithelium. *Exp Physiol* 91:539–550. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.2005.032078>
  59. Lutz T, Scharrer E (1991) Effect of short-chain fatty acids on calcium absorption by the rat colon. *Exp Physiol* 76:615–618. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1991.sp003530>
  60. Macpherson LJ, Hwang SW, Miyamoto T, Dubin AE, Patapoutian A, Story GM (2006) More than cool: promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 32:335–343. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2006.05.005>
  61. Manneck D, Braun H-S, Schrapers KT, Stumpff F (2021) TRPV3 and TRPV4 as candidate proteins for intestinal ammonium absorption. *Acta Physiologica n/a:e13694*. <https://doi.org/10.1111/apha.13694>
  62. Martens H, Gäbel G, Strozyk B (1991) Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep. *Exp Physiol* 76:103–114. <https://doi.org/10.1113/expphysiol.1991.sp003472>
  63. Martens H, Leonhard-Marek S, Röntgen M, Stumpff F (2018) Magnesium homeostasis in cattle: absorption and excretion. *Nutr Res Rev* 31:114–130. <https://doi.org/10.1017/S0954422417000257>
  64. Martens H, Stumpff F (2019) Assessment of magnesium intake according to requirement in dairy cows. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 103:1023–1029. <https://doi.org/10.1111/jpn.13106>
  65. Mese G, Richard G, White TW (2007) Gap junctions: basic structure and function. *J Invest Dermatol* 127:2516–2524. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700770>
  66. Molinari G, Nervo E (2021) Role of protons in calcium signaling. *Biochem J* 478:895–910. <https://doi.org/10.1042/BCJ20200971>
  67. Montell C (2011) The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflügers Arch* 461:499–506. <https://doi.org/10.1007/s00424-010-0920-3>
  68. Moore C, Liedtke WB (2017) Osmomechanical-sensitive TRPV channels in mammals. In: Emir TLR (ed) *Neurobiology of TRP Channels*. CRC Press/Taylor & Francis, Boca Raton (FL). <https://doi.org/10.4324/9781315152837-5>
  69. Nilius B, Biro T (2013) TRPV3: a ‘more than skinny’ channel. *Exp Dermatol* 22:447–452. <https://doi.org/10.1111/exd.12163>
  70. Nilius B, Biro T, Owsianik G (2014) TRPV3: time to decipher a poorly understood family member! *J Physiol* 592:295–304. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.2013.255968>
  71. Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2004) TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C195–205. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00365.2003>
  72. Oetzel GR, Olson JD, Curtis CR, Fettman MJ (1988) Ammonium chloride and ammonium sulfate for prevention of parturient paresis in dairy cows. *J Dairy Sci* 71:3302–3309. [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(88\)79935-X](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(88)79935-X)
  73. Owsianik G, Talavera K, Voets T, Nilius B (2006) Permeation and selectivity of TRP channels. *Annu Rev Physiol* 68:685–717. <https://doi.org/10.1146/annurev.physiol.68.040204.101406>
  74. Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R (2010) Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J Biol Chem* 285:731–740. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.052548>
  75. Pouokam E, Diener M (2019) Segmental differences in ion transport in rat cecum. *Pflügers Arch* 471:1007–1023. <https://doi.org/10.1007/s00424-019-02276-1>
  76. Rabbani I, Braun HS, Akhtar T, Liebe F, Rosendahl J, Grunau M, Tietjen U, Masood S, Kaessmeyer S, Gunzel D, Rehman H, Stumpff F (2018) A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from *Bos indicus* crossbreds versus *Bos taurus*. *Anim Sci J* 89:1692–1700. <https://doi.org/10.1111/asj.13107>
  77. Reynolds CK, Kristensen NB (2008) Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis. *J Anim Sci* 86:E293–305. <https://doi.org/10.2527/jas.2007-0475>
  78. Rosendahl J, Braun HS, Schrapers KT, Martens H, Stumpff F (2016) Evidence for the functional involvement of members of the TRP channel family in the uptake of Na<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by the ruminal epithelium. *Pflügers Arch Eur J Physiol* 468:1333–1352. <https://doi.org/10.1007/s00424-016-1835-4>
  79. Schrapers KT, Sponder G, Liebe F, Liebe H, Stumpff F (2018) The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *PLoS ONE* 13:e0193519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193519>
  80. Schröder B, Breves G (2006) Mechanisms and regulation of calcium absorption from the gastrointestinal tract in pigs and ruminants: comparative aspects with special emphasis on hypocalcemia in dairy cows. *Anim Health Res Rev* 7:31–41. <https://doi.org/10.1017/S1466252307001144>
  81. Schröder B, Rittmann I, Pfeffer E, Breves G (1997) In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants. *J Comp Physiol (B)* 167:43–51. <https://doi.org/10.1007/s003600050046>
  82. Schröder B, Vossing S, Breves G (1999) In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen. *J Comp Physiol (B)* 169:487–494. <https://doi.org/10.1007/s003600050246>
  83. Schröder B, Wilkens MR, Ricken GE, Leonhard-Marek S, Fraser DR, Breves G (2015) Calcium transport in bovine rumen epithelium as affected by luminal Ca concentrations and Ca sources. *Physiol Res* 3https://doi.org/10.14814/phy2.12615
  84. Schultheiss G, Martens H (1999) Ca-sensitive Na transport in sheep omasum. *Am J Physiol* 276:G1331–1344. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1999.276.6.G1331>
  85. Schweigel M, Kolisek M, Nikolic Z, Kuzinski J (2008) Expression and functional activity of the Na/Mg exchanger, TRPM7 and MagT1 are changed to regulate Mg homeostasis and transport in rumen epithelial cells. *Magnes Res* 21:118–123. <https://doi.org/10.1684/mrh.2008.0137>
  86. Sellin JH, Dubinsky WP (1994) Apical nonspecific cation conductances in rabbit cecum. *Am J Physiol* 266:G475–484. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.1994.266.3.G475>
  87. Shikano M, Ueda T, Kamiya T, Ishida Y, Yamada T, Mizushima T, Shimura T, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Shimada S, Ugawa S, Joh T (2011) Acid inhibits TRPV4-mediated Ca<sup>2+</sup>(+) influx in mouse esophageal epithelial cells. *Neurogastroenterol Motil* 23(1020–1028):e1497. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2982.2011.01767.x>
  88. Sidler-Lauff K, Boos A, Kraenzlin M, Liesegang A (2010) Influence of different calcium supplies and a single vitamin D injection on vitamin D receptor and calbindin D9k immunoreactivities



- in the gastrointestinal tract of goat kids. *J Anim Sci* 88:3598–3610. <https://doi.org/10.2527/jas.2009-2682>
89. Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP, Ooi L, Egerton J, Charles KJ, Smart D, Randall AD, Anand P, Davis JB (2002) TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature* 418:186–190. <https://doi.org/10.1038/nature00894>
  90. Sokabe T, Fukumi-Tominaga T, Yonemura S, Mizuno A, Tomi-naga M (2010) The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes. *J Biol Chem* 285:18749–18758. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.103606>
  91. Sonkusare SK, Bonev AD, Ledoux J, Liedtke W, Kotlikoff MI, Heppner TJ, Hill-Eubanks DC, Nelson MT (2012) Elementary Ca<sup>2+</sup> signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. *Science* 336:597–601. <https://doi.org/10.1126/science.1216283>
  92. Steele MA, AlZahal O, Hook SE, Croom J, McBride BW (2009) Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report. *Acta Vet Scand* 51:39. <https://doi.org/10.1186/1751-0147-51-39>
  93. Stevens CE (1964) Transport of sodium and chloride by the isolated rumen epithelium. *Am J Physiol* 206:1099–1105. <https://doi.org/10.1152/ajplegacy.1964.206.5.1099>
  94. Strömberg CAE (2011) Evolution of grasses and grassland ecosystems. *Annu Rev Earth Planet Sci* 39:517–544. <https://doi.org/10.1146/annurev-earth-040809-152402>
  95. Stumpff F (2018) A look at the smelly side of physiology: transport of short chain fatty acids. *Pflügers Arch* 470:571–598. <https://doi.org/10.1007/s00424-017-2105-9>
  96. Stumpff F, Georgi MI, Mundhenk L, Rabbani I, Fromm M, Martens H, Günzel D (2011) Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins. *J Exp Biol* 214:2871–2882. <https://doi.org/10.1242/jeb.055582>
  97. Tamate H, Kikuchi T (1978) Electron microscopic study on parakeratotic ruminal epithelium in beef cattle. *Nihon Juigaku Zasshi* 40:21–30. <https://doi.org/10.1292/jvms1939.40.21>
  98. Thakore P, Earley S (2019) Transient receptor potential channels and endothelial cell calcium signaling. *Compr Physiol* 9:1249–1277. <https://doi.org/10.1002/cphy.c180034>
  99. Toft-Bertelsen TL, MacAulay N (2021) TRPping to the point of clarity: understanding the function of the complex TRPV4 ion channel. *Cells* 10. <https://doi.org/10.3390/cells10010165>
  100. Trinidad TP, Wolever TM, Thompson LU (1996) Effect of acetate and propionate on calcium absorption from the rectum and distal colon of humans. *Am J Clin Nutr* 63:574–578. <https://doi.org/10.1093/ajcn/63.4.574>
  101. Ueda T, Shikano M, Kamiya T, Joh T, Ugawa S (2011) The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular Ca<sup>2+</sup> in human esophageal epithelial cells. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 301:G138–147. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00511.2010>
  102. Ueda T, Yamada T, Ugawa S, Ishida Y, Shimada S (2009) TRPV3, a thermosensitive channel is expressed in mouse distal colon epithelium. *Biochem Biophys Res Commun* 383:130–134. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2009.03.143>
  103. Uppal SK, Wolf K, Khahra SS, Martens H (2003) Modulation of Na<sup>+</sup> transport across isolated rumen epithelium by short-chain fatty acids in hay- and concentrate-fed sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87:380–388. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2003.00448.x>
  104. Uppal SK, Wolf K, Martens H (2003) The effect of short chain fatty acids on calcium flux rates across isolated rumen epithelium of hay-fed and concentrate-fed sheep. *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 87:12–20. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0396.2003.00401.x>
  105. Ussing HH, Zerahn K (1951) Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin. *Acta Physiol Scand* 23:110–127. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x>
  106. Velthof GL, Hou Y, Oenema O (2015) Nitrogen excretion factors of livestock in the European Union: a review. *J Sci Food Agric* 95:3004–3014. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7248>
  107. Vincent F, Duncton MA (2011) TRPV4 agonists and antagonists. *Curr Top Med Chem* 11:2216–2226. <https://doi.org/10.2174/156802611796904861>
  108. Voets T, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Bödding M, Droogmans G, Nilius B (2002) Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 277:33704–33710. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204828200>
  109. Vriens J, Owsianik G, Janssens A, Voets T, Nilius B (2007) Determinants of 4 alpha-phorbol sensitivity in transmembrane domains 3 and 4 of the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 282:12796–12803. <https://doi.org/10.1074/jbc.M610485200>
  110. Wadhwa DR, Care AD (2000) The absorption of calcium ions from the ovine reticulo-rumen. *J Comp Physiol B* 170:581–588. <https://doi.org/10.1007/s003600000137>
  111. Walcher L, Budde C, Böhm A, Reinach PS, Dhandapani P, Ljubojevic N, Schweiger MW, von der Waydbrink H, Reimers I, Köhrle J, Mergler S (2018) TRPM8 activation via 3-iodothyronamine blunts VEGF-induced transactivation of TRPV1 in human uveal melanoma cells. *Frontiers in Pharmacology* 9. <https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01234>
  112. Wang H, Yang P, Lu Y, Wang J, Jeon J, Wang Q, Tian JB, Zang B, Yu Y, Zhu MX (2021) Mechanisms of proton inhibition and sensitization of the cation channel TRPV3. *J Gen Physiol* 153. <https://doi.org/10.1085/jgp.202012663>
  113. Watanabe H, Vriens J, Janssens A, Wondergem R, Droogmans G, Nilius B (2003) Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium* 33:489–495. [https://doi.org/10.1016/s0143-4160\(03\)00064-2](https://doi.org/10.1016/s0143-4160(03)00064-2)
  114. Weiner ID, Verlander JW (2016) Recent advances in understanding renal ammonia metabolism and transport. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 25:436–443. <https://doi.org/10.1097/MNH.0000000000000255>
  115. Wertz PW (2021) Roles of lipids in the permeability barriers of skin and oral mucosa. *Int J Mol Sci* 22. <https://doi.org/10.3390/ijms22105229>
  116. Wilkens MR, Kunert-Keil C, Brinkmeier H, Schroder B (2009) Expression of calcium channel TRPV6 in ovine epithelial tissue. *Vet J* 182:294–300. <https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2008.06.020>
  117. Wilkens MR, Mrochen N, Breves G, Schroder B (2011) Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced challenge of calcium homeostasis. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 158:199–207. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.11.008>
  118. Wilkens MR, Muscher-Banse AS (2020) Review: regulation of gastrointestinal and renal transport of calcium and phosphorus in ruminants. *Animal* 14:s29–s43. <https://doi.org/10.1017/s1751731119003197>
  119. Xiang R, Oddy VH, Archibald AL, Vercoe PE, Dalrymple BP (2016) Epithelial, metabolic and innate immunity transcriptomic signatures differentiating the rumen from other sheep and mammalian gastrointestinal tract tissues. *PeerJ* 4:e1762. <https://doi.org/10.7717/peerj.1762>
  120. Zhong C, Farrell A, Stewart GS (2020) Localization of aquaporin-3 proteins in the bovine rumen. *J Dairy Sci*. <https://doi.org/10.3168/jds.2019-17735>

**Publisher's Note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

#### 4.1. Supplementary Material (Liebe et al. 2022)

##### **Supplementary Material**

##### **Effects of butyrate<sup>-</sup> on ruminal Ca<sup>2+</sup> transport: evidence for the involvement of apically expressed TRPV3 and TRPV4 channels**

*Pflügers Archiv – European Journal of Physiology*

Franziska Liebe<sup>1</sup>, Hendrik Liebe<sup>1,2</sup>, Stefan Mergler<sup>3</sup>, Gerhard Sponder<sup>1</sup>, Friederike Stumpff<sup>1,4</sup>

email: stumpff@zedat.fu-berlin.de

<sup>1</sup>Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

<sup>2</sup>Department of Biology, Chemistry, and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Germany

<sup>3</sup>Institute of Experimental Ophthalmology, Charité-Universitätsmedizin Berlin, Germany

<sup>4</sup>Institute of Physiology, Health and Medical University, Potsdam, Germany

##### **A) Ruminal cell culture**

Papillae were cut from the ruminal tissue and repeatedly washed in PBS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> (4 % penicillin and streptomycin), all as described previously [4,15]. The papillae were agitated in a trypsin-EDTA-solution (2.5 g · L<sup>-1</sup> porcine trypsin and 0.2 g · L<sup>-1</sup> EDTA) at 37 °C. After 30 and 60 minutes, the suspension was discarded, while the papillae were agitated again in fresh trypsin-EDTA-solution. This procedure was repeated to gain the following fractions 3, 4, and 5 which were filtered through gauze and centrifuged three times (4 min, 200 g, 23 °C) with removal of supernatant and resuspension in 10 mL PBS with Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> (1 % penicillin and streptomycin). Finally, 5 · 10<sup>5</sup> cells were seeded in medium M1 (M199 with Earle's salts, with stable L-glutamine and 2.2 g · L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, #31150022, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) containing 0.11 g · L<sup>-1</sup> sodium pyruvate, 15 % FBS (foetal bovine serum), 1 % penicillin and streptomycin, 50 mg · L<sup>-1</sup> gentamycin, 2.4 · 10<sup>5</sup> U · L<sup>-1</sup> nystatin, and 100 mg · L<sup>-1</sup> kanamycin into cell culture dishes (Ø 60 mm) coated with collagen A (Biochrom). After two days in culture, cells were washed thrice in PBS without Ca<sup>2+</sup> and Mg<sup>2+</sup> and cultivation continued in medium M2 (Dulbecco's MEM with 4500 mg · L<sup>-1</sup> glucose, stable L-glutamine, 0.11 g · L<sup>-1</sup> sodium pyruvate, and 2.2 g · L<sup>-1</sup> NaHCO<sub>3</sub>, D0822) containing 10 % FBS, 1 % penicillin and streptomycin, 5 ng · mL<sup>-1</sup> epidermal growth factor, and 1 % Insulin/Transferrin/Selenite (Thermo Fisher Scientific).

For immunofluorescence staining, ~ 5 · 10<sup>5</sup> ruminal cells · mL<sup>-1</sup> were seeded directly onto cell culture inserts (Ø 12 mm, PCF membrane, pore size 0.4 µm, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and cultivated with medium M2 for about 20 days. Before staining, transepithelial electrical resistance (TEER) was monitored (Epithelial Volt/Ohm (TEER) Meter, World Precision Instruments, Hertfordshire, UK). Values were corrected for the resistance of control inserts.

## B) p5TO-*bTRPV4*-*Strep*-*YFP* vector

The entire vector contains 9017 base pairs. Ligated into the p5TO vector, the *bTRPV4* coding sequence (2613 base pairs) is highlighted in green, followed by *Strep* tag (blue) with a short bridge structure to *YFP* (yellow fluorescent protein, yellow).

```
GACGGATCGGGAGATCTCCCGATCCCCTATGGTGCACCTCTCAGTACAATCTGCTCTGATGCCGCATAGTTAAGCCAGTATC
TGCTCCCTGCTTGTGTGTTGGAGGTCGCTGAGTAGTGCCGCGAGCAAAATTTAAGCTACAACAAGGCAAGGCTTGACCGACA
ATTGCATGAAGAATCTGCTTAGGGTTAGGCGTTTTGCGCTGCTTCGCGATGTACGGGCCAGATATACGCGTTGACATTGAT
TATTGACTAGTTATTAATAGTAATCAATTACGGGGTCATTAGTTCATAGCCCATATATGGAGTTCGCGGTTACATAACTTACG
GTAATGGCCCGCCTGGCTGACCGCCCAACGACCCCGCCATTGACGTCAATAATGACGTATGTTCCCATAGTAACGCCA
ATAGGGACTTTCCATTGACGTCAATGGGTGGAGTATTTACGGTAACTGCCCACTTGGCAGTACATCAAGTGTATCATATGC
CAAGTACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCGCCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTC
CTACTTGGCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGTATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATA
GCGGTTTGACTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGCACAAAATCAACGGGA
CTTTCCAAAATGTCGTAACAACCTCCGCCCAATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGTGTACGGTGGGAGGTCTATATAAGCAG
AGCTCTCCCTATCAGTGATAGAGATCTCCCTATCAGTGATAGAGATCGTCGACGAGCTCGTTAGTGAACCGTCAGATCGC
CTGGAGACGCCATCCACGCTGTTTTGACCTCATAGAAGACACCGGGACCGATCCAGCCTCCGGACTCTAGCGTTAAACT
TCACCATGGCGGATCCTGGCGAAGCGCCTCGTGGGGCCAGGGGAGATGGCCGAGTCGCCCGGGATGAGAGTGGGC
CCCCCGGGGAGGCTTCCCCCTGTGCATCACTGGCCAACTGTTTCGAGGGGAAGACGGCTCCCCGTGCGCCCTCGCC
AGCTGATGCGGTCGCTCCACCGGCCAGGCGACGGGCGACCCAACTGCGCATGAAGTTCAGGGCGCCTTCGCAAG
GGGGTGCCCAACCCCATCGACCTGCTGGAGTCCACCCTGTACGATCCTCCGTGGTGCCCGGGCCCAAGAAGCGCCCA
TGGACTCGCTGTTGACTACGGCACCTATCGTCACCACCCAGTGACAACAAGCGGTGGAGGAGGAAGGTCATAGAGAAG
CAGCCACAGAGCCCAAAGTCCCGCACCCAGCGCCTCCCATCCTCAAAGTCTTCAACCGGCCTATCCTCTTTGACATC
GTGTCGGGGCTCCACAGCTGACCTGGATGGGCTGCTCCCTTCTTGTGACCCACAAGAAGCGCCTCACGGACGAGG
AGTTCGGGAACCGTCCACCGGAAGACCTGCCTGCCAAAGCCCTGCTGAATCTGAGCAACGGCCGCAATGACACCATC
CCTGTGCTTCTGGACATCGCCGACGCGCACGGGCAACATGCGGGAATTCATCAACTCGCCCTTCGAGACATCTACTACCG
AGGCCAGCCCGCTGCACATCGCCATCGAACGCGCTGCAAAACACTATGTGGAGTCTGCTGGTGGCCCAAGGAGCCGAC
GTCCATGCCAGGCGCGGGGCGCCTTCTCCAGCCAAAGACGAGGGCGGCTACTTCTACTTTCGGTGAGCTGCCCTGT
CGCTGGCTGCCTGCACCAACCAGCCACATCGTCAACTACCTGACGGAGAACC CGACAAGAAGCGGGACATGCGGGC
CCAGGACTCGCGCGCAACACGGTGTGCACGCGCTGGTGGCCATTGCCGACAACACCCGCGAGAACACCAAGTTCGTC
ACCAAGATGACGACCTGCTGCTCAAGTGTGCCCGCCTTCCCCGACAGCAACCTGGAGGCGGTGCTCAACAATGA
CGGCCTCTGCCCTCATGATGGCCGCCAAGACGGGCAAGATTGGGATCTTCCAACACATCATCCGTCCGGGAGGTGACAG
ACGAGGACACCAGGCACCTGTCGCGCAAGTCAAGGACTGGGCCTATGGGCCGGTGTACTCCTCGCTCTACGACCTCTCC
TCCCTGGACACATGTGGGGAGGAGACCTCTGTGCTGGAGATCTGGTGTACAACAGCAAGATCGAGAACC GCCACGAGAT
GCTGGCCGTGGAACCCATCAACGAACTACTCGGGCAAGTGGGGAAGTTCGGGGCTGCTCCTTACATCAACCTGGG
TCTCCTATCTGTGTGCCATGGTGCATCTTACCCTCACCGCCTACTACCAGCCTCTCGAGGGCACTCCGCCATACCCTTACC
GCACCACAATGGACTACCTGAGGCTGGCCGGCGAGATCATCACACTTCTACTGGGATCCTGTTCTTTTTACCAACATCA
AAGACTTGTTCATGAAGAAATGCCCTGGAGTGAACCTCTTTTCATCGACGGCTCCTCCAGCTACTCTACTTCTACTCT
GTGCTGGTATTGTCTCAGCGGCCCTTACCTGGCGGGGATCGAGGCGTACCTGGCCGTATGGTCTTTGCCTTGGTCT
GGGCTGGATGAACGCCCTTACTTCAACCGCGGGCTGAAGCTGACGGGGACCTATAGCATCATGATCCAGAAGATCCTCT
TCAAAGACCTTTCCGCTTCTGCTGGTCTACTTGTCTTTCATGATCGGCTACGCGTCAGCCCTGGTCTCGCTCCTGAACC
CGTGTGCCAACTTGAAGGTGTGCGATGAGGACACGCCAACTGCACAGTGCCACCTACCCCTCATGCCGCGACAGCGAG
ACCTTCAGCACCTTCTCCTGGACCTTCAAGCTCACCATCGGCATGGCGACCTGGAGATGCTGAGCAGCACCAAGTA
CCCCGTGGTCTTTCATCATCCTGCTGGTACGTACATCATCTCACATTCGTGCTGCTCCTTAACATGCTCATCGCCCTCAT
GGGGAGACAGTGGGCCAGGTGTCCAAGGAGAGCAAGCACATCTGGAAGCTGCAGTGGGCCACCACCATCCTGGACATCG
AGCGCTCCTTCCCCGTGTTCTGAGGAAGGCCTTCCGCTCCGGTGAATGGTGACCGTGGGCAAGAGCTCGGACGGCAC
TCCAGACCGCAGGTGGTGTTCAGGGTGGACGAGGTGAACCTGGTCTCACTGGAACCAGAAGTGGGCATCATTACGAGG
ACCCCGGCAAGAACGAGAAGTACCAGTACTATGGCTTTCGACACCGTGGGCCGCTCCGGAGGGATCGCTGGTCTCTCA
GTGGTGGCCCGCTGGTAGAGCTCAACAAGAACTCCAACCCGGACGAGGTGGTGGTCCCTTGGACAACGTAGGGAACC
CCAGTTCGACGGCCACCAGCAGAGTTACCCCTAAGTGGAGGACTGACGACGCCCGCTCTCGGCCTGGAGCCACCC
BCAGTTCGAGAAAGGTGGAGTTCGGAGTGGATCGGGAGTTCGGCCTGGTGCACCCGAGTTCGAAAAAGCGGCC
GCGGTTCGACGTGAGCAAGGGCGAGGAGCTGTTACCAGGGGTGGTGCCCATCCTGGTTCGAGCTGGACGGCGACGTAAC
GGCCACAAGTTCAGCGTGTCCGGCGAGGGCGAGGGCGATGCCACCTACGGCAAGCTGACCTGAAAGTTCATCTGCACCA
CCGGCAAGCTGCCGTGCCCTGGCCACCCTCGTACCACCTTCGGCTACGGCCTGCAGTGCTTCGCCCGCTACCCCGA
CCACATGAAGCAGCAGACTTCTTCAAGTCCGCCATGCCGAAGGCTACGTCCAGGAGCGCACCATCTTCTTCAAGGAGC
ACGGCAACTACAAGACCCGCGCCGAGGTGAAGTTCGAGGGCGACACCCTGGTGAACCGCATCGAGCTGAAGGGCATCGA
CTTCAAGGAGGACGGCAACATCCTGGGGCACAAAGCTGGAGTACAACAGCCACAACGCTATATATGACGGCGACA
AGCAGAAGAACGGCATCAAGGTGAACCTTCAAGATCCGCCACAACATCGAGGACGGCAGCGTGCAGCTCGCCGACCACTAC
CAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCCGTGCTGCTGCCCGACAACCACTACCTGAGCTACCAGTCCGCCCTGAGCA
```

AAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCCTGCTGGAGTTCGTGACCGCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGA  
GCTGTACAAGGGGCCGTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCTGTTGTTGCCCTC  
CCCCGTGCCTTCTTGACCCGGAAGGTGCCACTCCCCTGCTCTTCTTAATAAATGAGGAAATGCATCGCATTGTCTG  
AGTAGGTGCATTCTATTCTGGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAATAGCAGGCATG  
CTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGAGGCGGAAAGAACCAGCTGGGGCTCTAGGGGGTATCCCCACGCGCCCTG  
TAGCGGCGCATTAAAGCGCGGGGTGTGGTGGTTACGCGCAGCGTGACCGCTACACTTGCCAGCGCCCTAGCGCCCGCT  
CCTTTGCTTTCTCCCTTCTTTCTCGCCACGTTCCGCCGCTTTCCCGTCAAGCTCTAAATCGGGGGCTCCCTTTAGGGT  
TCCGATTTAGTGCTTTACGGCACCTCGACCCCAAAAACTTGATTAGGGTGATGTTACAGTAGTGGCCATCGCCCTGAT  
AGACGGTTTTTCGCCCTTTGACGTTGGAGTCCACGTTCTTTAATAGTGACTCTTGTTCAAAACCTGGAAACAACACTCAACCC  
TATCTCGGTCTATTCTTTGATTATAAGGGATTTTGCCGATTTGCGCCTATTGGTAAAAAATGAGCTGATTTAACAAAAAT  
TAACGCGAATTAATCTGTGGAATGTGTGCAGTTAGGGTGTGGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAA  
AGCATGCATCTCAATTAGTCAGCAACCAGGTGTGAAAGTCCCAGGCTCCCAGCAGGCAGAAGTATGCAAAGCATGCAT  
CTCAATTAGTCAGCAACCATAGTCCCGCCCTAACTCCGCCATCCCAGCCCTAACTCCGCCAGTTCGCCCATTTCCG  
CCCCATGGCTGACTAATTTTTTTTATTTATGACAGAGCCGAGGCCGCTCTGCCTCTGAGCTATTCCAGAAGTAGTGAGGA  
GGCTTTTTGGAGGCCTAGGCTTTTGAAAAAGCTCCCGGAGCTTGTATATCCATTTTCGGATCTGATCAGCACGTGATGA  
AAAAGCCTGAACTCACCGCGACGTCTGTCGAGAAGTTTCTGATCGAAAAGTTCGACAGCGTCTCCGACCTGATGCAGCTCT  
CGGAGGGCGAAGAATCTCGTGCTTTCAGCTTCGATGTAGGAGGGCGTGATATGTCCTGCGGGTAAATAGCTGCGCCGAT  
GGTTTCTACAAAGATCGTTATGTTTATCGGCACCTTTCGATCGGCCGCGCTCCCGATTCCGGAAGTGCTTGACATTGGGGAA  
TTCAGCGAGAGCCTGACCTATTGCATCTCCCGCCGTGCACAGGGTGTACAGTTGCAAGACCTGCCTGAAACCGAACTGCC  
CGCTGTTCTGCACCGCGTCCGCGAGGCCATGGATGCGATCGCTGCGGCCGATCTTAGCCAGACGAGCGGGTTCGGCCCA  
TTCGGACCGCAAGGAATCGGTCAATACACTACATGCGCTGATTTTCATATGCGCGATTGCTGATCCCCATGTGTACTG  
CAAACGTGTGATGGACGACCCGTCACTGCGTCCGTGCGCAGGCTCTCGATGAGCTGATGCTTTGGCCGAGGACTGCC  
CGAAGTCCGGCACCTCGTGCACGCGGATTTGCGCTCCAACAATGTCTGACGGACAATGGCCGCATAACAGCGGTCAATTG  
ACTGGAGCGAGGCGATGTTGGGGATTCCCAATACGAGGTGCGCAACATCTTCTTGGAGGCCGTGGTTGGCTTGATG  
GAGCAGCAGACGCGTACTTCGAGCGGAGGCATCCGGAGCTTGCAGGATCGCCGCGGCTCCGGGGCTATATGCTCCGCA  
TTGGTCTTGACCAACTCTATCAGAGCTTGGTTGACGGCAATTTGATGATGCAGCTTGGGCGCAGGGTGCATGCGACGCAA  
TCGTCCGATCCGGAGCCGGGACTGTCCGGCGTACACAAATCGCCCGCAGAAGCGCGGCCGCTTGACCGATGGCTGTGT  
AGAAGTACTCGCCGATAGTGGAAACCGACGCCCCAGCACTCGCCGAGGGCAAAGGAATAGCACGTGCTACGAGATTCG  
ATTCACCGCCGCTTCTATGAAAGTGGGCTTCGGAATCGTTTTCCGGGACCGCGCTGGATGATCTCCAGCGCGGG  
GATCTCATGTGGAGTCTTCGCCACCCCAACTTGTATTGACGCTTATAATGGTTACAAAATAAAGCAATACAAAA  
TTTTCAAAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAGTTGTGGTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGTATACC  
GTCGACCTCTAGCTAGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTCTGTGTGAAATTGTTATCCGCTCACAATCCACAC  
AACATACGAGCCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGCTAACTCACATTAATTGCGTTGCGCTCA  
CTGCCCGCTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCTGTCAGCTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGGGAGAGGCGGTTTGC  
GTATTGGGCGCTTTCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGCTCGGCTCGGCGAGCGGTATCAGCTCAC  
TCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAACGCAGGAAAGAACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGC  
CAGGAACCGTAAAAAGCCGCGTGTGGCTGTTTCCATAGGCTCCGCCCCCTGACGAGCATCAAAAAATCGACGCT  
CAAGTCAGAGGTGGCGAAACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTTTCCCTGGAAGTCCCTCGTGCCTCCT  
GTTCCGACCCTGCCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTCTCCCTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCATAGCTCACGCTGT  
AGGTATCTCAGTTCGGTGTAGGTGCTTCCGCTCCAAGTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGTTTCCGCGACCCGCTGCGC  
CTTATCCGGTAACTATCGTCTTGTAGTCCAACCCGTAAGACACGACTTATCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGAT  
TAGCAGAGCAGGTATGTAGGCGGTGTACAGAGTCTTGAAGTGGTGGCCTAACTACGGCTACACTAGAAGAACAGTATT  
TGATATCTGCGCTCTGCTGAAGCCAGTTACCTCGGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAACAAACCACCGCTGG  
TAGCGGTTGGTTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTCTACG  
GGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACTCAGTTAAGGGATTTTGGTTCATGAGATTATCAAAAAGGATCTTACCTAGATCC  
TTTTAAATTAATAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAAACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTG  
AGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTCTGTTTATCCATAGTTGCCTGACTCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGA  
GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCAATGATACCGCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCA  
GCCAGCCGGAAGGGCCGAGCGCAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCGGGAAG  
CTAGAGTAAGTAGTTCGCCAGTTAATAGTTTGCGCAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCGTGGTGTACGCTCGTCTG  
TGGTATGGCTTCATTACGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGCGAGTTACATGATCCCCATGTTGTGCAAAAAAGCGGTTAG  
CTCCTTCCGGTCTCCGATCGTTGTGCAAGTAAGTTGGCCGCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATTCT  
CTTACTGTGATGCCATCCGTAAGATGCTTTTCTGTGACTGGTGTGAGTACTCAACCAAGTCACTTGTGAGAATAGTGTATGCGGC  
GACCGAGTTGCTCTTGGCCGCGTCAATACGGGATAATACCGCGCCACATAGCAGAACTTTAAAAGTGTCTATCATTGGAA  
AACGTTCTTCCGGGCGAAAACCTCAAGGATCTTACCCTGTTGAGATCCAGTTCGATGTAACCCACTCGTGCACCCAACT  
GATCTTACGATCTTTTACTTTCACCAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAACAGGAAGGCAAAAATGCCGCAAAAAAGGGAATAAG  
GGCGACACGGAATGTTGAATACTCATACTTCTCTTTTCAATATTATTGAAGCATTATCAGGGTATTGTCTCATGAGCG  
GATACATATTTGA ATGTATTTAGAAAAATAAACAATAGGGGTTCCGCGCACATTTCCCGAAAAGTGCCACCTGACGCT

## C) Immunoblotting

For protein extraction, solvents and samples were cooled throughout the experiments to minimize protein degradation.

For bovine rumen, RIPA buffer (500  $\mu$ L; in mmol L<sup>-1</sup>: 25 HEPES, 2 EDTA, 25 NaF, protease inhibitor (cOmplete™, mini, Roche, Basel, Switzerland), 1% sodium dodecyl sulfate (SDS)) was added to the defrosted tissue (200 mg) together with two metal beads. The tissue was homogenized 30 times in a mixer mill for 2 min with alternate 2 min cooling in ice bath (MM200, Retsch GmbH, Haan, Germany), followed by a clarifying spin (15 min, 20 000 g, 4 °C). The supernatant containing the protein was transferred into a new tube.

For HEK-293 cells, after washing with phosphate-buffered saline (PBS), cells were harvested mechanically by scraping in PBS. After centrifugation (500 g, 5 min), the cell pellet was resuspended in PBS (1 mL) and transferred into a new tube. PBS was removed via centrifugation (700 g, 4 min). The cell pellet was lysed in RIPA buffer (100  $\mu$ L) for 30 min with intermediate gentle agitation. Finally, tube was put in an ultrasound bath (5 min) and centrifuged by a clarifying spin (20 min, 15 000 g, 4 °C). The supernatant contained the protein.

All protein samples were stored at -80 °C. Concentrations were determined prior to the experiment using a Pierce™ 660 nm protein assay kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). All samples were denatured in Laemmli sample buffer (2x; #1610737, Bio-Rad Laboratories GmbH, Munich, Germany) supplemented with 2-Mercaptoethanol (5 vol%) and electrophoresed on freshly prepared polyacrylamide-gels (7.5 %, SDS-PAGE) in Tris-Glycine buffer (0.1 % SDS) at 100 mV for 120 min. Electroblothing was performed onto polyvinylidene difluoride membranes (PVDF, Immun-Blot®, Bio-Rad) in Tris-Glycine buffer (0.3 % SDS, 20 % methanol) at 100 mV for 75 min (4 °C). The membranes were blocked in milk (5 %) in Tris-buffered saline supplemented with 0.1 vol% Tween20 (TBST) for 1 h. The membranes were incubated with the primary antibodies (in 2.5 % milk in TBST supplemented with 0.01 % NaN<sub>3</sub>) overnight at 4 °C. After washing with TBST (3 · 5 min), the membranes were incubated with their corresponding secondary antibodies (in 2.5 % milk in TBST) for 45 min at room temperature. After washing with TBST (3 · 5 min) and Tris-buffered saline (5 min), proteins were visualized by use of the Clarity Western ECL Substrate (Bio-Rad).

## A) Modulators and solutions for patch-clamping and calcium imaging

Experimental solutions were stored at -20 °C (for weeks) or +4 °C (for days). Glucose was added to the buffer on the experimental day. TRP-modulators were obtained from Sigma-Aldrich, diluted in DMSO, stored at -20 °C, and added to the reservoir with corresponding bath solution immediately before each experiment at a ratio of  $\leq$  1:1000.

GSK1016790A (C<sub>28</sub>H<sub>32</sub>Cl<sub>2</sub>N<sub>4</sub>O<sub>6</sub>S<sub>2</sub>): TRPV4 agonist  
N-[(1S)-1-[[4-[(2S)-2-[[[(2,4-Dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxy-1-oxopropyl]-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl]benzo[b]thiophene-2-carboxamide

GSK2193874 (C<sub>37</sub>H<sub>38</sub>BrF<sub>3</sub>N<sub>4</sub>O): TRPV4 antagonist  
3-[[1,4'-Bipiperidin]-1'-ylmethyl]-7-bromo-N-(1-phenylcyclopropyl)-2-[3-(trifluoromethyl)phenyl]-4-quinolinecarboxamide

2-APB (C<sub>14</sub>H<sub>16</sub>BNO): TRPV3 agonist  
2-[[Diphenylboranyl]oxy]ethan-1-amine

Ion	concentrations (mmol · L <sup>-1</sup> )										
	I (NaCl)		II (NH <sub>4</sub> Cl)			III (K-Gluconate)			IV (Butyrate <sup>-</sup> )		
	Pip	Bath	Pip	Bath	Bath	Pip	Bath	Bath	Pip	Bath	Bath
	NaGlu	NaCl	NaGlu	NaCl	NH <sub>4</sub> Cl	KGlu	NaCl	NaGlu	NaGlu	NaCl	NaBu
Na <sup>+</sup>	135	135	135	135		6.8	138	138	140	140	140
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>					135						
K <sup>+</sup>	5		5	5	5	127	5	5	5	5	5
Ca <sup>2+</sup>		2		2	2	1.9	1.7	1.7		2	2
Mg <sup>2+</sup>		2		2	2	2.3	0.9	0.9	0.9	1	1
Cs <sup>+</sup>						5					
NMDG <sup>+</sup>									3.2		
Cl <sup>-</sup>	20	148	20	148	148	20.2	147	20.2	20	121	121
Gluconate <sup>-</sup>	120		120			127		127	130	30	
Butyrate <sup>-</sup>											30
HPO <sub>4</sub> <sup>-</sup>							1	1			
EGTA	5		5			10			5		
HEPES	10	10	10	10	10	10	10	10	1	1	1
Glucose		10		10	10		5	5		10	10
MgATP						1					
pH	7.4	7.4	7.4	7.4	7.4	7.2	7.4	7.4	7.4	7.4*)	7.4*)
osmolality <sup>§</sup>	305	305	315	315	315	315	315	315	316	316	316

§ in mosmol · kg<sup>-1</sup> \*) Solutions designated as “NaCl 6.4” and “NaBu 6.4” were buffered to pH 6.4 with MES.

## B) Whole-cell patch-clamp experiments

Patch-clamp experiments were performed in a continuously perfused bath chamber at 23 °C [6,9,12,13]. A DMZ Universal Puller (Zeitz Instruments, Munich, Germany) was used to pull the pipettes. An EPC9 patch-clamp amplifier (HEKA Electronic, Lambrecht, Germany) recorded the currents using Patchmaster Software (HEKA Electronic). Agar bridges to ground the bath and for correction of the initial offset potential were made using the initial NaCl solution (Supplement, Part D). After seal formation and establishment of the whole-cell configuration, HEK-293 cells were clamped at a resting potential of -40 mV, from which the potential was stepped to values between +100 and -120 mV in 10 mV steps for 80 ms each at 5 kHz (Pulse protocol I), allowing analysis of current kinetics and determination of the reversal potential. Afterwards, a continuous pulse protocol in 20 mV steps with a low sampling rate (100 Hz) was applied to monitor solution changes (Pulse protocol II), alternating between these two pulse protocols automatically. The continuous pulse protocols were subsequently merged using Igor Pro 6.37 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA). After each overexpressing HEK-293 cell, a control cell was measured.

## C) Data analysis

Data evaluation was performed using Igor Pro 6.37 (WaveMetrics Inc., Lake Oswego, USA). The Ussing chamber data were recorded at 10 points · min<sup>-1</sup> and were averaged via binomial smoothing using Igor Pro Software before further analysis. The data analysis of patch-clamp

experiments was essentially performed as described in Schrapers *et al.* [13]. Incomplete measurements or those with a series resistance  $\leq 2$  MOhm or an unstable current level were excluded. The reversal potentials ( $V_{rev}$ ) were calculated by linear interpolation between the values above and below a current of zero in the corresponding IV-curve and corrected for liquid junction potentials using JPCalcWin software (School of Medical Sciences, Sydney, Australia) [1].

The relative permeability ratio  $p(K^+)/p(Na^+)$  was estimated from the reversal potentials measured in cells filled with KGlu and superfused with NaGlu solution (Supplement, Part D, III) using the Goldman-Hodgkin-Katz equation [7,13]:

$$V_{rev} = \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left( \frac{p(Na^+) \cdot [Na^+]_{out} + p(K^+) \cdot [K^+]_{out} + p(Cl^-) \cdot [Cl^-]_{in}}{p(Na^+) \cdot [Na^+]_{in} + p(K^+) \cdot [K^+]_{in} + p(Cl^-) \cdot [Cl^-]_{out}} \right)$$

$$\approx \frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left( \frac{p(Na^+) \cdot [Na^+]_{out}}{p(K^+) \cdot [K^+]_{in}} \right)$$

From this, it follows that:

$$\frac{p(K^+)}{p(Na^+)} = \frac{[Na^+]_{out}}{[K^+]_{in}} \cdot e^{-(V_{rev} \cdot \frac{F}{R \cdot T})}$$

Here, T is the temperature (296.15 K), F the Faraday constant ( $\sim 96485 \text{ C} \cdot \text{mol}^{-1}$ ), and R the universal gas constant ( $\sim 8.3 \text{ J} \cdot \text{K}^{-1} \cdot \text{mol}^{-1}$ ). Note that the concentrations of  $[Na^+]_{in}$  and  $[K^+]_{out}$  were small ( $6.8$  and  $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , respectively). Furthermore, the positive reversal potential in NaCl solution suggests that  $p(Cl^-)$  was low, while  $[Cl^-]_{out} = [Cl^-]_{in} = 20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , so that the contribution of  $Cl^-$  could be neglected. The relative permeability ratio  $p(NH_4^+)/p(Na^+)$  was calculated from the difference of  $V_{rev}$  in NaCl and  $NH_4Cl$  solution (Supplement, Part D, II) using the standard relationship [7]:

$$V_{rev}(NaCl) - V_{rev}(NH_4Cl) \approx -\frac{R \cdot T}{F} \cdot \ln \left( \frac{p(Na^+) \cdot [Na^+]_{out}}{p(NH_4^+) \cdot [NH_4^+]_{out}} \right)$$

#### D) Alignment of the human and bovine homologues of TRPV3 and TRPV4

Bovine TRPV4: QXI66840.1 (98.25 kDa)  
 Human TRPV4: NP\_067638.3 (98.25 kDa)  
 Human TRPV4: NP\_001170902.1 (95.01 kDa)  
 Human TRPV3: NP\_001245134.1 (90.72 kDa)  
 Bovine TRPV3: ASO66785.1 (91.61 kDa)

Values e in parenthesis represent molecular weights of proteins, calculated using <https://www.sciencegateway.org/tools/proteinmw.htm>.





ASO66785.1	TQNDVFKRMYDMILLRSRT---WELETTRNNDGLTPLQLAAKMGKAEILKYILSREIKD :..**.:***:.*: : ** : *****:* :*** ** * :*:*: * ** : :	374	ARD
QXI66840.1	EDTRHLSRKFKDWAYGPVYSSLYDLSSLDTCGEETSVEILVYNSKIENRHEMLAVEPIN	456	
NP_067638.3	EDTRHLSRKFKDWAYGPVYSSLYDLSSLDTCGEASVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPIN	456	
NP_001170902.1	EDTRHLSRKFKDWAYGPVYSSLYDLSSLDTCGEASVLEILVYNSKIENRHEMLAVEPIN	422	
NP_001245134.1	KRLRSLRKFTDWAYGPVSSSLYDLTNVDTTT-DNSVLEITVYNTNIDNRHEMLTLEPLH	426	2APB
ASO66785.1	KRLRSLRKFTDWAYGPVSSSLYDLTNVDTTT-DNSVLEIVYNTNIDNRHEMLTLEPLH : * *****.***** *****:.* : ***** ***:**:* ***:**:* :	433	2APB
QXI66840.1	ELLRDKWRKFGAVSFYINVVSYLCAMVIFTLTAYYQPLEGT---PPYPYRTTMDYLRLAG	513	GSK
NP_067638.3	ELLRDKWRKFGAVSFYINVVSYLCAMVIFTLTAYYQPLEGT---PPYPYRTTMDYLRLAG	513	GSK
NP_001170902.1	ELLRDKWRKFGAVSFYINVVSYLCAMVIFTLTAYYQPLEGT---PPYPYRTTMDYLRLAG	479	GSK
NP_001245134.1	TLHMKWKKFAKHMFFLSFCFYFFYNITLTLVSYRPREEEAIPHPLALTHKMGWLQLL	486	
ASO66785.1	TLHMKWKKFAKYMFFLSFCFYFFYNITLTLVSYRPREEEAIPHPLALTHKMGWLQLL ** : **:* . * : : . * : : ** : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	493	
QXI66840.1	EIITLFTGILFFFTNIKDLFMKKCPGVNSLFIDGSFQLLYFIYSVLVIVSAALYLAGIEA	573	
NP_067638.3	EVITLFTGVLFFFTNIKDLFMKKCPGVNSLFIDGSFQLLYFIYSVLVIVSAALYLAGIEA	573	
NP_001170902.1	EVITLFTGVLFFFTNIKDLFMKKCPGVNSLFIDGSFQLLYFIYSVLVIVSAALYLAGIEA	539	
NP_001245134.1	RMFVLIWAMCISVKEGIAIFLLRPSDLQSIILSDAWFHVFVFIQAVLVILSVFLYLFAFAYKE	546	H <sup>+</sup>
ASO66785.1	RMFVLIWAMFISVKEGIAIFLLRPSDLQSIILSDAWFHVFVFAQAVLVILSVFLYLFAFAYKE :..* : : : : : : * : : : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : *	553	H <sup>+</sup>
QXI66840.1	YLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQILFKDLFRLLVYLLFMIGYASALV	633	GSK
NP_067638.3	YLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQILFKDLFRLLVYLLFMIGYASALV	633	GSK
NP_001170902.1	YLAVMVFALVGLGWMNALYFTRGLKLTGTYSIMIQILFKDLFRLLVYLLFMIGYASALV	599	GSK <sup>1</sup>
NP_001245134.1	YLACLVLAMALGANMMLYTRGFQSMGMYSMVIQKILHDVLFKFLFVYIVFLLGFGVALA	606	
ASO66785.1	YLACLVLAMALGANMMLYTRGFQSMGMYSMVIQKILHDVLFKFLFVYIVFLLGFGVALA *** :* :* :* * * * :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :* :	613	
QXI66840.1	SLLNPCANLKVCDHANTVPTYPSCRDSSETFSTFLLDLFKLTIKMGDLEMLSSTKYPV	693	pore
NP_067638.3	SLLNPCANMKVCNEDQNTCTVPTYPSCRDSSETFSTFLLDLFKLTIKMGDLEMLSSTKYPV	693	&gly
NP_001170902.1	SLLNPCANMKVCNEDQNTCTVPTYPSCRDSSETFSTFLLDLFKLTIKMGDLEMLSSTKYPV	659	Ca <sup>2+</sup> <sub>e</sub>
NP_001245134.1	SLIEKCPK-----DNK-----DCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDNIQQNSKYPI	652	pore
ASO66785.1	SLIEKCPK-----SHE-----NCSSYGSFSDAVLELFKLTIGLGDNIQQNSKYPI ** : * : : : . * . : * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	659	pore
QXI66840.1	VFIIILLVYIILTFVLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLR	753	
NP_067638.3	VFIIILLVYIILTFVLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLR	753	
NP_001170902.1	VFIIILLVYIILTFVLLNMLIALMGETVGQVSKESKHIWKLQWATTILDIERSPVFLR	719	
NP_001245134.1	LFLFLITIVYVILTFVLLNMLIALMGETVENVSKESERIWRLQARTILEFEKMLPEWLR	712	H <sup>+</sup> &
ASO66785.1	LFLFLITIVYVILTFVLLNMLIALMGETVENVSKESERIWRLQARTILEFEKMLPEWLR : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	719	2APB
QXI66840.1	KAFRSGEMVTVGKSSDGTDDRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYGFST	813	
NP_067638.3	KAFRSGEMVTVGKSSDGTDDRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYGFST	813	
NP_001170902.1	KAFRSGEMVTVGKSSDGTDDRWCFRVDEVNWSHWNQNLGIINEDPGKNETYQYGFST	779	
NP_001245134.1	SRFRMGELCKVAE-----DFFRLCLRINEVKWTEWKTHVSFLNEDPGPVRRTADFNKIQD	767	H <sup>+</sup>
ASO66785.1	SRFRMGELCKVAE-----DFFRLCLRINEVKWTEWKTHVSFLNEDPGPVRRTADFNKIQD . * * * : . * : * * * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * : * :	774	H <sup>+</sup>
QXI66840.1	VGRLRRDRWSSVPRVVELNKNNSPDEVVPLDVGNGPSCDGHQQSYPPKWRRTDDAPL	871	Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>
NP_067638.3	VGRLRRDRWSSVPRVVELNKNNSPDEVVPLDVGNGPSCDGHQQSYPPKWRRTDDAPL	871	Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>
NP_001170902.1	VGRLRRDRWSSVPRVVELNKNNSPDEVVPLDVGNGPSCDGHQQSYPPKWRRTDDAPL	837	Ca <sup>2+</sup> <sub>i</sub>
NP_001245134.1	SSRNSKTTLNAFEEVEEF-----PETS-----	791	
ASO66785.1	SSRNSKTTLNAFEEIDEF-----PETS----- . * . . . . : * : * :	798	

## References

- Barry PH, Lynch JW (1991) Liquid junction potentials and small cell effects in patch-clamp analysis. *J Membr Biol* 121:101-117. doi:10.1007/BF01870526
- Botte M, Ulrich AKC, Adaixo R, Gnutt D, Brockmann A, Bucher D, Chami M, Bocquet N, Ebbinghaus-Kintscher U, Puettner V, Becker A, Egner U, Stahlberg H, Hennig M, Holton SJ (2020) Cryo-EM

- structural studies of the agonist complexed human TRPV4 ion-channel reveals novel structural rearrangements resulting in an open-conformation. *bioRxiv*:2020.2010.2013.334797. doi:10.1101/2020.10.13.334797
3. Cao X, Yang F, Zheng J, Wang K (2012) Intracellular proton-mediated activation of TRPV3 channels accounts for the exfoliation effect of  $\alpha$ -hydroxyl acids on keratinocytes. *J Biol Chem* 287:25905-25916. doi:10.1074/jbc.M112.364869
  4. Gálfi P, Gäbel G, Martens H (1993) Influences of extracellular matrix components on the growth and differentiation of ruminal epithelial cells in primary culture. *Res Vet Sci* 54:102-109. doi:10.1016/0034-5288(93)90018-b
  5. Gao L, Yang P, Qin P, Lu Y, Li X, Tian Q, Li Y, Xie C, Tian JB, Zhang C, Tian C, Zhu MX, Yao J (2016) Selective potentiation of 2-APB-induced activation of TRPV1-3 channels by acid. *Sci Rep* 6:20791. doi:10.1038/srep20791
  6. Georgi MI, Rosendahl J, Ernst F, Gunzel D, Aschenbach JR, Martens H, Stumpff F (2014) Epithelia of the ovine and bovine forestomach express basolateral maxi-anion channels permeable to the anions of short-chain fatty acids. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 466:1689-1712. doi:10.1007/s00424-013-1386-x
  7. Hille B (2001) *Ion Channels of Excitable Membranes*. 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. doi:10.4236/jbm.2020.82005
  8. Hu H, Grandl J, Bandell M, Petrus M, Patapoutian A (2009) Two amino acid residues determine 2-APB sensitivity of the ion channels TRPV3 and TRPV4. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106:1626-1631. doi:10.1073/pnas.0812209106
  9. Liebe F, Liebe H, Kaessmeyer S, Sponder G, Stumpff F (2020) The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport. *Pflügers Archiv : European journal of physiology* 472:693-710. doi:10.1007/s00424-020-02393-2
  10. Nilius B, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T (2004) TRPV4 calcium entry channel: a paradigm for gating diversity. *Am J Physiol Cell Physiol* 286:C195-205. doi:10.1152/ajpcell.00365.2003
  11. Phelps CB, Wang RR, Choo SS, Gaudet R (2010) Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain. *J Biol Chem* 285:731-740. doi:10.1074/jbc.M109.052548
  12. Rosendahl J, Braun HS, Schrapers KT, Martens H, Stumpff F (2016) Evidence for the functional involvement of members of the TRP channel family in the uptake of Na<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by the ruminal epithelium. *Pflügers Archiv - European Journal of Physiology* 468:1333-1352. doi:10.1007/s00424-016-1835-4
  13. Schrapers KT, Sponder G, Liebe F, Liebe H, Stumpff F (2018) The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *PLoS one* 13:e0193519. doi:10.1371/journal.pone.0193519
  14. Shikano M, Ueda T, Kamiya T, Ishida Y, Yamada T, Mizushima T, Shimura T, Mizoshita T, Tanida S, Kataoka H, Shimada S, Ugawa S, Joh T (2011) Acid inhibits TRPV4-mediated Ca<sup>2+</sup>(+) influx in mouse esophageal epithelial cells. *Neurogastroenterol Motil* 23:1020-1028, e1497. doi:10.1111/j.1365-2982.2011.01767.x
  15. Stumpff F, Georgi MI, Mundhenk L, Rabbani I, Fromm M, Martens H, Günzel D (2011) Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with expression of tight junction proteins. *J Exp Biol* 214:2871-2882. doi:10.1242/jeb.055582
  16. Voets T, Prenen J, Vriens J, Watanabe H, Janssens A, Wissenbach U, Bödding M, Droogmans G, Nilius B (2002) Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4. *J Biol Chem* 277:33704-33710. doi:10.1074/jbc.M204828200
  17. Wang H, Yang P, Lu Y, Wang J, Jeon J, Wang Q, Tian JB, Zang B, Yu Y, Zhu MX (2021) Mechanisms of proton inhibition and sensitization of the cation channel TRPV3. *J Gen Physiol* 153. doi:10.1085/jgp.202012663
  18. Watanabe H, Vriens J, Janssens A, Wondergem R, Droogmans G, Nilius B (2003) Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca<sup>2+</sup>. *Cell Calcium* 33:489-495. doi:10.1016/s0143-4160(03)00064-2

## 5. Diskussion

Die Aufklärung der Resorptionsmechanismen von  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  im Pansen des Rindes bildet die physiologische Grundlage zur Optimierung der Stickstoff- bzw. Proteinfütterung, welche nicht nur aus ökonomischer, sondern vor allem aus ökologischer Sicht wichtig ist. Bei der Leistungsfütterung mit einem hohen Stickstoffanteil müssen große Mengen an ruminal resorbiertem  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  energieaufwendig in der Leber abgebaut und als Harnstoff in der Niere ausgeschieden werden. Somit sinkt die Stickstoffeffizienz (siehe 2.1.1). Die großen Mengen an ausgeschiedenen Stickstoffverbindungen und deren Abbauprodukte beeinträchtigen die Wasser- und Bodenqualität als auch die Ozonschicht (2.1.2).

Vorarbeiten wiesen bereits auf einen divalent-sensitiven, nicht-selektiven Kationen Kanal hin, welcher im Pansen  $\text{NH}_4^+$  resorbieren könnte. Mit der Detektion der *bTRPV3* und *bTRPV4* mRNA im Pansen von Rindern wurden Kandidaten entdeckt (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018). Deren Permeabilität für  $\text{NH}_4^+$  war bisher weder für die humanen, noch für die bovinen Varianten untersucht worden. Ferner fehlten Daten zur Expression auf Proteinebene und über die Lokalisation im ruminalen Epithel, welche im Rahmen dieser Dissertation und den damit verbundenen Publikationen (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022) geliefert wurden.

### 5.1. Die Detektion von bTRPV3 und bTRPV4 im Rinderpansen

#### 5.1.1. Probenmaterial

Es handelte sich bei den eingesetzten nativen Rinderproben um Material von weiblichen Tieren aus der Milchviehhaltung vom Typ Holstein-Friesian (*Bos taurus*). Die Detektion von mRNA für TRPV3, TRPV4, TRPM6 und TRPM7 war signifikant geringer bei Sahiwal-Mix Rindern aus Pakistan (*Bos indicus* Kreuzung), aber das Expressionsmuster ähnelte dem von Holstein-Friesian Rindern (Rabbani et al. 2018). Die Expression von TRPA1 war bei Holstein-Friesian an der Nachweisgrenze. Vergleichbar waren diese Kanäle auf mRNA Ebene beim Schaf nachgewiesen worden, wobei hier TRPA1 deutlich stärker hervortrat (Rosendahl et al. 2016; Geiger et al. 2021). Auf Grundlage der vergleichbaren funktionellen und molekularen Untersuchungsergebnisse bei Sahiwal Rindern (Rabbani et al. 2018) und beim Schaf (Rosendahl et al. 2016; Geiger et al. 2021) könnten meine Ergebnisse vermutlich auf andere Rinderarten als auch auf andere Wiederkäuerarten übertragen werden.

#### 5.1.2. Sequenzierung, Vektorsynthese

Im ersten Schritt wurde aus Pansenproben von Rindern die Sequenzierung von *bTRPV3* (MF063038.1) und *bTRPV4* (MZ028088.1) erfolgreich durchgeführt und deren Daten in die NCBI Genbank eingepflegt. Die Nukleotid-Sequenz von *bTRPV3* ist zu etwa 90 % identisch zu der humanen *TRPV3* Sequenz. Das *bTRPV4* Protein gleicht zu etwa 97 % dem humanen Vertreter.

Der Aminosäure-Abgleich funktionell wichtiger Bereiche (siehe Supplement (Liebe et al. 2022)) zeigte, dass die Porenregion des TRPV3 Kanals zu TRPV4 in zwei Aminosäuren differiert (Voets et al. 2002). Es treten keine Speziesunterschiede (human zu bovin) auf. Zusätzlich sind die TRPV3 Bindungsstellen für  $\text{H}^+$  (Gao et al. 2016; Wang et al. 2021) und 2-APB (Hu et al. 2009), sowie auch die TRPV4 Bindungsstelle für GSK1016790A konserviert (Botte et al. 2020).

Passende Vektoren konnten für die *bTRPV3* und *bTRPV4* Kanäle synthetisiert werden, welche für die Überexpression in HEK-293 Zellen (HEK-293) und für *bTRPV3* auch in *Xenopus laevis* Oozyten (X. Oozyten) angewandt werden konnten.

### TRPA1

Unsere Arbeitsgruppe sequenzierte erfolgreich den *bTRPA1* (GenBank: MF063039.1) aus ruminalem Gewebe. Jedoch gelang die Vektorkonstruktion weder in der Firma ShineGene Bio-Technologies Inc. noch Thermo Fischer Scientific, sodass eine funktionelle Charakterisierung von *bTRPA1* in einem Überexpressionssystem ausblieb. Ferner war die mRNA Detektion für *TRPA1* beim Rind nahe der Nachweisgrenze (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018). Beim Schaf scheint die Expression höher zu sein (Geiger et al. 2021). Da bereits im Colon eine Rolle in der Prostaglandin-vermittelten Signalübertragung gezeigt wurde (Kaji et al. 2012; Manneck et al. 2021b), könnte *TRPA1* auch im Rumen eine eher sensorische Funktion innehaben. Das Auftreten eines Schmerzsyndroms bei *TRPA1 gain-of-function* Mutation ohne Änderungen in der Struktur der Haut lässt ebenfalls auf eine sensorische Funktion schließen (Karashima et al. 2007).

#### 5.1.3. Antikörperetablierung und Proteindetektion im Pansenepithel

In der Regel sind kommerzielle Antikörper nicht an Rindergewebe erprobt. Da im Expressionssystem *bTRPV3* bzw. *bTRPV4* mit einem fusionierten Strep Peptid markiert waren, konnte die Eignung kommerzieller Antikörper für den Nachweis der bovinen Proteine im Immunoblot etabliert werden. Daher wurden im Anschluss die nativen Pansenproben vom Rind nach Möglichkeit parallel auf dieselbe Membran mit dem Expressionssystem aufgetragen.

Die jeweiligen Expressionssysteme zeigten im Immunoblot die aufgrund der Proteinsequenz erwartete Bande für *bTRPV3* bzw. *bTRPV4*, wobei diese sowohl mit einem Anti-Strep Antikörper als auch mit kommerziellen Antikörpern gegen das Kanalprotein nachweisbar war. Durch vergleichbare Bandenhöhe zwischen Anti-Strep und kommerziellen Antikörper konnten für *bTRPV3* ein monoklonaler Antikörper in zwei Expressionssystemen an HEK-293 und X. Oozyten und für *bTRPV4* zwei verschiedene polyklonale Antikörper („ABIN“ und „Thermo“) an HEK-293 etabliert werden (Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022). Beim *TRPV3* Antikörper wurde ferner ein Affinitäts-Test mit dem Peptid durchgeführt (Immunoblot und Immunhistologie), welches zum Herstellen des Antikörpers genutzt wurde (Liebe et al. 2020).

Bei nativen Pansenproben erschien in den Immunoblots sowohl für *bTRPV3* als auch für *bTRPV4* eine ~ 100 kDa Bande. Im Unterschied zum Expressionsmodell erschien beim *bTRPV3* und *bTRPV4* Antikörper jeweils eine zusätzliche und stärker ausgeprägte Bande bei ~ 60 kDa. Es könnte sich hierbei um eine Splice Variante handeln, welche bereits bei humanen *TRPV3* (Szollosi et al. 2018; Liebe et al. 2021) als auch bei murinen *TRPV4* (siehe Datenblatt: OSR00136W, Thermo Fisher Scientific) auftraten. Eine bovine Splice Variante von ~ 60 kDa für *TRPV3* wird auch in der NCBI Datenbank (NP\_001092494.1) neben einer murinen für *TRPV4* (XP\_036021298.1, (Arniges et al. 2006)) aufgeführt. Ob letztere tatsächlich in Rindern präsent ist, bleibt zu klären. Alternativ könnte es sich bei den kurzen Banden um Bruchstücke handeln.

Auch in der Immunfluoreszenz wurden die überexprimierenden HEK-293 bzw. X. Oozyten zuerst angefärbt, bevor die Pansenzellkulturen und native Pansenschnitte untersucht wurden. Die erfolgreiche Expression von *bTRPV3* bzw. *bTRPV4* wurde durch die Fluoreszenz von GFP bzw. YFP bestätigt. YFP war hierbei an *bTRPV4* fusioniert, während GFP als eigenständiges Protein exprimiert wurde. Entsprechend zeigte sich bei GFP eine Grünfärbung des Cytosols, während YFP hauptsächlich die Zellmembran anfärbte. Ferner zeigten HEK-293 und X. Oozyten bei Färbung mit Antikörpern gegen *bTRPV3* oder *bTRPV4* („ABIN“ bzw. „Thermo“) eine eindeutige Expression dieser Proteine in der Zellmembran.

In kultivierten, mehrlagig gewachsenen Pansenzellen war die Lokalisation in der Membran weniger deutlich erkennbar, insbesondere im Vergleich zur Markierung der Tight Junction Proteine (*Zonula Occludens-1* (ZO-1) bzw. Claudin-4). Jedoch war die Differenzierung in dieser mehrschichtigen Pansenzellkultur klar erkennbar und vergleichbar zu nativem Gewebe (siehe 2.2). Die Tight Junction Expression und die transepithelialen Widerstände der Kultur ( $> 700 \Omega \cdot \text{cm}^2$ ) deckten sich mit vorigen Ergebnissen (Stumpff et al. 2011). Basale Zellen zeigten erwartungsgemäß kaum Tight Junctions und nur zelluläre bTRPV3 bzw. schwache bTRPV4 Signale. Die Zellgrenzen der apikalen Zellschichten leuchteten dagegen deutlich aufgrund der Tight Junction Proteine und die zelluläre Markierung der bTRPV3 bzw. bTRPV4 Kanäle verstärkte sich hier. Außerdem wiesen die Membranen eine Co-Markierung von Tight Junction Proteinen und bTRPV3 bzw. bTRPV4 auf. Es ist bekannt, dass TRP genauso wie andere Ionenkanäle nicht nur in der Zellmembran sondern auch intrazellulär funktionelle Aufgaben, wie beispielsweise im Endoplasmatischen Retikulum oder in Lysosomen erfüllen (Dong et al. 2010; Yadav und Goswami 2017). Außerdem bedarf der Einbau in die Zellmembran eine vorige Expression und Transport in intrazellulären Vesikeln (*trafficking*) (Arniges et al. 2006).

Es ist fraglich, ob aufgrund der beobachteten, vornehmlich apikalen Expression in der mehrschichtigen Pansenzellkultur bereits bTRPV3 und bTRPV4 bei ruminalen Einzelzellen in der Zellmembran vorkommt. Andererseits würde die Expression von TRPV3 und/oder TRPV4 funktionell die hohe und divalent-sensitive Stromantwort durch  $\text{NH}_4^+$ -Lösungen in whole-cell Patch-Clamp Untersuchungen an kultivierten, epithelialen Pansenzellen erklären (Abdoun et al. 2005; Rosendahl et al. 2016).

Ein ähnliches Bild zeigte sich in der Immunfluoreszenz des nativen Rinderpensens. Vorwiegend intrazelluläre Expression von bTRPV3 bzw. bTRPV4 tritt ab dem *Stratum basale* auf, mit eindeutiger Abgrenzung zum Subepithelium, welches nur schwach strahlte. Ausgenommen davon war die deutliche Fluoreszenz der ruminalen Gefäßwände, was im Einklang zu dem Nachweis von TRPV3 und TRPV4 im Gefäßendothel und der darunter liegenden glatten Muskulatur von Menschen und Ratten steht (Sonkusare et al. 2012; Pires et al. 2015; Zhang et al. 2018; Thakore und Earley 2019).

Die intensiv fluoreszierende, apikale Abschlusslinie von bTRPV3 bzw. bTRPV4 stellt die apikale Membran des *Stratum granulosum* dar (Liebe et al. 2022). Damit zeigt dies die intensive Transportfähigkeit dieser luminalen Struktur im Einklang mit dem transportphysiologischen Modell des funktionellen Synzytiums (Koefoed-Johnsen und Ussing 1958).

Im Zusammenhang mit den Ergebnissen aus den Immunoblots könnte die intrazelluläre und membranale Fluoreszenz in den Pansenschnitten auf die unterschiedlichen Splice Varianten des bTRPV3 bzw. bTRPV4 zurückzuführen sein. Denkbar wäre eine intrazelluläre Expression der kürzeren Splice Variante, da diese nicht die Sequenz für die Porenregion enthält. Eine andere Erklärung für die Banden  $< 60 \text{ kDa}$  könnte in Zusammenhang mit der diffusen Immunfluoreszenzfärbung des *Stratum corneum* stehen. Der im Keratinisierungsprozess stattfindende enzymatische Abbau der Lipidmembran könnte auch die Kanalproteine abgebaut haben, so dass sich diese im Immunoblot als Bruchstücke zeigen.

Die ruminale Expression kann mit der Detektion der mRNA von bTRPV3 und bTRPV4 (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018) und den Ergebnisse dieser Arbeit auf Protein-Ebene (Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022) als bestätigt angesehen werden, wobei das apikale Expressionsmuster eine Beteiligung am epithelialen Transport nahelegt.

## 5.2. Die Funktion von bTRPV3 und bTRPV4 im Rinderpansen

In Voruntersuchungen wurde auf apikale, nicht-selektive Kationenkanäle als  $\text{NH}_4^+$ -Transporter im Pansen geschlossen, die  $\text{Ca}^{2+}$ -sensitiv waren (siehe 2.2 und 2.3). Um diese Beobachtungen mit dem bTRPV3 und bTRPV4 Kanal in Verbindung zu bringen, wurden aufbauend auf Vorarbeiten (Rosendahl et al. 2016) im Rahmen meiner Dissertationsarbeit unterschiedliche Agonisten am nativen Pansen in der Ussing Kammer getestet. Parallel dazu wurden die Agonisten an bTRPV3 bzw. bTRPV4 überexprimierten HEK-293 in der Patch-Clamp untersucht (Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022).

### 5.2.1. Agonistenwahl

Der TRPV4 Agonist GSK1016790A ist als selektiv und potent für den humanen TRPV4 bekannt (Baratchi et al. 2019), wobei eine Induktion der  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme auch bei nativen HEK-293 festgestellt wurde (Thorneloe et al. 2008; Vincent und Duncton 2011).

Sehr potent soll 2-APB den TRPV3 aktivieren, aber eine Vielzahl an anderen Kanälen soll ebenfalls von 2-APB aktivierbar (u.a. TRPV1, TRPV2, TRPA1, TRPM6) und inhibierbar sein (u.a. TRPM2, TRPM7, TRPM8, TRPC4, TRPC5, TRPC6). Zumindest scheint aber TRPV4 nicht von 2-APB modulierbar zu sein (Li et al. 2006; Hu et al. 2009). TRPM7 wird vom Pansenepithel exprimiert (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018), wird aber durch 2-APB gehemmt, was den  $I_{sc}$  reduziert hätte (Li et al. 2006). TRPM6 wird durch 2-APB stimuliert, gilt aber als ein Kanalprotein, welches vor allem für  $\text{Mg}^{2+}$  permeabel ist. Es bleiben mögliche Effekte von 2-APB auf TRPA1, welcher jedoch vom bovinen Pansenepithel nur in sehr geringem Maße exprimiert wird (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018). In jedem Fall hätte aber eine Nicht-Ansprechbarkeit des nativen Pansenepithels auf 2-APB bisherige Hinweise auf eine funktionelle bTRPV3 Expression im Rinderpansen widerlegt. Da 2-APB in den Ussing Kammer Versuchen den  $I_{sc}$  erhöhte, spricht dieses tendenziell auch gegen eine Expression von TRPC4, TRPC5 und TRPC6. Die für die Auslösung von Effekten in der Ussing Kammer benutzte Konzentration von 2-APB ( $500 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) entsprach in etwa der Konzentration, bei welcher in Patch-Clamp Messungen Effekte an bTRPV3 HEK-293 ausgelöst wurden ( $300 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ). Das *Stratum corneum* scheint diesbezüglich nicht als starke Diffusionsbarriere zu fungieren.

Hingegen zeigte sich, dass die zunächst genutzte GSK1016790A Konzentration ( $0,2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in den Ussing Kammern Versuchen ineffektiv blieb, während bei Erhöhung auf  $2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  ein signifikanter Effekt nachzuweisen war. Im Vergleich dazu, erzielten in der Patch-Clamp die Konzentration von  $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$  bereits deutliche Effekte an bTRPV4 HEK-293. Eine Bindung von GSK1016790A an Keratinozyten des *Stratum corneum* mit Reduktion der Wirksamkeit erscheint möglich. Im Zusammenhang mit den im Vergleich zu bTRPV3 schwachen  $\sim 100 \text{ kDa}$  Bande für bTRPV4 kann jedoch auch an eine geringe funktionelle Expression von bTRPV4 gedacht werden.

### 5.2.2. Ussing Kammer Experimente

Insgesamt liefert die Ussing Kammer Methode reproduzierbare *in vitro* Ergebnisse, die zur Aufklärung der Transportphysiologie verschiedenster Epithelien bei Mensch und Tier geführt hat. Für den Pansen ist diese Methode insbesondere im Zusammenhang mit Fütterungsversuchen etabliert (Gäbel und Aschenbach 2002; Abdoun et al. 2003; Uppal et al. 2003; Abdoun et al. 2005; Abdoun et al. 2010; Rosendahl et al. 2016). Die Ergebnisse lassen grundsätzlich großen Spielraum für Interpretation, da im nativen Gewebe eine Vielzahl an Transportproteinen und Regulationssystemen im Zellverband wirken können. Ferner wurden die untersuchten Gewebe *post mortem* entnommen und eine zeitliche Verzögerung zwischen Entnahme und Versuchsbeginn konnte nicht vermieden werden, wodurch Gewebsschäden

entstehen können. Trotz sorgfältiger Spülung könnten so ruminale Mikroorganismen das Epithel angegriffen haben, wovon im lebenden Rind das Immunsystem geschützt hätte. Des Weiteren kann das Umspülen des Gewebes mit beidseits sauerstoffangereicherten, physiologischen Lösungen nicht die gleichen Verhältnisse wie im vitalen Pansen widerspiegeln. Physiologisch liegen apikal anaerobe Verhältnisse vor, während basolateral stetig Sauerstoff über die subepithelial gelegenen Blutgefäße ankommt, welche sich auch in die Papillen hinein verzweigen. Eine Abweichung der physiologischen Transportvorgänge ist damit schwer auszuschließen. Jedoch zeigte sich beim Rinderpansen, dass Kurzschlussstrom ( $I_{sc}$ ) und Leitfähigkeit ( $G_t$ ) auch über einige Stunden hinweg stabil bleiben, was für eine erhaltene Vitalität des Gewebes spricht (Rosendahl et al. 2016).

Die Veränderung des  $I_{sc}$  und der  $G_t$  in meinen Messungen nach 2-APB bzw. GSK1016790A Applikation (Liebe et al. 2022) sind ähnlich zu vorangegangenen Ussing Kammer Ergebnissen am bovinen und ovinen Pansen mit den Agonisten Menthol und Thymol (Rosendahl et al. 2016). Menthol zeigt neben der Aktivierung des TRPV3 auch Effekte auf TRPM8 und TRPA1 (Macpherson et al. 2006; Vriens et al. 2008; Farco und Grundmann 2013). TRPM8 wird allerdings vom Pansenepithel nicht exprimiert, während TRPA1 kaum nachweisbar war (Rosendahl et al. 2016; Rabhani et al. 2018; Geiger et al. 2021). Die eingesetzte Mentholkonzentration ( $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) hätte außerdem bei TRPA1 eine Hemmung bewirken müssen (Karashima et al. 2007). Thymol aktiviert ebenfalls neben TRPV3 auch TRPA1 (Macpherson et al. 2006; Vogt-Eisele et al. 2007; Lee et al. 2008).

Die NaCl-Lösungen auf beiden Seiten der Ussing Kammer waren identisch, sodass kein elektrochemischer Gradient über das Epithel aufgebaut wurde. Eine parazelluläre Leitfähigkeit kann daher als Grund für die  $I_{sc}$  Zunahme ausgeschlossen werden. Am parallelen Anstieg der  $G_t$  könnte eine parazelluläre und transzelluläre Leitfähigkeit beteiligt sein.

Die beobachtete biphasische Stromantwort nach 2-APB bzw. GSK1016790A Applikation lässt folgende Hypothese zu: Eine TRP Kanal vermittelte (bTRPV3 bzw. bTRPV4) initiale  $\text{Na}^+$ -Aufnahme führt zur Depolarisation mit Anstieg des  $I_{sc}$ , gefolgt von einer Abnahme des  $I_{sc}$  durch den Efflux von  $\text{K}^+$ , der ebenfalls bTRPV3 oder bTRPV4 vermittelt sein könnte. Eine mögliche Beteiligung von bTRPA1 an der 2-APB Antwort kann nicht ausgeschlossen werden.

Im Zusammenhang mit den vorigen Ergebnissen aus  $\text{NH}_4^+$  Ussing Kammer Untersuchungen am Pansen (Gärtner 1963; Bödeker und Kemkowski 1996; Rosendahl et al. 2016) und  $\text{NH}_4^+$  Patch-Clamp Untersuchungen an kultivierten Pansenzellen (Abdoun et al. 2005) kann auf eine Leitfähigkeit für  $\text{NH}_4^+$  bei beiden nicht-selektiven TRP Kanäle geschlossen werden.

### 5.3. Die Charakterisierung von bTRPV3 und bTRPV4

#### 5.3.1. Expressionssysteme

In der vorliegenden Arbeit wurde bTRPV4 in HEK-293 und bTRPV3 in X. Oozyten und HEK-293 überexprimiert, welche grundverschieden zu Epithelzellen des bovinen Pansens sind. Damit wurden zwei fundamental verschiedene Expressionssysteme genutzt, wodurch die Bedeutung jeweiliger Artefakte gemindert werden konnte. Diese Modelle ermöglichen eine genaue Charakterisierung von Strömen an einzelnen Zellen (whole-cell) oder an Membranflecken (inside-out). Die Lösungen auf beiden Seiten der Zellmembran ist frei bestimmbar und das Potential wird auf festgelegte Werte geklemmt, sodass eine genaue Charakterisierung der Leitfähigkeit gelingen kann. Zum Nachteil fehlt aber in diesen Experimenten der hormonelle bzw. der durch den Zellverband bedingte Einfluss auf bTRPV3 bzw. bTRPV4, welcher physiologisch im Rinderpansen gegeben ist. Des Weiteren ist durchaus die endogene Expression von Transportproteinen kritisch einzuschätzen. Während HEK-293 (engl. *human embryonic kidney cells*) eine vom menschlichen Embryo stammende kultivierte

Nierenzelle darstellt, handelt es sich bei *Xenopus laevis* Oozyten (X. Oozyten) um unbefruchtete Eier des Krallenfrosches.

Die Niere ist in der Lage,  $\text{NH}_4^+$  (siehe 2.2.3) aber auch andere Monovalente und Divalente zu leiten (Von Engelhardt et al. 2015). Inwieweit durch die Kultivierung und anhand der Transfektion endogene Transporter unterdrückt werden, verdeutlicht der Vergleich zu HEK-293 welche mit den TRP-freien Vektoren behandelt wurden (Kontrollen, engl. *controls*). Eine erfolgreiche Expression wurde durch Proteindetektion als auch funktionell durch bekannte Agonisten nachgewiesen (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2022). Direkt vor jeder Patch-Clamp Messung an HEK-293 konnte eine erfolgreiche bTRPV3 bzw. bTRPV4 Expression anhand der einhergehenden Fluoreszenz (GFP bzw. YFP) unter dem Mikroskop detektiert werden.

Bei nativen X. Oozyten ist eine  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{NH}_4^+$  Leitfähigkeit beschrieben worden, welche auf endogene nicht-selektive Kationenkanäle hinweist (Burckhardt und Frömter 1992; Liebe et al. 2021). Insbesondere aufgrund der beschriebenen endogenen  $\text{NH}_4^+$ -Leitfähigkeit (Burckhardt und Frömter 1992; Cermak et al. 2000; Caner et al. 2015) wurden Messungen an wasserinjizierten X. Oozyten (Kontrollen, engl. *controls*) den überexprimierten Ergebnissen gegenübergestellt. Erstmals konnten mithilfe der inside-out Patch-Clamp die endogenen Kationenkanäle der nativen X. Oozyten charakterisiert werden. Im Amplitudenhistogramm zeigte sich bei meinen Kontroll-X. Oozyten ausschließlich  $\text{NH}_4^+$  Leitfähigkeiten  $< 100$  pS, die endogenen Kanälen zugeordnet wurden. Nur an den bTRPV3 X. Oozyten traten zusätzlich Leitfähigkeiten  $\geq 100$  pS auf, welche dem bTRPV3 zugeordnet wurden. Eine Anlagerung von bTRPV3 an Untereinheiten endogener Kanäle hätte möglicherweise Heterotetramere bilden können und könnte meine Resultate beeinflusst haben (Cheng et al. 2007; Cheng et al. 2012). Allerdings zeigten die Patch-Clamp Resultate an bTRPV3 X. Oozyten eine recht gute Übereinstimmung mit den Messungen an HEK-293 (Schrapers et al. 2018). Eine erfolgreiche Expression wurde wie bei HEK-293 mithilfe der Detektion des Kanalproteins bestätigt. Nichtsdestotrotz ist die Nutzung der X. Oozyten als Expressionssystem kritisch zu sehen, da die Injektion der *bTRPV3* cRNA an jeder Zelle einzeln und manuell durchgeführt werden musste. Im Gegensatz zu HEK-293 fand eine Expressionskontrolle über Fluoreszenz vor Messbeginn aufgrund der Pigmentierung der X. Oozyten nicht statt. Letztendlich wurde dies durch eine hohe Anzahl an Einzelexperimenten kompensiert.

### 5.3.2. Leitfähigkeit für $\text{NH}_4^+$ und weitere Kationen

TRPV3 und TRPV4 Kanäle sind bekannt für ihre niedrige Selektivität bei der Leitung von monovalenten Kationen ( $\text{K}^+$ ,  $\text{Cs}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ) und  $\text{Ca}^{2+}$  (siehe 2.3.1 und 2.3.2). Weiterhin ist eine  $\text{Mg}^{2+}$  Poreninteraktion mit Block des TRPV3 bekannt (Nilius und Flockerzi 2014; Schrapers et al. 2018). Zudem war aus den Ussing Kammer Untersuchungen am bovinen Pansen als weiteres Monovalent die  $\text{NH}_4^+$  Leitfähigkeit für bTRPV3 und bTRPV4 vorgeschlagen worden (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018; Liebe et al. 2022). Diese  $\text{NH}_4^+$  Leitfähigkeit wurde neben der für  $\text{K}^+$  und  $\text{Na}^+$  isoliert in Patch-Clamp Untersuchungen sowohl in der whole-cell als auch bei bTRPV3 in der inside-out Konfiguration an HEK-293 bzw. bei bTRPV3 auch an X. Oozyten gezeigt (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022).

Die erfolgreiche Expression von bTRPV3 wurde durch Stimulation der Ströme mit entsprechenden Agonisten bestätigt (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2022). Für den funktionellen Nachweis der bTRPV4 Expression wurde der TRPV4-spezifische Agonist GSK1016790A ( $50 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) und der TRPV4-spezifische Antagonist GSK2193874 ( $1 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) in whole-cell Patch-Clamp Messungen genutzt. Einige bTRPV4 HEK-293 reagierten deutlich auf GSK2193874, aber der Effekt war statistisch nicht signifikant (Liebe et al. 2022).



In whole-cell Patch-Clamp Experimenten konnte eine  $\text{NH}_4^+$  Leitfähigkeit sowohl für bTRPV3 als auch für bTRPV4 gezeigt werden (Schrapers et al. 2018; Liebe et al. 2022). Zusätzlich wurde beobachtet, dass der TRPV4-selektive Agonist GSK1016790A an bTRPV3 HEK-293 keinen Effekt hat (Liebe et al. 2022). Dies unterstützt die These, dass der GSK1016790A Effekt am Pansen in den Ussing Kammer Versuchen dem bTRPV4 zuzuordnen ist (Liebe et al. 2022).

Für bTRPV3 X. Oozyten konnte in inside-out Messungen eine deutlich höhere Leitfähigkeit für  $\text{NH}_4^+$  als für  $\text{Na}^+$  und eine sehr geringe Leitfähigkeit für  $\text{NMDG}^+$  festgestellt werden (Liebe et al. 2020). Dabei waren die Leitfähigkeiten von bTRPV3 ähnlich zu parallel durchgeführten Patch-Clamp Messungen am humanen TRPV3 (Liebe et al. 2021). Die absolute bTRPV3 Leitfähigkeiten für  $\text{NH}_4^+$  in symmetrischer Lösungskonfiguration lag bei  $\sim 144$  pS ( $n = 9$ ) (Liebe et al. 2020). Dieser Wert wurde in für X. Oozyten angepassten Lösungen erzielt, welche eine deutlich niedrigere Osmolalität ( $180 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ) besaß als HEK-293 bzw. für Säugerzellen übliche Lösungen ( $\sim 300 \text{ mosmol} \cdot \text{kg}^{-1}$ ). Bei der Umrechnung auf Osmolalität wie für HEK-293 ( $\sim 240$  pS) deckten sich die Ergebnisse. Die deutlich kleinere Leitfähigkeit für  $\text{Na}^+$  ( $\sim 128$  pS) stimmte ebenfalls überein (Schrapers et al. 2018). Aus Messungen in der whole-cell Konfiguration ergibt sich auch für bTRPV4 eine höhere Leitfähigkeit für  $\text{NH}_4^+$  als für  $\text{Na}^+$ .

Die Applikation von TRPV3 bzw. TRPV4 Agonisten in der Ussing Kammer bewirkte am nativem Pansenepithel eine biphasische Stromantwort mit hypothetischen, hauptverantwortlichen Kationenströmen: Influx von  $\text{Na}^+$  und Efflux von  $\text{K}^+$ . Mittels der whole-cell Patch-Clamp Technik an bTRPV3 und bTRPV4 HEK-293 konnte diese Hypothese untermauert werden, da in der Tat die verwandten Agonisten neben einer Erhöhung der  $\text{Na}^+$ -Permeabilität auch eine Stimulation der  $\text{K}^+$ -Leitfähigkeit bewirkten (Liebe et al. 2022). Hierbei zeigten die bTRPV3 und bTRPV4 HEK-293 eine etwas höhere Leitfähigkeit für  $\text{K}^+$  als für  $\text{Na}^+$ , was zusätzlich für bTRPV3 auch in whole-cell Messungen an HEK-293 (Schrapers et al. 2018) und in inside-out Messungen an X. Oozyten (Liebe et al. 2020) gezeigt wurde. Wie für nicht-selektive Kationenkanäle zu erwarten war, fiel bei diesen Ionen der Permeabilitätsquotient nicht so groß aus wie bei den Kontrollen, bei denen die Leitfähigkeit für  $\text{K}^+$  deutlich höher war als für  $\text{Na}^+$ . In den Kontrollen dominierten offensichtlich  $\text{K}^+$  selektive Kanäle.

Sowohl in meinen Patch-Clamp Messungen als auch in meinen Messungen mit pH-sensitiven Mikroelektroden konnte eine Hemmung der monovalenten Leitfähigkeiten durch divalente Kationen gezeigt werden (Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022), welche zuvor an nativem Pansenepithel beobachtet worden war (Leonhard et al. 1990; Schultheiss und Martens 1999; Leonhard-Marek 2002). Diese Leitfähigkeit konnte durch Zugabe von EDTA und/oder Entnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  stimuliert werden. In diesen Patch-Clamp Messungen zeigten physiologische Konzentrationen an divalenten Kationen in der Badlösung den bTRPV3 und bTRPV4 auswärts gleichrichtend (engl. *outward rectification*). Hierbei kommt es bei Depolarisation zu einer stärkeren Stromantwort als bei Hyperpolarisation, die insbesondere bei divalent-freien Pipettenlösungen ausgeprägt war. Eine gekrümmte Strom-Spannungskennlinie resultierte. Erklärbar ist diese kinetische Begünstigung des Effluxes durch einen einseitigen Block des Kationen-Influx an der Mündung des Kanals durch extrazelluläres  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{Mg}^{2+}$  bei Hyperpolarisation. Hingegen wird bei Depolarisation durch elektrostatische Abstoßung der Block gelöst und monovalente Kationen strömen ungehindert aus der Pipettenlösung ins Bad. Dieser Effekt könnte die Spannungsabhängigkeit der  $\text{Na}^+$  Leitfähigkeit des Pansenepithels erklären (Lang und Martens 1999), welcher auch an nativen Epithelzellen des Pansens im Patch-Clamp Experiment beobachtet wurde (Leonhard-Marek et al. 2005).

In Ussing Kammer Versuchen am Pansenepithel ist seit langem eine Stimulation des  $\text{Na}^+$  Transportes durch SCFA bekannt, welche hauptsächlich mit einer Stimulation des NHE erklärbar ist (Gäbel et al. 1991; Rabbani et al. 2011). Messungen mit pH-sensitiven

Mikroelektroden belegen, dass luminale SCFA Applikation beim nativen Pansenepithel zu einem intrazellulären pH-Abfall führen (Abdoun et al. 2010). Ferner konnte mehrfach gezeigt werden, dass sich die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme des Pansenepithels durch SCFA stimulieren lässt (Schröder et al. 1997; Schröder et al. 1999; Uppal et al. 2003; Schröder et al. 2015). Butyrat zeigte sich dabei im Vergleich zu Propionat und Acetat als deutlich effektiver (Schröder et al. 1999) und wurde zur Vereinfachung des Experiments einer Mischung mehrerer SCFA bevorzugt.

Die bTRPV3 überexprimierten HEK-293 zeigten eine deutliche Stimulation der  $\text{Na}^+$  Ströme nach NaBu ( $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) Zugabe, was zuverlässiger und signifikant stärker bei einem pH von 6,4 als 7,4 zu beobachten war. Erstapplikation in pH 6,4 oder Vorbehandlung mit SCFA bei pH 7,4 beeinflussten das Ergebnis nicht. Dabei entspricht ein pH von 6,4 dem physiologischen Milieu im Pansen. Die bTRPV4 HEK-293 und die Kontrollen reagierten hingegen nicht signifikant auf das extrazelluläre NaBu. Vermutlich führte der Einstrom von SCFA zu einer intrazellulären Ansäuerung, welche über intrazelluläre Protonen bTRPV3 stimulierte. Dieser Stimulationsmechanismus konnte bereits für TRPV3 anderer Spezies gezeigt werden (Hu et al. 2009; Cao et al. 2012). Somit lässt sich die Stimulation der  $\text{Na}^+$  Ströme durch SCFA in den Ussing Kammer Untersuchungen im Pansen zumindest anteilig mit der Stimulation des bTRPV3 erklären.

### 5.3.3. $\text{NH}_4^+$ bewirkt intrazellulären pH-Abfall

An ruminalen Epithelien von Schaf und Rind (Lu et al. 2014; Rosendahl et al. 2016) als auch an nativen X. Oozyten (Burckhardt und Frömter 1992) wurde bei einer  $\text{NH}_4^+$ -Applikation mithilfe doppellumiger, pH-sensitiver Mikroelektroden ein Anstieg der Stromantwort einhergehend mit intrazellulärer Ansäuerung beobachtet. Ebenfalls bewirkte  $\text{NH}_4^+$ -Exposition eine Stimulation der  $\text{Na}^+$ -Aufnahme mittels NHE (Abdoun et al. 2005).

Die Untersuchungen von bTRPV3 X. Oozyten mit pH-sensitiven Mikroelektroden in dieser Arbeit bestätigen erneut die Leitfähigkeit dieses Kanals nicht nur für  $\text{Na}^+$  und  $\text{K}^+$  sondern auch für  $\text{NH}_4^+$  (Liebe et al. 2020). Des Weiteren zeigte sich bei  $\text{NH}_4^+$ -Exposition ein intrazellulärer pH-Abfall neben einer Depolarisation. Interessanterweise wurde wie in Voruntersuchungen anderer (Burckhardt und Frömter 1992) auch bei den Kontrollen eine Ansäuerung und Depolarisation beobachtet, die fast das Ausmaß der bTRPV3 überexprimierenden X. Oozyten erreichte. Die mutmaßlich verantwortlichen, endogenen Kationenkanäle konnten mittels meiner inside-out Patch-Clamp Messungen an Kontroll-X. Oozyten nachgewiesen werden (Liebe et al. 2020). In nativen X. Oozyten, insbesondere aber in bTRPV3 X. Oozyten scheint eine  $\text{NH}_3$ -Diffusion sehr gering auszufallen im Vergleich zum eindeutig dominierenden  $\text{NH}_4^+$ -Transport mit einhergehender intrazellulärer  $\text{H}^+$  Dissoziation (Abb. 5).

An bTRPV3 X. Oozyten zeigte sich anders als an Kontroll-X. Oozyten nach  $\text{Ca}^{2+}$  Entfernung mit EDTA Zugabe eine Depolarisation. Die Ursache dürfte ein verstärkter Einstrom von  $\text{Na}^+$  nach Entfernung divalenter Kationen sein. Auch hier zeigte sich erneut die Konkurrenz zwischen divalenten und monovalenten Kationen an der Porenregion von bTRPV3 (Schrapers et al. 2018). Diese Ergebnisse ließen sich auch beim humanen Vertreter des TRPV3 reproduzieren (Liebe et al. 2021).

### 5.3.4. SCFA steigern die intrazelluläre Calciumkonzentration

In den bisher beschriebenen Experimenten zeigte sich  $\text{Ca}^{2+}$  deutlicher als Blocker für monovalente Ströme. Bei anderen Spezies ist ferner die  $\text{Ca}^{2+}$ -Permeabilität des TRPV3 etabliert (siehe 2.3.1) und konnte auch für den bovinen Vertreter in der inside-out Patch-Clamp und mittels Messung der intrazellulären  $[\text{Ca}^{2+}]$  in HEK-293 bestätigt werden (Schrapers et al. 2018). Ferner zeigen zahlreiche Untersuchungen am nativen Pansenepithel, dass SCFA die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  über einen elektrogenen Aufnahmemechanismus steigern (Höller et al.

1988; Schröder et al. 1997; Schröder et al. 1999; Wadhwa und Care 2000; Uppal et al. 2003; Leonhard-Marek et al. 2010; Wilkens et al. 2011; Schröder et al. 2015). Die bekannten  $\text{Ca}^{2+}$  Transporter des Gastrointestinaltrakts (TRPV5 und TRPV6) werden bemerkenswerterweise vom Pansenepithel nicht exprimiert (Wilkens et al. 2020). Um den funktionellen Untersuchungen eine molekulare Identität zu geben, wurde eine NaBu Stimulation der  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme bei bTRPV3, bTRPV4 und Kontroll-HEK-293 versucht. Hierbei wurden die Lösungen ausschließlich auf den im Pansen typischen pH 6,4 eingestellt. Die intrazelluläre  $[\text{Ca}^{2+}]$  wurde dann mittels eines Fluoreszenzfarbstoffs (Fura-2) und einem Imaging Verfahren gemessen, welches die Analyse einzelner Zellen erlaubte (engl. *single cell calcium fluorescence imaging*, kurz Calcium-Imaging) (Liebe et al. 2022).

Im Unterschied zu den Patch-Clamp Ergebnissen zeigte sich im Calcium-Imaging eine signifikante SCFA Stimulation der  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme nicht nur in bTRPV3, sondern auch in bTRPV4 HEK-293 (Liebe et al. 2022). Diese scheinbare Diskrepanz könnte darauf beruhen, dass der SCFA-Effekt auf bTRPV3 durch die Änderungen im intrazellulären pH bewirkt wurde, während der SCFA-Einstrom eine Osmolaritätssteigerung und Zellschwellung bewirkte, was bTRPV4 stimulierte. Diese Hypothese wird durch die vorliegende Arbeit und durch Literaturangaben gestützt, welche eine Stimulation des TRPV3 durch intrazelluläre pH Änderungen (Hu et al. 2009; Cao et al. 2012; Gao et al. 2016) und eine Stimulation des TRPV4 durch Volumenänderungen mit Dehnung der Membran postulieren (Nilius und Flockerzi 2014; Moore und Liedtke 2017; Toft-Bertelsen und Macaulay 2021). In der whole-cell Patch-Clamp Konfiguration stand das Cytosol in direkter Verbindung mit dem großen Volumen der Glaspipette (Abb. 4), weswegen apparativ bedingt keine Volumenänderungen zu erwarten sind. Demgegenüber waren im Calcium-Imaging die Zellen intakt und der Intrazellularraum auf das zelleigene Cytosol limitiert. Somit ist aufgrund des unterschiedlichen Wirkmechanismus und apparativen Aufbaus nur im Calcium-Imaging und nicht mit der Patch-Clamp Technik der Effekt auf das Zellvolumen und damit bTRPV4 erkennbar.

Der nach SCFA Zugabe experimentelle Verlauf eines höheren Peaks mit etwas geringer Plateau  $[\text{Ca}^{2+}]$  lässt sich mit einem negativen Feedback durch Bindung von intrazellulärem  $\text{Ca}^{2+}$  an Calmodulin der *ankyrin repeat domain* erklären (Watanabe et al. 2003; Phelps et al. 2010).

Überraschenderweise war durch NaBu 6.4 ebenfalls eine signifikante Steigerung der  $[\text{Ca}^{2+}]$  bei den Kontrollzellen nachweisbar. Diese war jedoch deutlich kleiner als in bTRPV3 und bTRPV4 und spiegelt wahrscheinlich die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus Protein Komplexen und ungelösten Salzen des Cytosols wider, welches klassischerweise durch intrazellulären pH-Abfall mit Bindung von  $\text{H}^+$  an die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bindungsstellen geschieht (Molinari und Nervo 2021). Aufgrund der signifikanten NaBu-Stimulation der  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme können sowohl der bTRPV3 als auch der bTRPV4 funktionell als Kandidaten für die ruminale  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme angesehen werden. Eine Kopplung der elektrogenen  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme mit der aus der Literatur bekannten ruminale Protonenpumpe dürfte dabei funktionell dem vorgeschlagenen  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiport ähneln (Lutz und Scharer 1991; Schröder et al. 1999).

Insbesondere bTRPV3 erscheint für die  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption im Pansen bedeutsam. Unterstützt wird diese Schlussfolgerung durch die Wirkung von Menthol auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Aufnahme in Versuchen an bTRPV3 HEK-293 (Schrapers et al. 2018) und am nativen Pansenepithel (Rosendahl et al. 2016; Geiger et al. 2021), mit entsprechenden Wirkungen auf die Calciumhomöostase *in vivo* (Braun et al. 2019; Geiger et al. 2021).

Hingegen kommt bTRPV4 als hervorragend geeigneter Kandidat für die hohe Zunahme von Strom und Leitfähigkeit des Pansenepithels bei Erhöhung der luminalen Osmolarität in Frage (Lodemann und Martens 2006). Die  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption könnte eine untergeordnete Aufgabe des bTRPV4 im Pansen sein.

## 5.4. Die Verhornung des Pansenepithels

In den histologischen Untersuchungen an Rindern aus der konventionellen Milchtierhaltung zeigte sich ein Färbemuster, welches eine Differenzierung der Epithelzellen des Pansens einhergehend mit der Wanderung von bTRPV3 und bTRPV4 aus dem Zellinneren in die apikale Membran des *Stratum granulosum* vermuten lässt. Diese Hypothese wurde durch Untersuchungen von mehrschichtigen Pansenzellkulturen gestützt (Liebe et al. 2022).

Die funktionelle Expression von TRPV4 in mehrschichtigen Plattenepithelien, wie in Haut und Speiseröhre ist gut untersucht (Shikano et al. 2011; Ueda et al. 2011). Aus letzterem entwickelt sich im Rinderembryo das ruminale Epithel (Mutoh und Wakuri 1989; Weyrauch et al. 2009). Während sich bei *gain-of-function* Mutationen des TRPV3 beim Menschen eine Verhornungsstörung der Haut zeigt (siehe 2.3.1), bewirkt eine TRPV4 Funktionsstörung keine Hauterkrankungen (siehe 2.3.2). Aufgrund der hohen Expression und großen Breite an Funktionen wird TRPV3 auch als wichtigster Kanal in der Haut angesehen (Blaydon und Kelsell 2014). Jedoch ist der volumen-sensitive TRPV4, der bei Anschwellen der Zelle aktiviert wird (Toft-Bertelsen und Macaulay 2021), ein wichtiger Bestandteil bei der osmotischen Homöostase der Haut (Blaydon und Kelsell 2014). Des Weiteren ist TRPV4 bei der Ausbildung von Tight Junction und Adherens Junction Proteinen und somit für die Hautbarriere bedeutsam (Sokabe et al. 2010; Blaydon und Kelsell 2014).

### Physiologische Verhornung

Physiologisch differenzieren die Zellen des mehrschichtigen Plattenepithels, wie Pansen und Haut von basal (*Stratum basale*) nach apikal (*Stratum corneum*) (Weyrauch et al. 2009; Liebich 2010). Bei diesem Verhornungsprozess bzw. Keratinisierung (Orthokeratose), wachsen Granula des ER und werden als Keratohyalin granula im namensgebenden *Stratum granulosum* sichtbar und bringen damit die Formierung der epidermalen, verhornten Zelloberfläche voran (Freeman und Sonthalia 2020). Gleichzeitig degeneriert der Zellkern. Die Zellen flachen langsam durch Abbau des Zytoskeletts und der Zellorganellen ab und werden stabiler durch Bildung von Intermediärfilamenten, die dann wiederum gebündelt Tonofibrillen bilden. Damit wandeln sich letztlich Keratinozyten in Korneozyten um (Freeman und Sonthalia 2020). Korneozyten sind durch die verhornte Proteinhülle mechanisch besonders widerstandsfähig (Kalinin et al. 2002). Weiterhin bilden die aufliegenden Lipidhüllen der Korneozyten eine natürliche Barriere (Kalinin et al. 2002). Diese interzellulären Lipidlamellen fehlen weitestgehend in den mukösen Schleimhäuten und im Pansenepithel. Insbesondere beim Pansen wird durch diese Zellzwischenräume des *Stratum corneum* der Durchtritt von Wasser und Elektrolyten, mit nachfolgender Aufnahme über die apikale Membran des *Stratum granulosum* möglich.

Für die Keratinisierung ist die Beteiligung vieler Proteine nötig. Während das Protein Filaggrin die Filamente bündelt und zu Keratin Intermediärfilamenten kondensiert, bilden die quervernetzten Proteine Loricrin und Involucrin hauptsächlich die verhornte Proteinhülle der zukünftigen Korneozyten (Freeman und Sonthalia 2020). Die Quervernetzung wird durch Transglutaminasen katalysiert (Kalinin et al. 2002). Im hohen Ausmaß wird als Ausgangssubstanz Glutamin benötigt, welches umgekehrt wiederum aus  $\text{NH}_4^+$  im ER gebildet werden kann (Gleichung 2). Die verantwortliche Glutaminsynthetase wurde bereits in der Haut und im Pansen nachgewiesen (Salem et al. 1973; Danielyan et al. 2009).

## Parakeratose

In der vorliegenden Arbeit zeigten die Epithelien des Rinderpensens deutliche Zeichen für eine Parakeratose (Lavker et al. 1969; Steele et al. 2009).

Die Parakeratose ist gekennzeichnet durch gesteigerte Mitoseraten im *Stratum basale* und einer frühzeitigen Keratohyalingranula Bildung im *Stratum spinosum*. So verlieren die Zellen des *Stratum granulosum* bereits verfrüht ihren Zellkern und weitere Zellorganellen (Tamate und Kikuchi 1978), flachen ab und gleichen damit den Zellen des *Stratum corneum*. Umgekehrt können sich bei diesem gestörten Verhornungsprozess Zellkerne im *Stratum corneum* wiederfinden (Steele et al. 2009), wobei diese Schicht verstärkt zum Ablösen neigt (Lavker et al. 1969; Tamate und Kikuchi 1978). Postuliert wurde, dass der Nachweis an Tight Junction Proteinen Klarheit über die Zugehörigkeit zum *Stratum granulosum* geben soll (Tamate und Kikuchi 1978). Dabei scheint auch die intensive Expression von bTRPV4 und bTRPV3 in der apikalen Membran ein Kriterium zur Abgrenzung des *Stratum granulosum* vom *Stratum corneum* darzustellen (Liebe et al. 2022).

Die hohe Verfütterung an proteinreicher und leicht verdaulichen Kohlenhydraten in der Milchviehhaltung bewirkt im Pansen eine Steigerung der SCFA und  $\text{NH}_4^+$ -Konzentration und geht mit einem Absinken des pH einher (siehe 2.5.1). Auf Dauer adaptiert das Pansenepithel, wodurch höhere Transportraten ermöglicht werden (Aschenbach et al. 2019).

Für den Säure-Basen Haushalt des Pansens erscheint es günstig, dass  $\text{NH}_4^+$  bei der Resorption ein  $\text{H}^+$  aus dem Lumen mitzieht (Abdoun et al. 2005; Aschenbach et al. 2011). Hierdurch erhält die energieaufwändige Stickstoff-Zirkulation (siehe 2.1 und Abb. 5) eine zusätzliche Funktion und erklärt die hohe  $\text{NH}_4^+$ -Resorption, welche bei Konzentratfütterung *in vivo* zu beobachten ist (Huntington 1986; Bödeker et al. 1992a; Bödeker et al. 1992b; Uppal et al. 2003).

$\text{NH}_4^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  strömen durch bTRPV3 und bTRPV4 apikal ins Epithel. Genauso gelangt über andere Wege verstärkt SCFA ins Epithel (Abb. 6). SCFA bewirken über intrazelluläre Ansäuerung und durch Zellschwellung eine Stimulation von bTRPV3 und bTRPV4, deren Offenwahrscheinlichkeit sich erhöht und darüber den Einstrom der Ionen verstärkt.

Des Weiteren kann im Epithel unter diesen Bedingungen verstärkt  $\text{NH}_4^+$  zu Glutamin umgesetzt werden und zusätzlich erhöht der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom die Transglutaminase Aktivität (Abb. 5). Dies könnte die bekannte kraftfutterbedingte Parakeratose des Pansenepithels erklären (Uppal et al. 2003; Steele et al. 2011; Baaske et al. 2020), die auch in den histologischen Schnitten dieser Studie sichtbar war (Liebe et al. 2022). Diese histologischen Veränderungen ähneln dem des Olmsted Syndroms des Menschen, wobei hier vermutlich die erhöhte Offenwahrscheinlichkeit durch Mutation des TRPV3 ursächlich ist (Nilius und Biro 2013). Anzumerken sei hierbei, dass in der Haut der TRPV6 Kanal offenbar wesentlich am  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und damit an dem Differenzierungsprozess des Epithels beteiligt ist (Blaydon und Kelsell 2014). Ein Nachweis der mRNA für TRPV5 oder TRPV6 im Pansenepithel gelang bisher nicht (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018; Wilkens et al. 2020; Geiger et al. 2021).

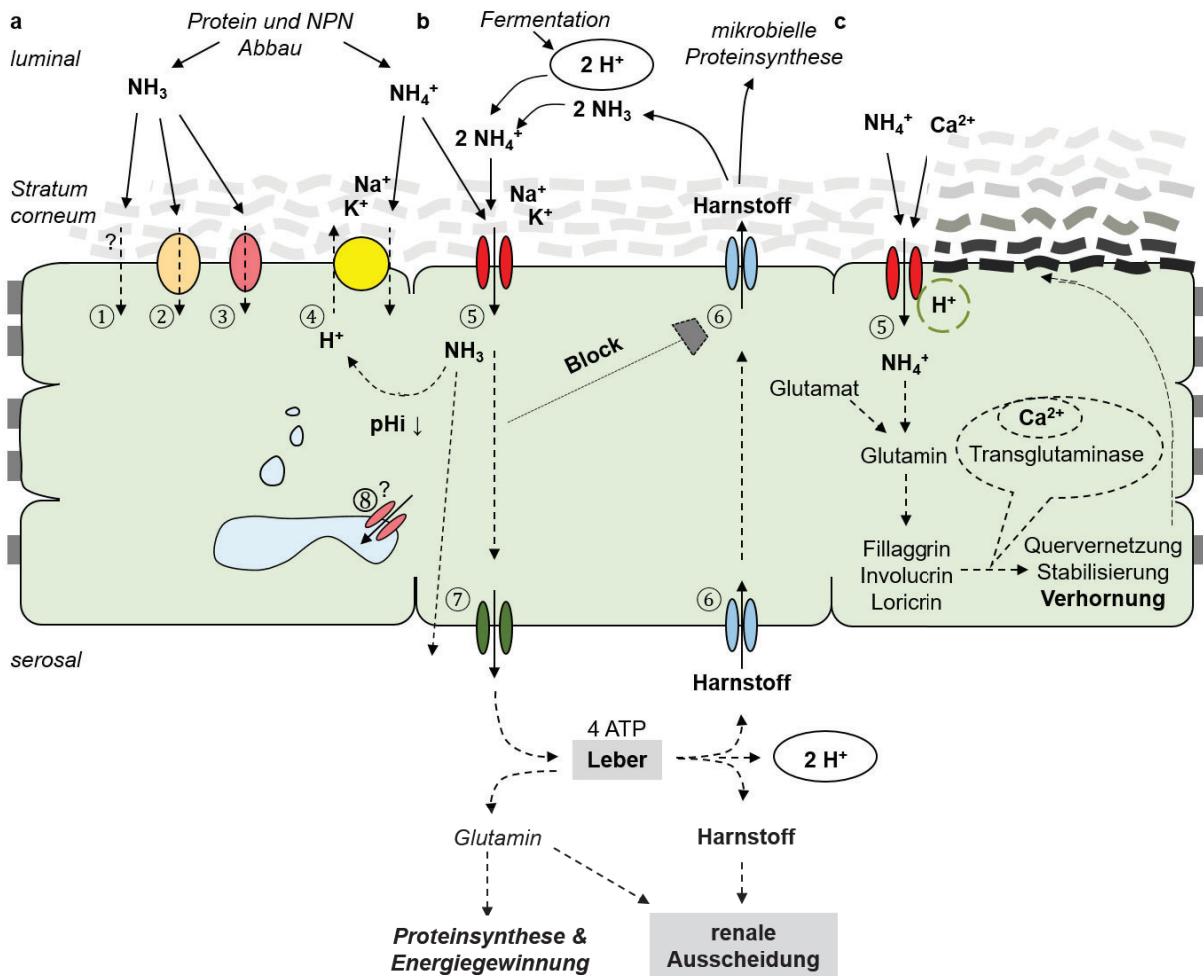


Abb. 5  $\text{NH}_3$  bzw.  $\text{NH}_4^+$  Aufnahmewege und Verhornung im Pansenepithel des Rindes.

Diese Übersicht fasst die möglichen Aufnahmewege für  $\text{NH}_3/\text{NH}_4^+$  zusammen. In a) werden mögliche  $\text{NH}_3$ -Absorptionswege dargestellt wobei lipide Diffusion (①) und Rh-Proteine (②) im Pansen unwahrscheinlich erscheinen, aber über eine Aufnahme durch die nachgewiesenen Aquaporine (③) diskutiert werden kann. Die aus der Nieren- oder Magenphysiologie bekannte  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -ATPase (④) könnte theoretisch  $\text{NH}_4^+$  resorbieren, aber funktionelle Daten sprechen gegen die ruminale Expression. In b) wird der nicht-selektive Kationenkanal (⑤) vorgestellt. Dabei sprechen funktionelle und molekularbiologische Daten für eine  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme durch die Vertreter  $\text{bTRPV3}$  und  $\text{bTRPV4}$ . Die nachgewiesene Ansäuerung nach Einstrom von  $\text{NH}_4^+$  mit nachfolgender Deprotonierung zu  $\text{NH}_3$  könnte die Stimulation der  $\text{Na}^+$ -Aufnahme durch NHE (④) erklären (Abdoun et al. 2005). Ein basolateraler  $\text{K}^+$ -Kanal (⑦) vermittelt den  $\text{NH}_4^+$ -Transport ins Interstitium. Ferner könnte auch basolateral ein  $\text{NH}_3$  Permeationsweg (wie in ①, ② oder ③) vorkommen (Lu et al. 2014). Nach Entgiftung von  $\text{NH}_4^+$  zu Harnstoff in der Leber kann wiederum Harnstoff über Harnstofftransporter (⑥, UTB bzw. AQP) in das Pansenlumen zurückfließen. Dieser kann als Stickstoffquelle für die mikrobielle Proteinsynthese dienen oder erneut zu  $\text{NH}_3$  gespalten werden. Bindung von  $\text{H}^+$  puffert den Panseninhalt und schließt den Kreislauf. Alternativ kommt es in der Leber zum Einbau von  $\text{NH}_4^+$  in Glutamin. Ein luminaler  $\text{NH}_4^+$ -Überschuss wirkt hemmend auf den Harnstoff-Rückfluss und es kommt dann zu einer Erhöhung des renal eliminierten Anteils. Weitere nicht-selektive Kationenkanäle, Splicevarianten oder Kanalvorstufen (⑧) könnten vom ER exprimiert werden. Denkbar wäre ein  $\text{NH}_4^+$ -Aufnahme über diese Kanäle zur Synthese von Glutamin, aber auch ein funktionsloses Verpacken in Vesikeln zum Transport in die apikale Membran. Diese Vermutungen bedürfen einer funktionellen Klärung. c) Die erhöhte  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  Aufnahme stimuliert den Verhornungsprozess und parakeratotische Veränderungen, da  $\text{NH}_4^+$  Substrat und  $\text{Ca}^{2+}$  Cofaktor für diesen Reaktionsweg sind. Die Abbildung ist modifiziert nach (Liebe et al. 2020).

## 5.5. Ausblick

Es konnten erstmals am Rinderpansen *bTRPV3*, *bTRPA1* und *bTRPV4* sequenziert werden (Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022). Mithilfe der selbst-etablierten Antikörper konnten erstmals die Proteine bTRPV3 und bTRPV4 im Immunoblot nachgewiesen und im Pansenepithel lokalisiert werden. Die Lokalisation in der apikalen Membran des *Stratum granulosum* unterstützt maßgeblich die bereits vorhandenen und durch diese Arbeit ergänzten funktionellen Daten zur Bedeutung des bTRPV3 bei der Aufnahme von  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  über das Pansenepithel. Eine funktionelle Rolle für den bTRPV4, welche insbesondere in der Osmoregulation liegen dürfte, wurde erstmals postuliert. Die cytosolische Detektion von bTRPV3 und bTRPV4 in den darunterliegenden Epithelschichten könnte auf die Expression von Kanalvorstufen im ER hinweisen, die im Rahmen der Differenzierung zur apikalen Membran transportiert werden. Aber auch andere Funktionen sind denkbar. Die kürzeren Banden im Immunoblot könnten auf Splice Varianten oder Kanalbruchstücke hindeuten. Ihre Funktion ist schwer definierbar und bedarf weiterer Forschung.

Vergleichende Messungen am nativen Pansenepithel und an Überexpressionssystemen belegen die Reaktivität des bTRPV3 auf den Agonisten 2-APB und des bTRPV4 auf GSK1016790A, dessen Selektivität bTRPV3 wirklos ließ (Liebe et al. 2020; Liebe et al. 2022). Diese Patch-Clamp Daten untermauern die Permeabilität beider Kanäle für  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{NH}_4^+$ . Insbesondere die Leitfähigkeit für  $\text{NH}_4^+$  wurde bisher noch für keinen Vertreter der TRP Kanalfamilie untersucht und stellt einen neuen Aspekt im Verständnis der Funktion dieser vielseitigen Kanalfamilie dar. Gestützt werden die Patch-Clamp Messungen an HEK-293 durch Messungen mithilfe der Patch-Clamp und der pH-sensitiven Mikroelektrode an X. Oozyten, in welchen der Influx von  $\text{NH}_4^+$  zur Depolarisation und intrazellulären Ansäuerung führte.

Schließlich konnte mittels Patch-Clamp und Calcium-Imaging eine Natriumbutyrat-Stimulation des bTRPV3 und bTRPV4 in HEK-293 nachgewiesen werden. Die Daten dieser Dissertation legen nahe, dass die vielfach belegte Stimulation der ruminalen  $\text{Ca}^{2+}$ -Resorption durch SCFA auf eine Aktivierung von bTRPV3 und bTRPV4 zurückzuführen sein dürfte (siehe Abb. 6). Der SCFA-Einstrom bewirkt durch Dissoziation eine cytosolische Ansäuerung, was bTRPV3 stimuliert, und eine Volumenänderung, welche bTRPV4 stimuliert. Eine vermehrte Öffnung dieser Kanäle mit Influx von  $\text{NH}_4^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  könnte eine Rolle bei der Konzentratfütterbedingten ruminalen Parakeratose spielen. Interessanterweise kommt es bei der *gain-of-function* Mutation des humanen TRPV3 zu ähnlichen, hyperkeratotischen Veränderungen in der Haut. Ferner dürfte die Aufnahme von  $\text{NH}_4^+$  eine wichtige Rolle im ruminohepatischen Kreislauf mit funktionellen Auswirkungen auf die ruminale pH-Homöostase spielen.

Auf Grundlage der qPCR Ergebnisse (Rosendahl et al. 2016; Rabbani et al. 2018; Geiger et al. 2021) könnten neben bTRPV3 und bTRPV4 noch weitere TRP Kanäle am ruminalen Transport von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{NH}_4^+$  beteiligt sein. Insbesondere kommt hier der TRPA1 in Frage, der jedoch beim Rinderpansen auf mRNA Ebene nahe der Nachweisgrenze lag, während der Nachweis auf Proteinebene im Rahmen dieser Arbeit nicht gelang. Weiterhin denkbar wäre auch ein  $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$ -Antiporter (Schröder et al. 2015), für den derzeit aber ein geeigneter, molekularbiologischer Kandidat fehlt. Eine Aufnahme von  $\text{NH}_4^+$  durch den NKCC scheint hingegen unwahrscheinlich, da mukosales Bumetanid und Furosemid am Pansen keine Wirkung zeigten (Martens et al. 1991).

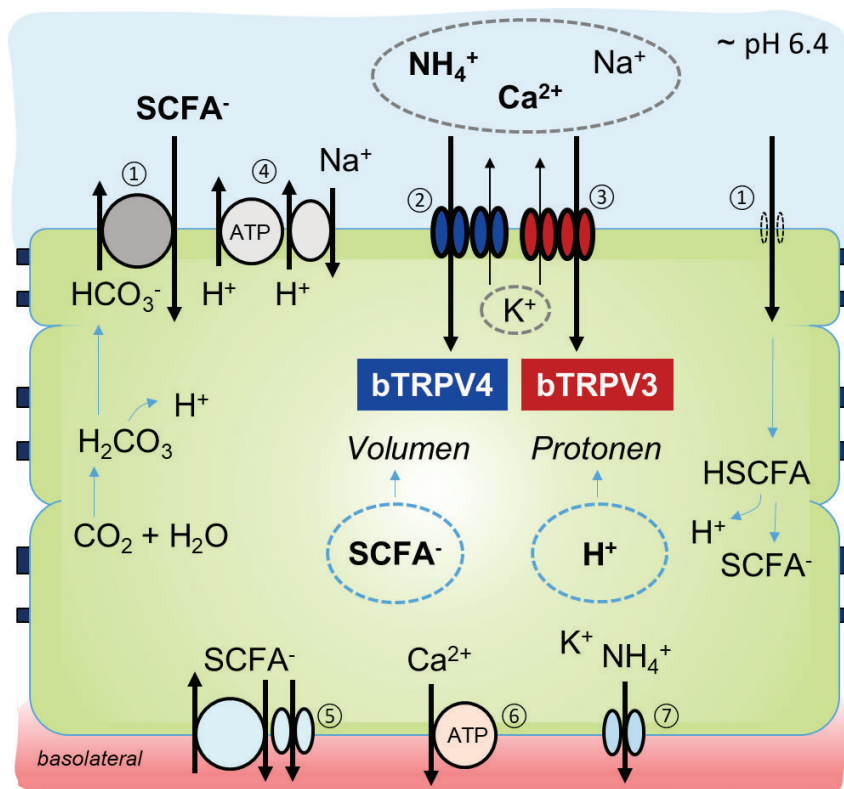


Abb. 6 Ruminales Transportmodell bei SCFA Exposition

In dieser Darstellung wird zur Übersichtlichkeit das *Stratum corneum* durch den blauen Hintergrund angedeutet. Die über Gap Junctions verbundenen Schichten des *Stratum basale*, *spinosum* und *granulosum* werden als funktionelles Synzytium vereinfacht. Apikal können SCFA als Anion ( $\text{SCFA}^-$ ) über einen Austausch mit  $\text{HCO}_3^-$  oder in der protonierten Form (HSCFA) einströmen (①). Durch den Einstrom schwillt die Zelle an, was den Volumensensor bTRPV4 (②) stimuliert. Des Weiteren bewirkt der SCFA Einstrom intrazellulär eine Freisetzung von  $\text{H}^+$ , welche den bTRPV3 (③) stimulieren, eine Gegenregulation kann durch NHE und  $\text{H}^+$ -ATPasen (④) bewirkt werden. Der Einstrom von Kationen wie  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  wird durch die Stimulation von bTRPV3 und bTRPV4 erhöht, gleichzeitig kann vermehrt  $\text{K}^+$  ausströmen. Der basolaterale Ausstrom von SCFA findet u.a. über Anionenaustauscher und Anionenkanäle statt (⑤), während  $\text{Ca}^{2+}$  über ATPasen ausströmt, die teilweise  $\text{Na}^+$  abhängig sind (⑥).  $\text{NH}_4^+$  kann über  $\text{K}^+$  Kanäle das Epithel basolateral verlassen (⑦). Die Abbildung wurde modifiziert nach (Liebe et al. 2022).

Ebenfalls besteht weiterer Forschungsbedarf für mögliche, elektroneutrale Aufnahmewege für  $\text{NH}_3$  im Pansenepithel. Dabei ist festzustellen, dass bei physiologischen pH von  $\sim 6,4$  am Pansen die Aufnahme von  $\text{NH}_3$  deutlich kleiner als die Aufnahme von  $\text{NH}_4^+$  ist (Abdoun et al. 2005). Während ein Nachweis von Rhesus Glykoproteinen zumindest beim Schaf nicht gelang (Xiang et al. 2016) kommen Aquaporine wie z.B. AQP3 (Zhong et al. 2020) als Aufnahmeweg in Frage. Ferner sollte die Möglichkeit erwogen werden, das  $\text{NH}_4^+$  statt  $\text{K}^+$  über einen ruminalen  $\text{K}^+/\text{H}^+$ -Austauscher aufgenommen wird (Weiner und Verlander 2011; Hamm et al. 2015), auch wenn es bisher keinen Hinweis auf solch einen Transportmechanismus im Pansen gibt (Abdoun et al. 2006). Dieser Mechanismus ist allerdings elektroneutral und entspricht einer Aufnahme von  $\text{NH}_3$ .

Aufbauend auf den Arbeiten von Rosendahl *et al.* (Rosendahl et al. 2016) zeigen die in dieser Dissertation zusammengefassten Ergebnisse stringent, dass die bovinen Vertreter der Kanäle TRPV3 und TRPV4 für die Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{NH}_4^+$  am Pansenepithel geeignet sind. Die Modulierbarkeit insbesondere des bTRPV3 durch zahlreiche pflanzliche Agonisten eröffnet neue Wege in der Optimierung der ruminalen Aufnahme dieser Elektrolyte, welche insbesondere für  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{NH}_4^+$  interessant sind. Die entsprechenden Futterzusatzstoffe



befinden sich bereits in der Entwicklung und dürften Auswirkungen auf die zukünftige Fütterung und Gesundheit von Wiederkäuern haben. Eine positive Auswirkung auf die  $\text{Ca}^{2+}$ -Bilanz und die pH-Homöostase des Pansens ist zu erwarten (siehe 0). Ein hoher  $\text{NH}_4^+$ -Efflux muss allerdings auch als ökologisch nachteilig gesehen werden. Die Stickstoff-Umwandlung in mikrobielles Protein wird durch Stimulation von TRPV3 bzw. TRPV4 voraussichtlich bei Zunahme der renalen Exkretion reduziert, mit allen bereits dargestellten Problemen für Böden, Gewässer und Klima (siehe 2.1.2). Denkbar wäre dabei eine zusätzliche Stimulation des Harnstoff-Refluxes in den Pansen. Inwieweit eine Etablierung entsprechender Agonisten gelingt, bleibt abzuwarten. In diesem Zusammenhang wären auch grundsätzliche Überlegungen zu der proteinreichen Fütterung des Wiederkäuers mit ihren medizinischen und ökologischen Konsequenzen empfehlenswert.

## **Funktionelle und molekularbiologische Untersuchungen zur Beteiligung von zwei TRP Kanälen an der Leitfähigkeit des Pansenepithels für Ammonium, Natrium, Kalium und Calcium**

### **6. Zusammenfassung**

Die Rinderhaltung trägt wesentlich zur Emission von umwelt- und klimarelevanten Stickstoffverbindungen bei. Diese basieren hauptsächlich auf der renalen Ausscheidung überschüssigen Stickstoffs in Form von Harnstoff. Zu einem erheblichen Anteil entstammt dieser der Fermentation von verfütterten Proteinen im Pansen, welche von der ruminalen Stickstoff-Resorption in Form von  $\text{NH}_4^+$  gefolgt ist. Funktionelle Voruntersuchungen wiesen auf einen nicht-selektiven Kationenkanal als Aufnahmemechanismus hin.

Ferner ist seit vielen Jahren klar, dass die ruminale Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  über einen Vitamin D unabhängigen und zumindest teilweise elektrogenen Mechanismus erfolgt. Eine Identifikation der verantwortlichen Transportproteine erscheint zwingend, um neue Strategien u.a. zur Vermeidung der Gebärparese beim Wiederkäuer zu entwickeln.

Die bereits erfolgte Detektion der mRNA für verschiedene TRP Kanäle im bovinen Pansenepithel und funktionelle Voruntersuchungen legten eine Beteiligung des bTRPV3 am ruminalen Kationentransport nahe. Hingegen war für die ebenfalls detektierte mRNA für bTRPV4 noch keine Funktion für diesen Kanal vorgeschlagen worden. Um zu klären, ob es sich überhaupt um epitheliale Transportproteine handelt oder um neuronale Kanäle, war eine Lokalisation im Pansengewebe notwendig.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden daher die bovinen Homologe von bTRPV3 und bTRPV4 sequenziert. Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die beiden Kanäle jeweils in HEK-293 Zellen und bTRPV3 zusätzlich in *Xenopus laevis* Oozyten überexprimiert. Die Eignung von spezifischen Antikörpern zur Detektion dieser bovinen Proteine konnte damit bestätigt und die Funktion der Kanäle gezielt untersucht werden. Mithilfe der so etablierten Antikörper konnten bTRPV3 und bTRPV4 im Pansenepithel per Immunoblot nachgewiesen und per Immunfluoreszenz lokalisiert werden, wobei die intensive, apikale Detektion beider im *Stratum granulosum* eine Beteiligung am Transportgeschehen nahelegt. Diese Schlussfolgerung wurde durch Ussing Kammer Untersuchungen mithilfe von bTRPV3 bzw. bTRPV4 Agonisten am ruminalen Epithel unterstützt. In elektrophysiologischen Untersuchungen an HEK-293 Zellen wurden die Agonisten ebenfalls erprobt. Nur an bTRPV4 und nicht an bTRPV3 HEK-293 Zellen wirkte GSK1016790A stimulierend. Am nativen Pansenepithel waren allerdings deutlich höhere Konzentrationen nötig gewesen, um Effekte

zu erzielen. An bTRPV3 HEK-293 Zellen konnte der 2-APB Effekt aus dem Ussing Kammer Versuch reproduziert werden.

Schließlich wurde die Leitfähigkeit von bTRPV3 und von bTRPV4 für  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  und  $\text{Ca}^{2+}$  nach Überexpression demonstriert. Im Falle von bTRPV3 kamen drei Untersuchungsmethoden (Calcium-Imaging, pH-sensitive Mikroelektroden und Patch-Clamp in whole-cell und inside-out Konfiguration) zum Einsatz, während bei bTRPV4 HEK-293 Zellen das Calcium-Imaging und die Patch-Clamp in whole-cell Konfiguration genutzt wurden. Die Stimulation des bTRPV3 durch Menthol oder Natriumbutyrat bewirkte einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom. Der Effekt dieser kurzkettigen Fettsäure auf bTRPV3 dürfte auf eine intrazelluläre  $\text{H}^+$ -bedingte Aktivierung beruhen. Eine Natriumbutyrat Stimulation konnte für bTRPV4 im Calcium-Imaging aber nicht in der Patch-Clamp gezeigt werden, was für eine Aktivierung durch eine Zunahme des Zellvolumens spricht. Interessanterweise wurde bei inside-out Patch-Clamp und pH-sensitiven Mikroelektroden Messungen gezeigt, dass auch Kontroll-*Xenopus laevis* Oozyten endogene Kationenkanäle exprimieren, allerdings wiesen diese für  $\text{NH}_4^+$  eine geringere Leitfähigkeit auf. Außerdem wurde erneut die Membran von *Xenopus laevis* Oozyten als weitgehend undurchlässig für  $\text{NH}_3$  befunden.

Nach Charakterisierung an Überexpressionssystemen, funktionellen Untersuchungen am Pansenepithel, molekularbiologischen Untersuchungen mit Immunoblot und Lokalisation im Epithel erscheint insbesondere bTRPV3 für die apikale Aufnahme von  $\text{Ca}^{2+}$  und  $\text{NH}_4^+$  im Pansen verantwortlich. Die bTRPV4 Beteiligung an diesem apikalen Transportgeschehen dürfte vermutlich erst bei Zellschwellung zunehmen. Damit konnte die molekulare Identität zweier Proteine mit Bedeutung für die  $\text{NH}_4^+$ -Resorption im ruminohepatischen Kreislauf geklärt werden. Beide dürften auch für die ruminale  $\text{Ca}^{2+}$  Resorption relevant sein. Vielfältige Möglichkeiten der Modulation durch pflanzliche Wirkstoffe eröffnen sich für Fütterungsstrategien und therapeutische Intervention am Wiederkäuer.

## Functional and molecular biological investigations of the participation of two TRP channels in the conductance of the ruminal epithelium for ammonium, sodium, potassium, and calcium

### 7. Summary

Cattle farming contributes greatly to the emission of nitrogenous compounds with a negative impact on the environment and the global climate. The main source of these compounds is the renal excretion of excess nitrogen in the form of urea. Most of this nitrogen is generated from the fermentative degradation of feed protein with subsequent absorption in the form of  $\text{NH}_4^+$  across the wall of the rumen. Previous functional studies suggested a non-selective cation channel for this uptake mechanism.

Furthermore, it has been clear for many years that the ruminal uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  involves a Vitamin D independent pathway that is at least partially electrogenic. An identification of the responsible proteins appears mandatory in order to develop strategies for the avoidance of parturient paresis and other pathologies associated with calcium deficiency in the ruminant. Previous detection of mRNA for various TRP channels in the bovine ruminal epithelium and functional investigations supported a participation of bTRPV3 in ruminal cation transport. However, no functional role for the bTRPV4 channel had been proposed for the detected *bTRPV4* mRNA. In order to clarify whether bTRPV3 and bTRPV4 are epithelial transport proteins or neuronal channels, a localisation in ruminal epithelium was necessary.

In the current thesis, the coding sequences of the bovine homologues bTRPV3 and bTRPV4 were determined. Based on these results, both channels were overexpressed in HEK-293 cells, while bTRPV3 was additionally overexpressed in *Xenopus laevis* oocytes. This made it possible to confirm the suitability of specific antibodies for detection of the bovine proteins and to investigate the function of these channels in a stringent manner.

Using established antibodies, it was possible to detect and localize bTRPV3 and bTRPV4 in the ruminal epithelium via immunoblot and immunofluorescence staining, respectively. The intense apical staining pattern in the *stratum granulosum* supported an involvement in epithelial transport. This conclusion was supported by Ussing chamber measurements on the ruminal epithelium using bTRPV3 and bTRPV4 agonists, respectively. Additionally, these agonists were tested in patch-clamp measurements on HEK-293 cells. While GSK1016790A strongly stimulated bTRPV4 HEK-293 cells, it showed no effect on bTRPV3. However, much higher concentrations were required to see effects on native ruminal epithelia. The stimulatory

effects of 2-APB on bTRPV3 HEK-293 cells were comparable to those in Ussing chamber experiments.

Finally, the conductance of bTRPV3 and bTRPV4 for  $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$  and  $\text{Ca}^{2+}$  was demonstrated in overexpressing systems. In the case of bTRPV3, three different measuring techniques (calcium imaging, pH-sensitive microelectrodes and patch-clamp in whole-cell and inside-out configuration) were used. The bTRPV4 HEK-293 cells were investigated using calcium imaging and patch-clamp in the whole-cell configuration. Menthol and sodium butyrate both enhanced the bTRPV3-dependent uptake of  $\text{Ca}^{2+}$ . Influx of this *short-chain fatty acid* most likely activated bTRPV3 via cytosolic protons. In calcium-imaging but not in patch-clamp experiments, sodium butyrate enhanced uptake via bTRPV4. The effect on bTRPV4 was probably caused by an increase in cellular volume. Interestingly, it was possible to show in inside-out patch-clamp and experiments with pH-sensitive microelectrodes that control *Xenopus laevis* oocytes also expressed endogenous cation channels with a much smaller conductance for the  $\text{NH}_4^+$ . As shown in previous investigations, the membrane of *Xenopus laevis* oocytes appeared to be largely impermeable to  $\text{NH}_3$ .

After characterization in overexpressing systems, functional experiments on native epithelia and protein detection and localisation, it appears highly probable that particularly bTRPV3 is involved in the apical uptake of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{NH}_4^+$  by the rumen. The role of bTRPV4 in apical uptake should increase with cellular swelling. Thus, it was possible to identify the molecular identity of two proteins with relevance for  $\text{NH}_4^+$  uptake in rumino-hepatic nitrogen recirculation. Both should also be relevant for  $\text{Ca}^{2+}$  uptake by the rumen. In light of these findings, the modulation of uptake by numerous plant-derived compounds appears possible with repercussions for new strategies in feeding and therapeutic intervention in the ruminant.

## 8. Literaturverzeichnis

Abdoun, K., F. Stumpff and H. Martens (2006):

Ammonia and urea transport across the rumen epithelium: a review.  
*Anim Health Res Rev* 7: 43-59. DOI: 10.1017/S1466252307001156.

Abdoun, K., F. Stumpff, I. Rabbani and H. Martens (2010):

Modulation of urea transport across sheep rumen epithelium in vitro by SCFA and CO<sub>2</sub>.  
*Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology* 298: G190-202. DOI:  
10.1152/ajpgi.00216.2009.

Abdoun, K., F. Stumpff, K. Wolf and H. Martens (2005):

Modulation of electroneutral Na transport in sheep rumen epithelium by luminal ammonia.  
*Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology* 289: G508-G520. DOI:  
10.1152/ajpgi.00436.2004.

Abdoun, K., K. Wolf, G. Arndt and H. Martens (2003):

Effect of ammonia on Na<sup>+</sup> transport across isolated rumen epithelium of sheep is diet dependent.  
*Br J Nutr* 90: 751-758. DOI: 10.1079/bjn2003957.

Agle, M., A. N. Hristov, S. Zaman, C. Schneider, P. M. Ndegwa and V. K. Vaddella (2010):  
Effect of dietary concentrate on rumen fermentation, digestibility, and nitrogen losses in dairy cows.  
*J Dairy Sci* 93: 4211-4222. DOI: 10.3168/jds.2009-2977.

Aguerre, M. J., M. A. Wattiaux, J. M. Powell, G. A. Broderick and C. Arndt (2011):

Effect of forage-to-concentrate ratio in dairy cow diets on emission of methane, carbon dioxide, and ammonia, lactation performance, and manure excretion.  
*J Dairy Sci* 94: 3081-3093. DOI: 10.3168/jds.2010-4011.

Al-Mashhadani, E. H. and M. M. Beck (1985):

Effect of atmospheric ammonia on the surface ultrastructure of the lung and trachea of broiler chicks.  
*Poult Sci* 64: 2056-2061. DOI: 10.3382/ps.0642056.

Al Jassim, R. A. and F. M. Andrews (2009):

The bacterial community of the horse gastrointestinal tract and its relation to fermentative acidosis, laminitis, colic, and stomach ulcers.  
*Vet Clin North Am Equine Pract* 25: 199-215. DOI: 10.1016/j.cveq.2009.04.005.

Allen, M. S. (1997):

Relationship between fermentation acid production in the rumen and the requirement for physically effective fiber.  
*J Dairy Sci* 80: 1447-1462. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(97)76074-0.

Annison, E. F. (1956):

Nitrogen metabolism in the sheep; protein digestion in the rumen.  
*Biochem J* 64: 705-714. DOI: 10.1042/bj0640705.

- Arniges, M., J. M. Fernandez-Fernandez, N. Albrecht, M. Schaefer and M. A. Valverde (2006):  
Human TRPV4 channel splice variants revealed a key role of ankyrin domains in multimerization and trafficking.  
J Biol Chem 281: 1580-1586. DOI: 10.1074/jbc.M511456200.
- Arriola Apelo, S. I., J. R. Knapp and M. D. Hanigan (2014):  
Invited review: Current representation and future trends of predicting amino acid utilization in the lactating dairy cow.  
J Dairy Sci 97: 4000-4017. DOI: 10.3168/jds.2013-7392.
- Aschenbach, J. R., G. B. Penner, F. Stumpff and G. Gäbel (2011):  
RUMINANT NUTRITION SYMPOSIUM: Role of fermentation acid absorption in the regulation of ruminal pH12.  
J Anim Sci 89: 1092-1107. DOI: 10.2527/jas.2010-3301.
- Aschenbach, J. R., Q. Zebeli, A. K. Patra, G. Greco, S. Amasheh and G. B. Penner (2019):  
Symposium review: The importance of the ruminal epithelial barrier for a healthy and productive cow.  
J Dairy Sci 102: 1866-1882. DOI: 10.3168/jds.2018-15243.
- Azad, A. K., T. Raihan, J. Ahmed, A. Hakim, T. H. Emon and P. A. Chowdhury (2021):  
Human Aquaporins: Functional Diversity and Potential Roles in Infectious and Non-infectious Diseases.  
Front Genet 12: 654865. DOI: 10.3389/fgene.2021.654865.
- Baaske, L., G. Gäbel and F. Dengler (2020):  
Ruminal epithelium: a checkpoint for cattle health.  
J Dairy Res 87: 322-329. DOI: 10.1017/s0022029920000369.
- Baratchi, S., P. Keov, W. G. Darby, A. Lai, K. Khoshmanesh, P. Thurgood, P. Vahidi, K. Ejendal and P. McIntyre (2019):  
The TRPV4 Agonist GSK1016790A Regulates the Membrane Expression of TRPV4 Channels.  
Front Pharmacol 10: 6. DOI: 10.3389/fphar.2019.00006.
- Barmore, W., F. Azad and W. L. Stone (2021):  
Physiology, Urea Cycle.  
StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing  
Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.
- Basler, K., S. Bergmann, M. Heisig, A. Naegel, M. Zorn-Kruppa and J. M. Brandner (2016):  
The role of tight junctions in skin barrier function and dermal absorption.  
J Control Release 242: 105-118. DOI: 10.1016/j.jconrel.2016.08.007.
- Batista, E. D., E. Detmann, S. C. Valadares Filho, E. C. Titgemeyer and R. F. D. Valadares (2017):  
The effect of CP concentration in the diet on urea kinetics and microbial usage of recycled urea in cattle: a meta-analysis.  
Animal 11: 1303-1311. DOI: 10.1017/s1751731116002822.

- Beardsworth, L. J., P. M. Beardsworth and A. D. Care (1989):  
The effect of ruminal phosphate concentration on the absorption of calcium, phosphorus and magnesium from the reticulo-rumen of the sheep.  
Br J Nutr 61: 715-723. DOI: 10.1079/bjn19890157.
- Behera, S. N., M. Sharma, V. P. Aneja and R. Balasubramanian (2013):  
Ammonia in the atmosphere: a review on emission sources, atmospheric chemistry and deposition on terrestrial bodies.  
Environ Sci Pollut Res Int 20: 8092-8131. DOI: 10.1007/s11356-013-2051-9.
- Benekos, A. K., F. E. Tziora, A. G. Tekerlekopoulou, S. Pavlou, Y. Qun, A. Katsaounis and D. V. Vayenas (2021):  
Nitrate removal from groundwater using a batch and continuous flow hybrid Fe-electrocoagulation and electrooxidation system.  
J Environ Manage 297: 113387. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.113387.
- Benfenati, V., M. Caprini, M. Dovizio, M. N. Mylonakou, S. Ferroni, O. P. Ottersen and M. Amiry-Moghaddam (2011):  
An aquaporin-4/transient receptor potential vanilloid 4 (AQP4/TRPV4) complex is essential for cell-volume control in astrocytes.  
Proc Natl Acad Sci U S A 108: 2563-2568. DOI: 10.1073/pnas.1012867108.
- Berends, H., J. J. van den Borne, B. A. Røjen, J. van Baal and W. J. Gerrits (2014):  
Urea recycling contributes to nitrogen retention in calves fed milk replacer and low-protein solid feed.  
J Nutr 144: 1043-1049. DOI: 10.3945/jn.114.191353.
- Bergen, W. G. and G. Wu (2009):  
Intestinal nitrogen recycling and utilization in health and disease.  
J Nutr 139: 821-825. DOI: 10.3945/jn.109.104497.
- Bergman, E. N. (1990):  
Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species.  
Physiol Rev 70: 567-590. DOI: 10.1152/physrev.1990.70.2.567.
- Blaydon, D. C. and D. P. Kelsell (2014):  
Defective channels lead to an impaired skin barrier.  
J Cell Sci 127: 4343-4350. DOI: 10.1242/jcs.154633.
- Bochröder, B., R. Schubert and D. Bödeker (1994):  
Studies on the transport in vitro of lysine, histidine, arginine and ammonia across the mucosa of the equine colon.  
Equine Vet J 26: 131-133. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1994.tb04351.x.
- Bödeker, D. and J. Kemkowski (1996):  
Participation of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in total ammonia absorption across the rumen epithelium of sheep (*Ovis aries*).  
Comp Biochem Physiol A Physiol 114: 305-310. DOI: 10.1016/0300-9629(96)00012-6.
- Bödeker, D., G. Oppelland and H. Höller (1992a):  
Involvement of carbonic anhydrase in ammonia flux across rumen mucosa in vitro.  
Exp Physiol 77: 517-519. DOI: 10.1113/expphysiol.1992.sp003614.



- Bödeker, D., Y. Shen, J. Kemkowski and H. Höller (1992b):  
Influence of short-chain fatty acids on ammonia absorption across the rumen wall in sheep.  
*Exp Physiol* 77: 369-376. DOI: 10.1113/expphysiol.1992.sp003597.
- Bondonno, C. P., K. D. Croft and J. M. Hodgson (2016):  
Dietary Nitrate, Nitric Oxide, and Cardiovascular Health.  
*Crit Rev Food Sci Nutr* 56: 2036-2052. DOI: 10.1080/10408398.2013.811212.
- Borbíró, I., E. Lisztes, B. I. Tóth, G. Czifra, A. Oláh, A. G. Szöllosi, N. Szentandrassy, P. P. Nánási, Z. Péter, R. Paus, L. Kovács and T. Bíró (2011):  
Activation of transient receptor potential vanilloid-3 inhibits human hair growth.  
*J Invest Dermatol* 131: 1605-1614. DOI: 10.1038/jid.2011.122.
- Borlée, F., C. J. Yzermans, B. Aalders, J. Rooijackers, E. Krop, C. B. M. Maassen, F. Schellevis, B. Brunekreef, D. Heederik and L. A. M. Smit (2017):  
Air Pollution from Livestock Farms Is Associated with Airway Obstruction in Neighboring Residents.  
*Am J Respir Crit Care Med* 196: 1152-1161. DOI: 10.1164/rccm.201701-0021OC.
- Botte, M., A. K. C. Ulrich, R. Adaixo, D. Gnutt, A. Brockmann, D. Bucher, M. Chami, N. Bocquet, U. Ebbinghaus-Kintscher, V. Puetter, A. Becker, U. Egner, H. Stahlberg, M. Hennig and S. J. Holton (2020):  
Cryo-EM structural studies of the agonist complexed human TRPV4 ion-channel reveals novel structural rearrangements resulting in an open-conformation.  
bioRxiv: 2020.2010.2013.334797. DOI: 10.1101/2020.10.13.334797.
- Braun, H. S., K. T. Schrapers, K. Mahlkow-Nerge, F. Stumpff and J. Rosendahl (2019):  
Dietary supplementation of essential oils in dairy cows: evidence for stimulatory effects on nutrient absorption.  
*Animal* 13: 518-523. DOI: 10.1017/s1751731118001696.
- Bull, L. S., L. J. Bush, J. D. Friend, B. Harris, Jr. and E. W. Jones (1965):  
Incidence of ruminal parakeratosis in calves fed different rations and its relation to volatile fatty acid absorption.  
*J Dairy Sci* 48: 1459-1466. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(65)88499-5.
- Burckhardt, B. C. and E. Frömter (1992):  
Pathways of NH<sub>3</sub>/NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeation across *Xenopus laevis* oocyte cell membrane.  
*Pflugers Arch* 420: 83-86. DOI: 10.1007/bf00378645.
- Busch, W., W. Methling and W. M. Amselgruber (2003):  
Tiergesundheits- und Tierkrankheitslehre.  
Stuttgart, Parey - ISBN 3-8304-4092-8
- Camargo, J. A., A. Alonso and A. Salamanca (2005):  
Nitrate toxicity to aquatic animals: a review with new data for freshwater invertebrates.  
*Chemosphere* 58: 1255-1267. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2004.10.044.
- Caner, T., S. Abdunour-Nakhoul, K. Brown, M. T. Islam, L. L. Hamm and N. L. Nakhoul (2015):  
Mechanisms of ammonia and ammonium transport by rhesus-associated glycoproteins.  
*Am J Physiol Cell Physiol* 309: C747-758. DOI: 10.1152/ajpcell.00085.2015.

- Cao, X., F. Yang, J. Zheng and K. Wang (2012):  
Intracellular proton-mediated activation of TRPV3 channels accounts for the exfoliation effect of  $\alpha$ -hydroxyl acids on keratinocytes.  
J Biol Chem 287: 25905-25916. DOI: 10.1074/jbc.M112.364869.
- Caterina, M. J., M. A. Schumacher, M. Tominaga, T. A. Rosen, J. D. Levine and D. Julius (1997):  
The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway.  
Nature 389: 816-824. DOI: 10.1038/39807.
- Cermak, R., C. Lawnitzak and E. Scharrer (2000):  
Influence of ammonia on sodium absorption in rat proximal colon.  
Pflugers Arch 440: 619-626. DOI: 10.1007/s004240000309.
- Cheng, W., F. Yang, S. Liu, C. K. Colton, C. Wang, Y. Cui, X. Cao, M. X. Zhu, C. Sun, K. Wang and J. Zheng (2012):  
Heteromeric heat-sensitive transient receptor potential channels exhibit distinct temperature and chemical response.  
J Biol Chem 287: 7279-7288. DOI: 10.1074/jbc.M111.305045.
- Cheng, W., F. Yang, C. L. Takanishi and J. Zheng (2007):  
Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties.  
J Gen Physiol 129: 191-207. DOI: 10.1085/jgp.200709731.
- Chepilko, S., H. Zhou, H. Sackin and L. G. Palmer (1995):  
Permeation and gating properties of a cloned renal K<sup>+</sup> channel.  
Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology 268: C389-401. DOI: 10.1152/ajpcell.1995.268.2.C389.
- Cho, D. Y. and H. W. Leipold (1977):  
Experimental spongy degeneration in calves.  
Acta Neuropathol 39: 115-127. DOI: 10.1007/bf00703317.
- Chung, M. K., H. Lee, A. Mizuno, M. Suzuki and M. J. Caterina (2004):  
2-aminoethoxydiphenyl borate activates and sensitizes the heat-gated ion channel TRPV3.  
J Neurosci 24: 5177-5182. DOI: 10.1523/jneurosci.0934-04.2004.
- Clough, T. J. and L. M. Condron (2010):  
Biochar and the nitrogen cycle: introduction.  
J Environ Qual 39: 1218-1223. DOI: 10.2134/jeq2010.0204.
- Cosens, D. J. and A. Manning (1969):  
Abnormal electroretinogram from a *Drosophila* mutant.  
Nature 224: 285-287. DOI: 10.1038/224285a0.
- Coyle, J., S. McDaid, C. Walpole and G. S. Stewart (2016):  
UT-B Urea Transporter Localization in the Bovine Gastrointestinal Tract.  
J Membr Biol 249: 77-85. DOI: 10.1007/s00232-015-9850-5.

Danielyan, L., S. Zellmer, S. Sickinger, G. V. Tolstonog, J. Salvetter, A. Lourhmati, D. D. Reissig, C. H. Gleiter, R. Gebhardt and G. H. Buniatian (2009):  
Keratinocytes as depository of ammonium-inducible glutamine synthetase: age- and anatomy-dependent distribution in human and rat skin.  
PLoS One 4: e4416. DOI: 10.1371/journal.pone.0004416.

De Klein CAM, E. R. a. v. d. W. T. (2010):  
Nitrous Oxide and Climate Change. Taylor & Francis - ISBN 9781136541384

de Vries, W., H. Kros and O. Oenema (2001):  
Modeled impacts of farming practices and structural agricultural changes on nitrogen fluxes in the Netherlands.  
Sc World J 1 Suppl 2: 664-672. DOI: 10.1100/tsw.2001.332.

DeGaris, P. J. and I. J. Lean (2008):  
Milk fever in dairy cows: a review of pathophysiology and control principles.  
Vet J 176: 58-69. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.12.029.

Dijkstra, J., O. Oenema, J. W. van Groenigen, J. W. Spek, A. M. van Vuuren and A. Bannink (2013):  
Diet effects on urine composition of cattle and N<sub>2</sub>O emissions.  
Animal 7: 292-302. DOI: 10.1017/S1751731113000578.

Dirksen, G., G. Rosenberger and W. Baumgartner (2002):  
Innere Medizin und Chirurgie des Rindes.  
Berlin, Parey - ISBN 3-8263-3181-8

Dobson, M. J. (1955):  
A histological study of the structure and organization of the rumen epithelium of sheep.  
J Physiol 128: 25p. PMID: 14392618.

Doepel, L., D. Pacheco, J. J. Kennelly, M. D. Hanigan, I. F. López and H. Lapierre (2004):  
Milk protein synthesis as a function of amino acid supply.  
J Dairy Sci 87: 1279-1297. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(04)73278-6.

Dong, X. P., X. Wang and H. Xu (2010):  
TRP channels of intracellular membranes.  
J Neurochem 113: 313-328. DOI: 10.1111/j.1471-4159.2010.06626.x.

Eckard, R. J., C. Grainger and C. A. M. de Klein (2010):  
Options for the abatement of methane and nitrous oxide from ruminant production: A review.  
Livestock Science 130: 47-56. DOI: 10.1016/j.livsci.2010.02.010.

Eckhart, L., S. Lippens, E. Tschachler and W. Declercq (2013):  
Cell death by cornification.  
Biochim Biophys Acta 1833: 3471-3480. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.010.

EFSA, D. Schrenk, M. Bignami, L. Bodin, J. K. Chipman, J. del Mazo, B. Grasl-Kraupp, L. Hoogenboom, J.-C. Leblanc, C. S. Nebbia, E. Nielsen, E. Ntzani, A. Petersen, S. Sand, T. Schwerdtle, C. Vleminckx, H. Wallace, V. Bampidis, B. Cottrill, M. J. Frutos, P. Furst, A. Parker, M. Binaglia, A. Christodoulidou, P. Gergelova, I. M. Guajardo, C. Wenger and C. Hogstrand (2020):

Risk assessment of nitrate and nitrite in feed.  
EFSA J 18: e06290. DOI: 10.2903/j.efsa.2020.6290.

Elfsmark, L., L. Ågren, C. Akfur, E. Wigenstam, U. Bergström and S. Jonasson (2019):  
Comparisons of acute inflammatory responses of nose-only inhalation and intratracheal instillation of ammonia in rats.

Inhal Toxicol 31: 107-118. DOI: 10.1080/08958378.2019.1606367.

Eriksson, L. and M. Valtonen (1982):

Renal Urea Handling in Goats Fed High and Low Protein Diets.  
J Dairy Sci 65: 385-389. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(82)82202-9.

Farco, J. A. and O. Grundmann (2013):

Menthol--pharmacology of an important naturally medicinal "cool".  
Mini Rev Med Chem 13: 124-131. DOI: 10.2174/1389557511307010124.

Fernandez, J. M., W. J. Croom, Jr., A. D. Johnson, R. D. Jaquette and F. W. Edens (1988):  
Subclinical ammonia toxicity in steers: effects on blood metabolite and regulatory hormone concentrations.

J Anim Sci 66: 3259-3266. DOI: 10.2527/jas1988.66123259x.

Freeman, S. C. and S. Sonthalia (2020):

Histology, Keratohyalin Granules.  
StatPearls. Treasure Island (FL), StatPearls Publishing.

Gäbel, G. and J. R. Aschenbach (2002):

Influence of food deprivation on the transport of 3-O-methyl-alpha-D-glucose across the isolated ruminal epithelium of sheep.

J Anim Sci 80: 2740-2746. DOI: 10.2527/2002.80102740x.

Gäbel, G., S. Vogler and H. Martens (1991):

Short-chain fatty acids and CO<sub>2</sub> as regulators of Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> absorption in isolated sheep rumen mucosa.

J Comp Physiol B 161: 419-426. DOI: 10.1007/bf00260803.

Gaebel, G., M. Suendermann and H. Martens (1987):

The influence of osmotic pressure, lactic acid and pH on ion and fluid absorption from the washed and temporarily isolated reticulo-rumen of sheep.

Zentralbl Veterinarmed A 34: 220-226. DOI: 10.1111/j.1439-0442.1987.tb00275.x.

Galizia, L., A. Pizzoni, J. Fernandez, V. Rivarola, C. Capurro and P. Ford (2012):

Functional interaction between AQP2 and TRPV4 in renal cells.

J Cell Biochem 113: 580-589. DOI: 10.1002/jcb.23382.

Gao, L., P. Yang, P. Qin, Y. Lu, X. Li, Q. Tian, Y. Li, C. Xie, J. B. Tian, C. Zhang, C. Tian, M. X. Zhu and J. Yao (2016):

Selective potentiation of 2-APB-induced activation of TRPV1-3 channels by acid.

Sci Rep 6: 20791. DOI: 10.1038/srep20791.

- Gärtner, K. (1963):  
 Untersuchungen in vitro über die Ammoniakpassage durch die Pansenschleimhaut von Rindern und deren Beeinflussung durch pH-Wert und antidiuretisches Hormon.  
 Zentralbl Veterinaermed [A] 10: 11-20. DOI: 10.1111/j.1439-0442.1963.tb00002.x.
- Geiger, S., A. K. Patra, K. T. Schrapers, H. S. Braun and J. R. Aschenbach (2021):  
 Menthol stimulates calcium absorption in the rumen but not in the jejunum of sheep.  
 J Dairy Sci 104: 3067-3081. DOI: 10.3168/jds.2020-19372.
- Gentile, A., S. Sconza, I. Lorenz, G. Otranto, G. Rademacher, P. Famigli-Bergamini and W. Klee (2004):  
 D-Lactic acidosis in calves as a consequence of experimentally induced ruminal acidosis.  
 J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 51: 64-70. DOI: 10.1111/j.1439-0442.2004.00600.x.
- Gerber, P. J., A. N. Hristov, B. Henderson, H. Makkar, J. Oh, C. Lee, R. Meinen, F. Montes, T. Ott, J. Firkins, A. Rotz, C. Dell, A. T. Adesogan, W. Z. Yang, J. M. Tricarico, E. Kebreab, G. Waghorn, J. Dijkstra and S. Oosting (2013):  
 Technical options for the mitigation of direct methane and nitrous oxide emissions from livestock: a review.  
 Animal 7 Suppl 2: 220-234. DOI: 10.1017/s1751731113000876.
- Gontijo, D. A., A. A. Borges and F. Wouters (2017):  
 Nitrate/nitrite poisoning in dairy cattle from the Midwestern Minas Gerais, Brazil.  
 Ciência Rural [online] 47. DOI: 10.1590/0103-8478cr20170373.
- Graham, C. and N. L. Simmons (2005):  
 Functional organization of the bovine rumen epithelium.  
 Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 288: R173-181. DOI: 10.1152/ajpregu.00425.2004.
- Haber, F. and R. Le Rossignol (1913):  
 Über die technische Darstellung von Ammoniak aus den Elementen.  
 Z f Elektroch 19: 53-72. DOI: 10.1002/bbpc.19130190201.
- Hamm, L. L., N. Nakhoul and K. S. Hering-Smith (2015):  
 Acid-Base Homeostasis.  
 Clin J Am Soc Nephrol 10: 2232-2242. DOI: 10.2215/cjn.07400715.
- Handlogten, M. E., S. P. Hong, L. Zhang, A. W. Vander, M. L. Steinbaum, M. Campbell-Thompson and I. D. Weiner (2005):  
 Expression of the ammonia transporter proteins Rh B glycoprotein and Rh C glycoprotein in the intestinal tract.  
 Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology 288: G1036-1047. DOI: 10.1152/ajpgi.00418.2004.
- Harmeyer, J. and H. Martens (1980):  
 Aspects of urea metabolism in ruminants with reference to the goat.  
 J Dairy Sci 63: 1707-1728. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(80)83132-8.
- Hartertinger, T., N. Gresner and K. H. Südekum (2018):  
 Does intra-ruminal nitrogen recycling waste valuable resources? A review of major players and their manipulation.  
 J Anim Sci Biotechnol 9: 33. DOI: 10.1186/s40104-018-0249-x.

- Herm, G., A. S. Muscher-Banse, G. Breves, B. Schröder and M. R. Wilkens (2015):  
Renal mechanisms of calcium homeostasis in sheep and goats.  
J Anim Sci 93: 1608-1621. DOI: 10.2527/jas.2014-8450.
- Hernández, J., J. L. Benedito, A. Abuelo and C. Castillo (2014):  
Ruminal acidosis in feedlot: from aetiology to prevention.  
Sci World J 2014: 702572. DOI: 10.1155/2014/702572.
- Hinders, R. G. and F. G. Owen (1965):  
Relation of ruminal parakeratosis development to volatile fatty acid absorption.  
J Dairy Sci 48: 1069-1073. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(65)88393-X.
- Hoefl, B., J. Linseisen, L. Beckmann, K. Müller-Decker, F. Canzian, A. Hüsing, R. Kaaks, U. Vogel, M. U. Jakobsen, K. Overvad, R. D. Hansen, S. Knüppel, H. Boeing, A. Trichopoulou, Y. Koumantaki, D. Trichopoulos, F. Berrino, D. Palli, S. Panico, R. Tumino, H. B. Bueno-de-Mesquita, F. J. van Duijnhoven, C. H. van Gils, P. H. Peeters, V. Dumeaux, E. Lund, J. M. Huerta Castaño, X. Muñoz, L. Rodriguez, A. Barricarte, J. Manjer, K. Jirström, B. Van Guelpen, G. Hallmans, E. A. Spencer, F. L. Crowe, K. T. Khaw, N. Wareham, S. Morois, M. C. Boutron-Ruault, F. Clavel-Chapelon, V. Chajes, M. Jenab, P. Boffetta, P. Vineis, T. Mouw, T. Norat, E. Riboli and A. Nieters (2010):  
Polymorphisms in fatty-acid-metabolism-related genes are associated with colorectal cancer risk.  
Carcinogenesis 31: 466-472. DOI: 10.1093/carcin/bgp325.
- Höller, H., G. Breves, M. Kocabatmaz and H. Gerdes (1988):  
Flux of calcium across the sheep rumen wall in vivo and in vitro.  
Q J Exp Physiol 73: 609-618. DOI: 10.1113/expphysiol.1988.sp003180.
- Hooper, P. T. (1975):  
Spongy degeneration in the central nervous system of domestic animals. Part III: Occurrence and pathogenesis hepatocerebral disease caused by hyperammonaemia.  
Acta Neuropathol 31: 343-351. DOI: 10.1007/bf00687929.
- Hu, H., J. Grandl, M. Bandell, M. Petrus and A. Patapoutian (2009):  
Two amino acid residues determine 2-APB sensitivity of the ion channels TRPV3 and TRPV4.  
Proc Natl Acad Sci U S A 106: 1626-1631. DOI: 10.1073/pnas.0812209106.
- Huntington, G. B. (1986):  
Uptake and transport of nonprotein nitrogen by the ruminant gut.  
Fed Proc 45: 2272-2276. PMID: 3720966.
- Jared, S. R. and J. P. Rao (2017):  
Transepithelial sodium transport across frog skin.  
Adv Physiol Educ 41: 444-447. DOI: 10.1152/advan.00115.2016.
- Kaji, I., Y. Yasuoka, S. Karaki and A. Kuwahara (2012):  
Activation of TRPA1 by luminal stimuli induces EP4-mediated anion secretion in human and rat colon.  
Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology 302: G690-701. DOI: 10.1152/ajpgi.00289.2011.

- Kalinin, A. E., A. V. Kajava and P. M. Steinert (2002):  
Epithelial barrier function: assembly and structural features of the cornified cell envelope.  
Bioessays 24: 789-800. DOI: 10.1002/bies.10144.
- Karashima, Y., N. Damann, J. Prenen, K. Talavera, A. Segal, T. Voets and B. Nilius (2007):  
Bimodal action of menthol on the transient receptor potential channel TRPA1.  
J Neurosci 27: 9874-9884. DOI: 10.1523/jneurosci.2221-07.2007.
- Kennedy, P. M. and L. P. Milligan (1980):  
The degradation and utilization of endogenous urea in the gastrointestinal tract of ruminants:  
a review.  
Can J Anim Sci 60: 205-221. DOI: 10.4141/cjas80-030.
- Kleen, J. L., G. A. Hooijer, J. Rehage and J. P. Noordhuizen (2003):  
Subacute ruminal acidosis (SARA): a review.  
J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med 50: 406-414. DOI: 10.1046/j.1439-0442.2003.00569.x.
- Knepper, M. A. (1991):  
NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport in the kidney.  
Kidney Int Suppl 33: S95-102. PMID: 1890804.
- Koefoed-Johnsen, V. and H. H. Ussing (1958):  
The nature of the frog skin potential.  
Acta Physiol Scand 42: 298-308. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1958.tb01563.x.
- Kramer, H. (2019):  
Diet and Chronic Kidney Disease.  
Adv Nutr 10: S367-s379. DOI: 10.1093/advances/nmz011.
- Kues, W. A., M. Blickwede and K. G. Georg Thieme Verlag (2021):  
Biochemie für die Tiermedizin: basierend auf dem Werk von Joachim Rassow, Karin Hauser,  
Roland Netzker, Rainer Deutzmann.  
Stuttgart  
New York, Georg Thieme Verlag - ISBN 978-3-13-240165-5  
3-13-240165-X
- Lang, I. and H. Martens (1999):  
Na transport in sheep rumen is modulated by voltage-dependent cation conductance in  
apical membrane.  
Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology  
277: G609-G618. DOI: 10.1152/ajpgi.1999.277.3.G609.
- Lapierre, H., M. Larsen, D. Sauvant, M. E. Van Amburgh and G. Van Duinkerken (2018):  
Review: Converting nutritional knowledge into feeding practices: a case study comparing  
different protein feeding systems for dairy cows.  
Animal 12: s457-s466. DOI: 10.1017/S1751731118001763.
- Lapierre, H. and G. E. Lobley (2001):  
Nitrogen Recycling in the Ruminant: A Review.  
J Dairy Sci 84: E223-E236. DOI: 10.3168/jds.S0022-0302(01)70222-6.

Lapierre, H., R. Martineau, M. D. Hanigan, H. J. van Lingen, E. Kebreab, J. W. Spek and D. R. Ouellet (2020):

Review: Impact of protein and energy supply on the fate of amino acids from absorption to milk protein in dairy cows.

Animal 14: s87-s102. DOI: 10.1017/s1751731119003173.

Lascano, G. J., G. I. Zanton, M. L. Moody, P. A. Topper, E. F. Wheeler and A. J. Heinrichs (2008):

Short communication: effect of changing the ratio of forage to concentrate on ammonia emissions by dairy heifers.

J Dairy Sci 91: 4301-4306. DOI: 10.3168/jds.2008-1176.

Lavker, R., W. Chalupa and J. F. Dickey (1969):

An electron microscopic investigation of rumen mucosa.

J Ultrastruct Res 28: 1-15. DOI: 10.1016/s0022-5320(69)90002-1.

Lee, S. P., M. T. Buber, Q. Yang, R. Cerne, R. Y. Cortés, D. G. Sprous and R. W. Bryant (2008):

Thymol and related alkyl phenols activate the hTRPA1 channel.

Br J Pharmacol 153: 1739-1749. DOI: 10.1038/bjp.2008.85.

Leonhard-Marek, S. (2002):

Divalent cations reduce the electrogenic transport of monovalent cations across rumen epithelium.

J Comp Physiol B 172: 635-641. DOI: 10.1007/s00360-002-0292-x.

Leonhard-Marek, S., F. Stumpff, I. Brinkmann, G. Breves and H. Martens (2005):

Basolateral Mg<sup>2+</sup>/Na<sup>+</sup> exchange regulates apical nonselective cation channel in sheep rumen epithelium via cytosolic Mg<sup>2+</sup>.

Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology 288: G630-G645. DOI: 10.1152/ajpgi.00275.2004.

Leonhard-Marek, S., F. Stumpff and H. Martens (2010):

Transport of cations and anions across forestomach epithelia: conclusions from in vitro studies.

Animal 4: 1037-1056. DOI: 10.1017/s1751731110000261.

Leonhard, S., E. Smith, H. Martens, G. Gäbel and E. Ganzoni (1990):

Transport of magnesium across an isolated preparation of sheep rumen: a comparison of MgCl<sub>2</sub>, Mg aspartate, Mg pidolate, and Mg-EDTA.

Magnes Trace Elem 9: 265-271. PMID: 2130824.

Levitt, D. G. and M. D. Levitt (2018):

A model of blood-ammonia homeostasis based on a quantitative analysis of nitrogen metabolism in the multiple organs involved in the production, catabolism, and excretion of ammonia in humans.

Clin Exp Gastroenterol 11: 193-215. DOI: 10.2147/ceg.S160921.

Levitt, M. D. and D. G. Levitt (2019):

Use Of Quantitative Modelling To Elucidate The Roles Of The Liver, Gut, Kidney, And Muscle In Ammonia Homeostasis And How Lactulose And Rifaximin Alter This Homeostasis.

Int J Gen Med 12: 367-380. DOI: 10.2147/ijgm.S218405.



- Li, M., J. Jiang and L. Yue (2006):  
Functional characterization of homo- and heteromeric channel kinases TRPM6 and TRPM7.  
J Gen Physiol 127: 525-537. DOI: 10.1085/jgp.200609502.
- Li, M. M., E. C. Titgemeyer and M. D. Hanigan (2019):  
A revised representation of urea and ammonia nitrogen recycling and use in the Molly cow  
model.  
J Dairy Sci 102: 5109-5129. DOI: 10.3168/jds.2018-15947.
- Liebe, F., H. Liebe, S. Kaessmeyer, G. Sponder and F. Stumpff (2020):  
The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a  
protein relevant for ruminal ammonia transport.  
Pflugers Arch 472: 693-710. DOI: 10.1007/s00424-020-02393-2.
- Liebe, F., H. Liebe, S. Mergler, G. Sponder and F. Stumpff (2022):  
Effects of butyrate- on ruminal Ca<sup>2+</sup> transport: evidence for the involvement of apically  
expressed TRPV3 and TRPV4 channels.  
Pflugers Arch 474: 315-342. DOI: 10.1007/s00424-021-02647-7.
- Liebe, H., F. Liebe, G. Sponder, S. Hedtrich and F. Stumpff (2021):  
Beyond Ca<sup>2+</sup> signalling: the role of TRPV3 in the transport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.  
Pflugers Arch 473: 1859-1884. DOI: 10.1007/s00424-021-02616-0.
- Liebich, H.-G. (2010):  
Funktionelle Histologie der Haussäugetiere und Vögel : Lehrbuch und Farbatlas für Studium  
und Praxis / Hans-Georg Liebich.  
Stuttgart [u.a, Schattauer - ISBN 978-3-7945-2692-5
- Liu, L., D. Sun, S. Mao, W. Zhu and J. Liu (2019):  
Infusion of sodium butyrate promotes rumen papillae growth and enhances expression of  
genes related to rumen epithelial VFA uptake and metabolism in neonatal twin lambs.  
J Anim Sci 97: 909-921. DOI: 10.1093/jas/sky459.
- Lodemann, U. and H. Martens (2006):  
Effects of diet and osmotic pressure on Na<sup>+</sup> transport and tissue conductance of sheep  
isolated rumen epithelium.  
Exp Physiol 91: 539-550. DOI: 10.1113/expphysiol.2005.032078.
- Lu, Z., H. Gui, L. Yao, L. Yan, H. Martens, J. R. Aschenbach and Z. Shen (2015):  
Short-chain fatty acids and acidic pH upregulate UT-B, GPR41, and GPR4 in rumen  
epithelial cells of goats.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 308: R283-293. DOI: 10.1152/ajpregu.00323.2014.
- Lu, Z., F. Stumpff, C. Deiner, J. Rosendahl, H. Braun, K. Abdoun, J. R. Aschenbach and H.  
Martens (2014):  
Modulation of sheep ruminal urea transport by ammonia and pH.  
Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 307: R558-570. DOI: 10.1152/ajpregu.00107.2014.
- Lutz, T. and E. Scharrer (1991):  
Effect of short-chain fatty acids on calcium absorption by the rat colon.  
Exp Physiol 76: 615-618. DOI: 10.1113/expphysiol.1991.sp003530.

Macpherson, L. J., S. W. Hwang, T. Miyamoto, A. E. Dubin, A. Patapoutian and G. M. Story (2006):

More than cool: Promiscuous relationships of menthol and other sensory compounds. *Mol Cell Neurosci* 32: 335-343. DOI: 10.1016/j.mcn.2006.05.005.

Maines, E., G. Gugelmo, E. Tadiotto, A. Pietrobelli, N. Campostrini, A. Pasini, F. Ion-Popa, M. Vincenzi, F. Teofoli, M. Camilot and A. Bordugo (2017):

High-protein goat's milk diet identified through newborn screening: clinical warning of a potentially dangerous dietetic practice.

*Public Health Nutrition* 20: 2806-2809. DOI: 10.1017/S1368980017001628.

Manneck, D., H.-S. Braun, K. T. Schrapers and F. Stumpff (2021a):

TRPV3 and TRPV4 as candidate proteins for intestinal ammonium absorption.

*Acta Physiol* 233: e13694. DOI: 10.1111/apha.13694.

Manneck, D., G. Manz, H. S. Braun, J. Rosendahl and F. Stumpff (2021b):

The TRPA1 Agonist Cinnamaldehyde Induces the Secretion of HCO<sub>3</sub><sup>(-)</sup> by the Porcine Colon.

*Int J Mol Sci* 22. DOI: 10.3390/ijms22105198.

Martens, H., G. Gäbel and B. Strozyk (1991):

Mechanism of electrically silent Na and Cl transport across the rumen epithelium of sheep.

*Exp Physiol* 76: 103-114. DOI: 10.1113/expphysiol.1991.sp003472.

Martens, H., S. Leonhard-Marek, M. Röntgen and F. Stumpff (2018):

Magnesium homeostasis in cattle: absorption and excretion.

*Nutr Res Rev* 31: 114-130. DOI: 10.1017/s0954422417000257.

Martens, H. and M. Schweigel (2000):

Pathophysiology of grass tetany and other hypomagnesemias. Implications for clinical management.

*Vet Clin North Am Food Anim Pract* 16: 339-368. DOI: 10.1016/s0749-0720(15)30109-2.

Matoori, S. and J. C. Leroux (2015):

Recent advances in the treatment of hyperammonemia.

*Adv Drug Deliv Rev* 90: 55-68. DOI: 10.1016/j.addr.2015.04.009.

McDonald, I. W. (1948):

The absorption of ammonia from the rumen of the sheep.

*Biochem J* 42: 584-587.

Meissner, S., F. Hagen, C. Deiner, D. Günzel, G. Greco, Z. Shen and J. R. Aschenbach (2017):

Key role of short-chain fatty acids in epithelial barrier failure during ruminal acidosis.

*J Dairy Sci* 100: 6662-6675. DOI: 10.3168/jds.2016-12262.

Mese, G., G. Richard and T. W. White (2007):

Gap junctions: basic structure and function.

*J Invest Dermatol* 127: 2516-2524. DOI: 10.1038/sj.jid.5700770.

Metges, C. C. (2000):

Contribution of microbial amino acids to amino acid homeostasis of the host.

*J Nutr* 130: 1857s-1864s. DOI: 10.1093/jn/130.7.1857S.

Michiels, A., S. Piepers, T. Ulens, N. Van Ransbeeck, R. Del Pozo Sacristán, A. Sierens, F. Haesebrouck, P. Demeyer and D. Maes (2015):  
Impact of particulate matter and ammonia on average daily weight gain, mortality and lung lesions in pigs.  
Prev Vet Med 121: 99-107. DOI: 10.1016/j.prevetmed.2015.06.011.

Molinari, G. and E. Nervo (2021):  
Role of protons in calcium signaling.  
Biochem J 478: 895-910. DOI: 10.1042/BCJ20200971.

Monteiro, H. F. and A. P. Faciola (2020):  
Ruminal acidosis, bacterial changes, and lipopolysaccharides.  
J Anim Sci 98. DOI: 10.1093/jas/skaa248.

Moore, C. and W. B. Liedtke (2017):  
Osmomechanical-Sensitive TRPV Channels in Mammals.  
Neurobiology of TRP Channels. T. L. R. Emir. Boca Raton (FL), CRC Press/Taylor & Francis.

Musa-Aziz, R., L.-M. Chen, M. F. Pelletier and W. F. Boron (2009):  
Relative CO<sub>2</sub>/NH<sub>3</sub> selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG.  
Proc Natl Acad Sci 106: 5406. DOI: 10.1073/pnas.0813231106.

Mutoh, K. and H. Wakuri (1989):  
Early organogenesis of the caprine stomach.  
Nihon Juigaku Zasshi 51: 474-484. DOI: 10.1292/jvms1939.51.474.

Mutsvangwa, T., K. L. Davies, J. J. McKinnon and D. A. Christensen (2016):  
Effects of dietary crude protein and rumen-degradable protein concentrations on urea recycling, nitrogen balance, omasal nutrient flow, and milk production in dairy cows.  
J Dairy Sci 99: 6298-6310. DOI: 10.3168/jds.2016-10917.

Neher, E. and B. Sakmann (1976):  
Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres.  
Nature 260: 799-802. DOI: 10.1038/260799a0.

Neuhäuser, B., M. Dynowski and U. Ludewig (2014):  
Switching substrate specificity of AMT/MEP/ Rh proteins.  
Channels (Austin) 8: 496-502. DOI: 10.4161/19336950.2014.967618.

Nilius, B. and T. Biro (2013):  
TRPV3: a 'more than skinny' channel.  
Exp Dermatol 22: 447-452. DOI: 10.1111/exd.12163.

Nilius, B. and V. Flockerzi (2014):  
Mammalian Transient Receptor Potential (TRP) Cation Channels Volume I / edited by Bernd Nilius, Veit Flockerzi.  
Berlin, Heidelberg, Springer Berlin Heidelberg - ISBN 3-642-54215-8

- Norton, B. W., A. N. Janes and D. G. Armstrong (1982a):  
The effects of intraruminal infusions of sodium bicarbonate, ammonium chloride and sodium butyrate on urea metabolism in sheep.  
Br J Nutr 48: 265-274. DOI: 10.1079/bjn19820112.
- Norton, B. W., J. B. Mackintosh and D. G. Armstrong (1982b):  
Urea synthesis and degradation in sheep given pelleted-grass diets containing flaked barley.  
Br J Nutr 48: 249-264. DOI: 10.1079/bjn19820111.
- Numberger, M. and A. Draguhn (1996):  
Patch-Clamp-Technik.  
Heidelberg [u.a.], Spektrum, Akad. Verl. - ISBN 3-8274-0023-6  
978-3-8274-0023-9
- Oetzel, G. R. (2017):  
Diagnosis and Management of Subacute Ruminant Acidosis in Dairy Herds.  
Vet Clin North Am Food Anim Pract 33: 463-480. DOI: 10.1016/j.cvfa.2017.06.004.
- Omer, A. K., R. R. Mohammed, P. S. M. Ameen, Z. A. Abas and K. Ekici (2021):  
Presence of Biogenic Amines in Food and Their Public Health Implications: A Review.  
J Food Prot 84: 1539-1548. DOI: 10.4315/jfp-21-047.
- Ott, P. and H. Vilstrup (2014):  
Cerebral effects of ammonia in liver disease: current hypotheses.  
Metab Brain Dis 29: 901-911. DOI: 10.1007/s11011-014-9494-7.
- Pearson, R. M. and J. A. Smith (1943):  
The utilization of urea in the bovine rumen. 2. The conversion of urea to ammonia.  
Biochem J 37: 148-153. DOI: 10.1042/bj0370148.
- Phelps, C. B., R. R. Wang, S. S. Choo and R. Gaudet (2010):  
Differential regulation of TRPV1, TRPV3, and TRPV4 sensitivity through a conserved binding site on the ankyrin repeat domain.  
J Biol Chem 285: 731-740. DOI: 10.1074/jbc.M109.052548.
- Pires, P. W., M. N. Sullivan, H. A. Pritchard, J. J. Robinson and S. Earley (2015):  
Unitary TRPV3 channel Ca<sup>2+</sup> influx events elicit endothelium-dependent dilation of cerebral parenchymal arterioles.  
Am J Physiol Heart Circ Physiol 309: H2031-2041. DOI: 10.1152/ajpheart.00140.2015.
- Plaizier, J. C., D. O. Krause, G. N. Gozho and B. W. McBride (2008):  
Subacute ruminal acidosis in dairy cows: the physiological causes, incidence and consequences.  
Vet J 176: 21-31. DOI: 10.1016/j.tvjl.2007.12.016.
- Proverbio, M. C., E. Mangano, A. Gessi, R. Bordoni, R. Spinelli, R. Asselta, P. S. Valin, S. Di Candia, I. Zamproni, C. Diceglie, S. Mora, M. Caruso-Nicoletti, A. Salvatoni, G. De Bellis and C. Battaglia (2013):  
Whole genome SNP genotyping and exome sequencing reveal novel genetic variants and putative causative genes in congenital hyperinsulinism.  
PLoS One 8: e68740. DOI: 10.1371/journal.pone.0068740.

- Rabbani, I., H. S. Braun, T. Akhtar, F. Liebe, J. Rosendahl, M. Grunau, U. Tietjen, S. Masood, S. Kaesmeyer, D. Gunzel, H. Rehman and F. Stumpff (2018):  
A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from *Bos indicus* crossbreds versus *Bos taurus*.  
*Anim Sci J*. DOI: 10.1111/asj.13107.
- Rabbani, I., C. Siegling-Vlitakis, B. Noci and H. Martens (2011):  
Evidence for NHE3-mediated Na transport in sheep and bovine forestomach.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 301: R313-319. DOI: 10.1152/ajpregu.00580.2010.
- Ravishankara, A. R., J. S. Daniel and R. W. Portmann (2009):  
Nitrous Oxide (N<sub>2</sub>O): The Dominant Ozone-Depleting Substance Emitted in the 21st Century.  
*Science* 326: 123-125. DOI: 10.1126/science.1176985.
- Rémond, D., P. Nozière and C. Poncet (2002):  
Effect of time of starch supply to the rumen on the dynamics of urea and ammonia net flux across the rumen wall of sheep.  
*Anim. Res.* 51: 3-13. DOI: 10.1051/animres:2002002.
- Reynolds, C. K. and N. B. Kristensen (2008):  
Nitrogen recycling through the gut and the nitrogen economy of ruminants: an asynchronous symbiosis.  
*J Anim Sci* 86: E293-305. DOI: 10.2527/jas.2007-0475.
- Rodríguez, R., A. Sosa and Y. Rodríguez (2007):  
Microbial protein synthesis in rumen and its importance to ruminants.  
*Cuba J Agric Sci* 41.
- Røjen, B. A., S. B. Poulsen, P. K. Theil, R. A. Fenton and N. B. Kristensen (2011):  
Short communication: Effects of dietary nitrogen concentration on messenger RNA expression and protein abundance of urea transporter-B and aquaporins in ruminal papillae from lactating Holstein cows.  
*J Dairy Sci* 94: 2587-2591. DOI: 10.3168/jds.2010-4073.
- Roos, A. and W. F. Boron (1981):  
Intracellular pH.  
*Physiol Rev* 61: 296-434. DOI: 10.1152/physrev.1981.61.2.296.
- Rosendahl, J., H. S. Braun, K. T. Schrapers, H. Martens and F. Stumpff (2016):  
Evidence for the functional involvement of members of the TRP channel family in the uptake of Na<sup>+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> by the ruminal epithelium.  
*Pflugers Arch* 468: 1333-1352. DOI: 10.1007/s00424-016-1835-4.
- Salem, H. A., T. J. Devlin and R. R. Marquardt (1973):  
Effects of urea on the activity of glutamate dehydrogenase, glutamine synthetase, carbamyl phosphate synthetase, and carbamyl phosphokinase in ruminant tissues.  
*Can J Anim Sci* 53: 503-511. DOI: 10.4141/cjas73-077.
- Saparov, S. M., K. Liu, P. Agre and P. Pohl (2007):  
Fast and Selective Ammonia Transport by Aquaporin-8\*.  
*J Biol Chem* 282: 5296-5301. DOI: 10.1074/jbc.M609343200.

- Schmack, K.-H. (2016):  
Die beschädigte Kuh im Harnstoffwahnsinn oder Das Degenerationssyndrom des Rindes.  
Warendorf, Schnell Verlag - ISBN 3-87716-664-4
- Schmitz, C., F. Deason and A. L. Perraud (2007):  
Molecular components of vertebrate Mg<sup>2+</sup>-homeostasis regulation.  
Magnes Res 20: 6-18. PMID: 17536484.
- Schrapers, K. T., G. Sponder, F. Liebe, H. Liebe and F. Stumpff (2018):  
The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.  
PLoS One 13: e0193519. DOI: 10.1371/journal.pone.0193519.
- Schröder, B., I. Rittmann, E. Pfeffer and G. Breves (1997):  
In vitro studies on calcium absorption from the gastrointestinal tract in small ruminants.  
J Comp Physiol B 167: 43-51. DOI: 10.1007/s003600050046.
- Schröder, B., S. Vössing and G. Breves (1999):  
In vitro studies on active calcium absorption from ovine rumen.  
J Comp Physiol B 169: 487-494. DOI: 10.1007/s003600050246.
- Schröder, B., M. R. Wilkens, G. E. Ricken, S. Leonhard-Marek, D. R. Fraser and G. Breves (2015):  
Calcium transport in bovine rumen epithelium as affected by luminal Ca concentrations and Ca sources.  
Physiol Rep 3. DOI: 10.14814/phy2.12615.
- Schultheiss, G. and H. Martens (1999):  
Ca-sensitive Na transport in sheep omasum.  
Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology 276: G1331-1344. PMID: 10362636.
- Schwab, C. G. and G. A. Broderick (2017):  
A 100-Year Review: Protein and amino acid nutrition in dairy cows.  
J Dairy Sci 100: 10094-10112. DOI: 10.3168/jds.2017-13320.
- Schweigel, M., M. Kolisek, Z. Nikolic and J. Kuzinski (2008):  
Expression and functional activity of the Na/Mg exchanger, TRPM7 and MagT1 are changed to regulate Mg homeostasis and transport in rumen epithelial cells.  
Magnes Res 21: 118-123. DOI: 10.1684/mrh.2008.0137.
- Scott, D. (1966):  
The effects of sodium depletion and potassium supplements upon electrical potentials in the rumen of the sheep.  
Q J Exp Physiol Cogn Med Sci 51: 60-69. DOI: 10.1113/expphysiol.1966.sp001825.
- Sehested, J., L. Diernaes, P. D. Møller and E. Skadhauge (1999):  
Ruminal transport and metabolism of short-chain fatty acids (SCFA) in vitro: effect of SCFA chain length and pH.  
Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol 123: 359-368. DOI: 10.1016/s1095-6433(99)00074-4.

Shikano, M., T. Ueda, T. Kamiya, Y. Ishida, T. Yamada, T. Mizushima, T. Shimura, T. Mizoshita, S. Tanida, H. Kataoka, S. Shimada, S. Ugawa and T. Joh (2011):  
Acid inhibits TRPV4-mediated Ca(2)(+) influx in mouse esophageal epithelial cells.  
*Neurogastroenterol Motil* 23: 1020-1028, e1497. DOI: 10.1111/j.1365-2982.2011.01767.x.

Simmons, N. L., A. S. Chaudhry, C. Graham, E. S. Scriven, A. Thistlethwaite, C. P. Smith and G. S. Stewart (2009):  
Dietary regulation of ruminal bovine UT-B urea transporter expression and localization.  
*J Anim Sci* 87: 3288-3299. DOI: 10.2527/jas.2008-1710.

Singh, J., A. Kunhikrishnan, N. S. Bolan and S. Saggari (2013):  
Impact of urease inhibitor on ammonia and nitrous oxide emissions from temperate pasture soil cores receiving urea fertilizer and cattle urine.  
*Sci Total Environ* 465: 56-63. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.02.018.

Slyter, L. L., L. D. Satter and D. A. Dinius (1979):  
Effect of Ruminal Ammonia Concentration on Nitrogen Utilization by Steers.  
*J Anim Sci* 48: 906-912. DOI: 10.2527/jas1979.484906x.

Snyder, E. and B. Credille (2017):  
Diagnosis and Treatment of Clinical Rumen Acidosis.  
*Vet Clin North Am Food Anim Pract* 33: 451-461. DOI: 10.1016/j.cvfa.2017.06.003.

Sokabe, T., T. Fukumi-Tominaga, S. Yonemura, A. Mizuno and M. Tominaga (2010):  
The TRPV4 channel contributes to intercellular junction formation in keratinocytes.  
*J Biol Chem* 285: 18749-18758. DOI: 10.1074/jbc.M110.103606.

Sonkusare, S. K., A. D. Bonev, J. Ledoux, W. Liedtke, M. I. Kotlikoff, T. J. Heppner, D. C. Hill-Eubanks and M. T. Nelson (2012):  
Elementary Ca<sup>2+</sup> signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function.  
*Science* 336: 597-601. DOI: 10.1126/science.1216283.

Starke, S., A. S. Muscher, N. Hirschhausen, E. Pfeffer, G. Breves and K. Huber (2012):  
Expression of urea transporters is affected by dietary nitrogen restriction in goat kidney.  
*J Anim Sci* 90: 3889-3897. DOI: 10.2527/jas.2011-4262.

Steele, M. A., O. AlZahal, S. E. Hook, J. Croom and B. W. McBride (2009):  
Ruminal acidosis and the rapid onset of ruminal parakeratosis in a mature dairy cow: a case report.  
*Acta Vet Scand* 51: 39. DOI: 10.1186/1751-0147-51-39.

Steele, M. A., J. Croom, M. Kahler, O. AlZahal, S. E. Hook, K. Plaizier and B. W. McBride (2011):  
Bovine rumen epithelium undergoes rapid structural adaptations during grain-induced subacute ruminal acidosis.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 300: R1515-1523. DOI: 10.1152/ajpregu.00120.2010.

Stein, L. Y. and M. G. Klotz (2016):  
The nitrogen cycle.  
*Curr Biol* 26: R94-98. DOI: 10.1016/j.cub.2015.12.021.

Stewart, G. S., C. Graham, S. Cattell, T. P. Smith, N. L. Simmons and C. P. Smith (2005):  
UT-B is expressed in bovine rumen: potential role in ruminal urea transport.  
*Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 289: R605-r612. DOI: 10.1152/ajpregu.00127.2005.

Stumpff, F. (2018):  
A look at the smelly side of physiology: transport of short chain fatty acids.  
*Pflugers Arch* 470: 571-598. DOI: 10.1007/s00424-017-2105-9.

Stumpff, F., M. I. Georgi, L. Mundhenk, I. Rabbani, M. Fromm, H. Martens and D. Günzel  
(2011):  
Sheep rumen and omasum primary cultures and source epithelia: barrier function aligns with  
expression of tight junction proteins.  
*J Exp Biol* 214: 2871-2882. DOI: 10.1242/jeb.055582.

Stumpff, F., U. Lodemann, A. G. Van Kessel, R. Pieper, S. Klingspor, K. Wolf, H. Martens, J.  
Zentek and J. R. Aschenbach (2013):  
Effects of dietary fibre and protein on urea transport across the cecal mucosa of piglets.  
*J Comp Physiol B* 183: 1053-1063. DOI: 10.1007/s00360-013-0771-2.

Symonds, H. W., D. L. Mather and K. A. Collis (1981):  
The maximum capacity of the liver of the adult dairy cow to metabolize ammonia.  
*Br J Nutr* 46: 481-486. DOI: 10.1079/bjn19810056.

Szollosi, A. G., N. Vasas, A. Angyal, K. Kistamas, P. P. Nanasi, J. Mihaly, G. Beke, E.  
Herczeg-Lisztos, A. Szegedi, N. Kawada, T. Yanagida, T. Mori, L. Kemeny and T. Biro  
(2018):  
Activation of TRPV3 Regulates Inflammatory Actions of Human Epidermal Keratinocytes.  
*J Invest Dermatol* 138: 365-374. DOI: 10.1016/j.jid.2017.07.852.

Tamate, H. and T. Kikuchi (1978):  
Electron microscopic study on parakeratotic ruminal epithelium in beef cattle.  
*Nihon Juigaku Zasshi* 40: 21-30. DOI: 10.1292/jvms1939.40.21.

Taylor, J. R. (2002):  
Theory of ammonia toxicity as the mechanism of abortion in the mare reproductive loss  
syndrome.  
*J Equine Vet Sci* 22: 237-239. DOI: 10.1016/S0737-0806(02)70058-0.

Taylor, L. and N. P. Curthoys (2004):  
Glutamine metabolism: Role in acid-base balance\*.  
*Biochem Mol Biol Educ* 32: 291-304. DOI: 10.1002/bmb.2004.494032050388.

Thakore, P. and S. Earley (2019):  
Transient Receptor Potential Channels and Endothelial Cell Calcium Signaling.  
*Compr Physiol* 9: 1249-1277. DOI: 10.1002/cphy.c180034.



Thorneloe, K. S., M. Cheung, W. Bao, H. Alsaïd, S. Lenhard, M. Y. Jian, M. Costell, K. Maniscalco-Hauk, J. A. Krawiec, A. Olzinski, E. Gordon, I. Lozinskaya, L. Elefante, P. Qin, D. S. Matasic, C. James, J. Tunstead, B. Donovan, L. Kallal, A. Waszkiewicz, K. Vaidya, E. A. Davenport, J. Larkin, M. Burgert, L. N. Casillas, R. W. Marquis, G. Ye, H. S. Eidam, K. B. Goodman, J. R. Toomey, T. J. Roethke, B. M. Jucker, C. G. Schnackenberg, M. I. Townsley, J. J. Lepore and R. N. Willette (2012):

An orally active TRPV4 channel blocker prevents and resolves pulmonary edema induced by heart failure.

Sci Transl Med 4: 159ra148. DOI: 10.1126/scitranslmed.3004276.

Thorneloe, K. S., A. C. Sulpizio, Z. Lin, D. J. Figueroa, A. K. Clouse, G. P. McCafferty, T. P. Chendrimada, E. S. Lashinger, E. Gordon, L. Evans, B. A. Misajet, D. J. Demarini, J. H. Nation, L. N. Casillas, R. W. Marquis, B. J. Votta, S. A. Sheardown, X. Xu, D. P. Brooks, N. J. Laping and T. D. Westfall (2008):

N-((1S)-1-[[4-((2S)-2-[[2,4-dichlorophenyl)sulfonyl]amino]-3-hydroxypropanoyl)-1-piperazinyl]carbonyl]-3-methylbutyl)-1-benzothiophene-2-carboxamide (GSK1016790A), a novel and potent transient receptor potential vanilloid 4 channel agonist induces urinary bladder contraction and hyperactivity: Part I.

J Pharmacol Exp Ther 326: 432-442. DOI: 10.1124/jpet.108.139295.

Toft-Bertelsen, T. L. and N. MacAulay (2021):

TRPV4 to the Point of Clarity: Understanding the Function of the Complex TRPV4 Ion Channel.

Cells 10. DOI: 10.3390/cells10010165.

Toribio, R. E. (2011):

Disorders of calcium and phosphate metabolism in horses.

Vet Clin North Am Equine Pract 27: 129-147. DOI: 10.1016/j.cveq.2010.12.010.

Ueda, T., M. Shikano, T. Kamiya, T. Joh and S. Ugawa (2011):

The TRPV4 channel is a novel regulator of intracellular Ca<sup>2+</sup> in human esophageal epithelial cells.

Am J Physiol - Gastrointestinal and Liver Physiology 301: G138-147. DOI: 10.1152/ajpgi.00511.2010.

Ueda, T., T. Yamada, S. Ugawa, Y. Ishida and S. Shimada (2009):

TRPV3, a thermosensitive channel is expressed in mouse distal colon epithelium.

Biochem Biophys Res Commun 383: 130-134. DOI: 10.1016/j.bbrc.2009.03.143.

Uppal, S. K., K. Wolf and H. Martens (2003):

The effect of short chain fatty acids on calcium flux rates across isolated rumen epithelium of hay-fed and concentrate-fed sheep.

J Anim Physiol Anim Nutr (Berl) 87: 12-20. DOI: 10.1046/j.1439-0396.2003.00401.x.

Ussing, H. H. and K. Zerahn (1951):

Active transport of sodium as the source of electric current in the short-circuited isolated frog skin.

Acta Physiol Scand 23: 110-127. DOI: 10.1111/j.1748-1716.1951.tb00800.x.

Vincent, F. and M. A. Duncton (2011):

TRPV4 agonists and antagonists.

Curr Top Med Chem 11: 2216-2226. DOI: 10.2174/156802611796904861.

- Voets, T., J. Prenen, J. Vriens, H. Watanabe, A. Janssens, U. Wissenbach, M. Bödding, G. Droogmans and B. Nilius (2002):  
Molecular determinants of permeation through the cation channel TRPV4.  
J Biol Chem 277: 33704-33710. DOI: 10.1074/jbc.M204828200.
- Vogt-Eisele, A. K., K. Weber, M. A. Sherkheli, G. Vielhaber, J. Panten, G. Gisselmann and H. Hatt (2007):  
Monoterpenoid agonists of TRPV3.  
Br J Pharmacol 151: 530-540. DOI: 10.1038/sj.bjp.0707245.
- von Engelhardt, W., G. Breves, M. Diener and G. Gäbel (2015):  
Physiologie der Haustiere. Enke - ISBN 9783830412700
- Vriens, J., B. Nilius and R. Vennekens (2008):  
Herbal compounds and toxins modulating TRP channels.  
Curr Neuropharmacol 6: 79-96. DOI: 10.2174/157015908783769644.
- Wadhwa, D. R. and A. D. Care (2000):  
The absorption of calcium ions from the ovine reticulo-rumen.  
J Comp Physiol B 170: 581-588. DOI: 10.1007/s003600000137.
- Wang, H., P. Yang, Y. Lu, J. Wang, J. Jeon, Q. Wang, J. B. Tian, B. Zang, Y. Yu and M. X. Zhu (2021):  
Mechanisms of proton inhibition and sensitization of the cation channel TRPV3.  
J Gen Physiol 153. DOI: 10.1085/jgp.202012663.
- Ward, M. H., R. R. Jones, J. D. Brender, T. M. de Kok, P. J. Weyer, B. T. Nolan, C. M. Villanueva and S. G. van Breda (2018):  
Drinking Water Nitrate and Human Health: An Updated Review.  
Int J Environ Res Public Health 15. DOI: 10.3390/ijerph15071557.
- Watanabe, H., J. Vriens, A. Janssens, R. Wondergem, G. Droogmans and B. Nilius (2003):  
Modulation of TRPV4 gating by intra- and extracellular Ca<sup>2+</sup>.  
Cell Calcium 33: 489-495. DOI: 10.1016/s0143-4160(03)00064-2.
- Weiner, I. D. and J. W. Verlander (2011):  
Role of NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transporters in renal acid-base transport.  
Am J Physiol Renal Physiol 300: F11-23. DOI: 10.1152/ajprenal.00554.2010.
- Weiner, I. D. and J. W. Verlander (2014):  
Ammonia transport in the kidney by Rhesus glycoproteins.  
Am J Physiol Renal Physiol 306: F1107-1120. DOI: 10.1152/ajprenal.00013.2014.
- Weiner, I. D. and J. W. Verlander (2019):  
Emerging Features of Ammonia Metabolism and Transport in Acid-Base Balance.  
Semin Nephrol 39: 394-405. DOI: 10.1016/j.semnephrol.2019.04.008.
- Weyrauch, K. D., A. Smollich and J. Plendl (2009):  
Histologie-Kurs für Veterinärmediziner / Karl Dietrich Weyrauch ; Alfred Smollich; Johanna Plendl.  
Stuttgart, Enke - ISBN 978-3-8304-1083-6

- Wickersham, T. A., E. C. Titgemeyer, R. C. Cochran, E. E. Wickersham and D. P. Gnad (2008):  
Effect of rumen-degradable intake protein supplementation on urea kinetics and microbial use of recycled urea in steers consuming low-quality forage.  
J Anim Sci 86: 3079-3088. DOI: 10.2527/jas.2007-0325.
- Wilkens, M. R., N. Mrochen, G. Breves and B. Schröder (2010):  
Effects of 1,25-dihydroxyvitamin D<sub>3</sub> on calcium and phosphorus homeostasis in sheep fed diets either adequate or restricted in calcium content.  
Domest Anim Endocrinol 38: 190-199. DOI: 10.1016/j.domaniend.2009.10.003.
- Wilkens, M. R., N. Mrochen, G. Breves and B. Schröder (2011):  
Gastrointestinal calcium absorption in sheep is mostly insensitive to an alimentary induced challenge of calcium homeostasis.  
Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 158: 199-207. DOI: 10.1016/j.cbpb.2010.11.008.
- Wilkens, M. R. and A. S. Muscher-Banse (2020):  
Review: Regulation of gastrointestinal and renal transport of calcium and phosphorus in ruminants.  
Animal 14: s29-s43. DOI: 10.1017/s1751731119003197.
- Wilkens, M. R., C. D. Nelson, L. L. Hernandez and J. A. A. McArt (2020):  
Symposium review: Transition cow calcium homeostasis-Health effects of hypocalcemia and strategies for prevention.  
J Dairy Sci 103: 2909-2927. DOI: 10.3168/jds.2019-17268.
- Wrage, N., G. L. Velthof, M. L. van Beusichem and O. Oenema (2001):  
Role of nitrifier denitrification in the production of nitrous oxide.  
Soil Biol Biochem 33: 1723-1732. DOI: 10.1016/S0038-0717(01)00096-7.
- Xiang, R., V. H. Oddy, A. L. Archibald, P. E. Vercoe and B. P. Dalrymple (2016):  
Epithelial, metabolic and innate immunity transcriptomic signatures differentiating the rumen from other sheep and mammalian gastrointestinal tract tissues.  
PeerJ 4: e1762. DOI: 10.7717/peerj.1762.
- Yadav, M. and C. Goswami (2017):  
TRPV3 mutants causing Olmsted Syndrome induce impaired cell adhesion and nonfunctional lysosomes.  
Channels 11: 196-208. DOI: 10.1080/19336950.2016.1249076.
- Zeuthen, T. and D. A. Klaerke (1999):  
Transport of Water and Glycerol in Aquaporin 3 Is Gated by H<sup>+</sup>.  
J Biol Chem 274: 21631-21636. DOI: 10.1074/jbc.274.31.21631.
- Zhang, Q., Y. Cao, Q. Luo, P. Wang, P. Shi, C. Song, M. E. J. Ren, B. Fu and H. Sun (2018):  
The transient receptor potential vanilloid-3 regulates hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cells proliferation via PI3K/AKT signaling pathway.  
Cell Prolif 51: e12436. DOI: 10.1111/cpr.12436.
- Zhong, C., A. Farrell and G. S. Stewart (2020):  
Localization of aquaporin-3 proteins in the bovine rumen.  
J Dairy Sci 103: 2814-2820. DOI: 10.3168/jds.2019-17735.

## Anhang: Publikationen in Co Autorenschaft

### A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from *Bos indicus* crossbreds versus *Bos taurus*

This article has been published in: *Animal science journal* = *Nihon chikusan Gakkaiho* (2018): 89(12), S. 1692–1700.

Manuscript received at the *Animal science journal*: 7 February 2018

Revised: 22 June 2018

Accepted: 3 August 2018

Published: 2 October 2018

DOI: 10.1111/asj.13107

#### Authors:

Imtiaz Rabbani, Hannah-Sophie Braun, Tasneem Akhtar, Franziska Liebe, Julia Rosendahl, Martin Grunau, Uwe Tietjen, Saima Masood, Sabine Kaessmeyer, Dorothee Günzel, Habib Rehman, Friederike Stumpff

Please purchase this part online:

<https://doi.org/10.1111/asj.13107>

# The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

This article has been published in: PLoS one; **13**(3), S. e0193519.

CC BY 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Manuscript received at the PLoS one: 23 September 2017

Accepted: 13 February 2018

Published: 1 March 2018

DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193519>

Authors:

Katharina T. Schrapers, Gerhard Sponder, Franziska Liebe, Hendrik Liebe , Friederike Stumpff

RESEARCH ARTICLE

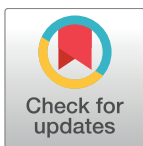
# The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Katharina T. Schrapers<sup>☯</sup>, Gerhard Sponder<sup>☯</sup>, Franziska Liebe, Hendrik Liebe, Friederike Stumpff\*

Institute of Veterinary Physiology, Faculty of Veterinary Medicine, Freie Universität Berlin, Berlin, Germany

☯ These authors contributed equally to this work.

\* [stumpff@zedat.fu-berlin.de](mailto:stumpff@zedat.fu-berlin.de)



## Abstract

Absorption of ammonia from the gastrointestinal tract results in problems that range from hepatic encephalopathy in humans to poor nitrogen efficiency of cattle with consequences for the global climate. Previous studies on epithelia and cells from the native ruminal epithelium suggest functional involvement of the bovine homologue of TRPV3 (bTRPV3) in ruminal NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport. Since the conductance of TRP channels to NH<sub>4</sub><sup>+</sup> has never been studied, bTRPV3 was overexpressed in HEK-293 cells and investigated using the patch-clamp technique and intracellular calcium imaging. Control cells contained the empty construct. Divalent cations blocked the conductance for monovalent cations in both cell types, with effects higher in cells expressing bTRPV3. In bTRPV3 cells, but not in controls, menthol, thymol, carvacrol, or 2-APB stimulated whole cell currents mediated by Na<sup>+</sup>, Cs<sup>+</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, and K<sup>+</sup>, with a rise in intracellular Ca<sup>2+</sup> observed in response to menthol. While only 25% of control patches showed single-channel events (with a conductance of 40.8 ± 11.9 pS for NH<sub>4</sub><sup>+</sup> and 25.0 ± 5.8 pS for Na<sup>+</sup>), 90% of bTRPV3 patches showed much larger conductances of 127.8 ± 4.2 pS for Na<sup>+</sup>, 240.1 ± 3.6 pS for NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, 34.0 ± 1.7 pS for Ca<sup>2+</sup>, and ~36 pS for NMDG<sup>+</sup>. Open probability, but not conductance, rose with time after patch excision. In conjunction with previous research, we suggest that bTRPV3 channels may play a role in the transport of Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> across the rumen with possible repercussions for understanding the function of TRPV3 in other epithelia.

## OPEN ACCESS

**Citation:** Schrapers KT, Sponder G, Liebe F, Liebe H, Stumpff F (2018) The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. PLoS ONE 13(3): e0193519. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0193519>

**Editor:** Alexander G. Obukhov, Indiana University School of Medicine, UNITED STATES

**Received:** September 23, 2017

**Accepted:** February 13, 2018

**Published:** March 1, 2018

**Copyright:** © 2018 Schrapers et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper and its Supporting Information files.

**Funding:** This study was performed for purely scientific reasons within a conventional academic framework. Friederike Stumpff was the co-holder of a patent which was transferred to a startup company which now employs Katharina Schrapers. This publication will have no impact on the commercial success or failure of that enterprise and there is no conflict of interest. Funding was provided by the German Science Foundation (DFG)

## Introduction

The transient receptor potential (TRP) multigene superfamily consists of 28 known sequences that are subdivided into seven subfamilies, six of which are found in mammalian tissues and encode for integral membrane proteins that function as cation-selective channels in extra- or intracellular membranes [1, 2]. Possibly owing to the original discovery in the sensory system of drosophila flies [3], most functional research to date has focused on the role of TRP channels in Ca<sup>2+</sup> mediated sensory signaling cascades, such as those involved in the detection of thermal signals, inflammation, or pain [4]. Intriguingly, the fragrant constituents found in herbs have been found to interact in a specific manner with various members of the TRP

# Beyond Ca<sup>2+</sup> signalling: the role of TRPV3 in the transport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

This article has been published in: Pflügers Archiv: European journal of physiology; **473**(12), S. 1859-1884.

CC BY 4.0: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Manuscript received at the Pflügers Archiv: 2 June 2021

Revised: 17 August 2021

Accepted: 18 August 2021

Published: 19 October 2021

DOI: 10.1007/s00424-021-02616-0

<https://link.springer.com/article/10.1007/s00424-021-02616-0>

Authors:

Hendrik Liebe, Franziska Liebe, Gerhard Sponder, Sarah Hedtrich, Friederike Stumpff

Reproduced with permission from Springer Nature.



# Beyond Ca<sup>2+</sup> signalling: the role of TRPV3 in the transport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>

Hendrik Liebe<sup>1,2</sup> · Franziska Liebe<sup>1</sup> · Gerhard Sponder<sup>1</sup> · Sarah Hedtrich<sup>3</sup> · Friederike Stumpff<sup>1</sup>

Received: 2 June 2021 / Revised: 17 August 2021 / Accepted: 18 August 2021  
© The Author(s) 2021

## Abstract

Mutations of TRPV3 lead to severe dermal hyperkeratosis in Olmsted syndrome, but whether the mutants are trafficked to the cell membrane or not is controversial. Even less is known about TRPV3 function in intestinal epithelia, although research on ruminants and pigs suggests an involvement in the uptake of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. It was the purpose of this study to measure the permeability of the human homologue (hTRPV3) to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, to localize hTRPV3 in human skin equivalents, and to investigate trafficking of the Olmsted mutant G573S. Immunoblotting and immunostaining verified the successful expression of hTRPV3 in HEK-293 cells and *Xenopus* oocytes with trafficking to the cell membrane. Human skin equivalents showed distinct staining of the apical membrane of the top layer of keratinocytes with cytosolic staining in the middle layers. Experiments with pH-sensitive microelectrodes on *Xenopus* oocytes demonstrated that acidification by NH<sub>4</sub><sup>+</sup> was significantly greater when hTRPV3 was expressed. Single-channel measurements showed larger conductances in overexpressing *Xenopus* oocytes than in controls. In whole-cell experiments on HEK-293 cells, both enantiomers of menthol stimulated influx of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> in hTRPV3 expressing cells, but not in controls. Expression of the mutant G573S greatly reduced cell viability with partial rescue via ruthenium red. Immunofluorescence confirmed cytosolic expression, with membrane staining observed in a very small number of cells. We suggest that expression of TRPV3 by epithelia may have implications not just for Ca<sup>2+</sup> signalling, but also for nitrogen metabolism. Models suggesting how influx of NH<sub>4</sub><sup>+</sup> via TRPV3 might stimulate skin cornification or intestinal NH<sub>4</sub><sup>+</sup> transport are discussed.

**Keywords** TRPV3 · Ammonia · NH<sub>4</sub><sup>+</sup> · Olmsted syndrome · Colon · Skin

## Introduction

The multiple functions of channels of the transient receptor potential (TRP) family in general, and that of TRPV3 in particular, continue to be poorly understood [52]. The first TRP channel was cloned from a *Drosophila* fly mutant with visual impairment, resulting from a mutation that led to transient receptor potentials instead of the normal sustained response [47]. Since this time, 28 mammalian members of the family have been identified that form hetero- or homotetrameric assemblies and function as cation channels. Possibly owing

to the initial discovery in the visual system of *Drosophila*, the family was initially associated exclusively with sensory perception. However, many members of the TRP channel family are highly expressed by non-sensory organs such as epithelial cells of the skin or the intestine [46, 52, 56, 74, 75], raising the question if sensory signalling is the end of the story.

From the first cloning of TRPV3 almost 20 years ago [57, 58, 71, 84], the high expression of TRPV3 in keratinocytes was noted in conjunction with a complete lack of expression in associated sensory dorsal root ganglion neurons. The channel is notoriously promiscuous with a low selectivity for Ca<sup>2+</sup> [58]. Since TRPV3 is activated by warm temperatures above 33 °C, its primary function was initially thought to be in thermosensation, involving signalling via ATP or other molecules [45]. However, mice with a knockout of TRPV3 exhibited no obvious alterations in thermal preference behaviour [34] and instead, displayed a phenotype with curly hair and whiskers [17]. In mice, a gain of function mutation of TRPV3 caused a hairless phenotype with itchy

✉ Friederike Stumpff  
stumpff@zedat.fu-berlin.de

<sup>1</sup> Institute of Veterinary Physiology, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany

<sup>2</sup> Department of Biology, Chemistry, and Pharmacy, Freie Universität Berlin, Oertzenweg 19b, 14163 Berlin, Germany

<sup>3</sup> Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of British Columbia, Vancouver, Canada



## Publikationen

### Veröffentlichungen in Journals

#### 2022

Liebe, F.; Liebe, H.; Mergler, S.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2022): **Effects of butyrate on ruminal Ca<sup>2+</sup> transport: evidence for the involvement of apically expressed TRPV3 and TRPV4 channels.** Pflügers Archiv: European journal of physiology; 474(3):S. 315-342, DOI: 10.1007/s00424-021-02647-7

#### 2021

Liebe, H.; Liebe, F.; Sponder, G.; Hedtrich, S.; Stumpff, F. (2021): **Beyond Ca<sup>2+</sup> signalling: the role of TRPV3 in the transport of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.** Pflügers Archiv: European journal of physiology; **473**(12), S. 1859-1884, DOI: 10.1007/s00424-021-02616-0.

#### 2020

Liebe, F.; Liebe, H.; Kaessmeyer, S.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2020): **The TRPV3 channel of the bovine rumen: localization and functional characterization of a protein relevant for ruminal ammonia transport.** Pflügers Archiv: European journal of physiology; **472**(6), S. 693-710, DOI: 10.1007/s00424-020-02393-2

#### 2018

Schrappers, K. T.; Sponder, G.; Liebe, F.; Liebe, H.; Stumpff, F. (2018): **The bovine TRPV3 as a pathway for the uptake of Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.** PLoS one; **13**(3), S. e0193519, DOI: 10.1371/journal.pone.0193519

Rabbani, I.; Braun, H.-S.; Akhtar, T.; Liebe, F.; Rosendahl, J.; Grunau, M.; Tietjen, U.; Masood, S.; Kaessmeyer, S.; Günzel, D.; Rehman, H.; Stumpff, F. (2018): **A comparative study of ammonia transport across ruminal epithelia from Bos indicus crossbreds versus Bos taurus.** Animal science journal = Nihon chikusan Gakkaihō; **89**(12), S. 1692–1700, DOI: 10.1111/asj.13107

### Kongressbeiträge

#### 2021

Liebe, F.; Liebe, H.; Mergler, S.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2021): **Stimulatory effects of butyrate on TRPV3 and TRPV4 with implications for Ca<sup>2+</sup> uptake in ruminants.** 100th meeting of the German Physiological Society, Frankfurt am Main - 30.09.-02.10.2021; B06-08, S. 410

Liebe H.; Liebe F.; Manz G.; Sponder G.; Stumpff F. (2021): **A truly promiscuous channel: D-menthol, L-menthol and the conductance of TRPV3 to NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.** 100th meeting of the German Physiological Society, Frankfurt am Main - 30.09.-02.10.2021; B06-12, S. 414

Liebe, F.; Liebe, H.; Mergler, S.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2021): **The effect of butyrate on transport of Ca<sup>2+</sup> and Na<sup>+</sup> through the bovine TRPV3 channel.** 75. Jahrestagung der Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (GfE) Göttingen - 16.-18.03.2021. In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology - Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hrsg.), Frankfurt am Main: DLG -Verlag; 30, S. 105, ISBN: 978-3-7690-4114-9

## 2019

Liebe, H.; Liebe, F.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2019): **TRPV3 mutation Gly573Ser and its wild type are functionally expressed in the membrane of overexpressing HEK-293 cells.** 98th meeting of the German Physiological Society, Ulm - 30.09.-02.10.2019. In: Acta physiologica Scandinavica; **227**(S719), S. 192

Stumpff, F.; Liebe, F.; Liebe, H.; Sponder, G. (2019): **The TRPV3 channel: a pathway for the uptake of Ca<sup>2+</sup> from the rumen.** XIIIth International Symposium on Ruminant Physiology, Leipzig - 03.09.-06.09.2019. In: Advances in Animal Biosciences; **10**(3), S. 399

## 2018

Liebe, H.; Liebe, F.; Vitzthum, C.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2018): **A comparative study of the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> conductance of human and bovine TRPV3 channels as expressed in Xenopus Oocytes.** Europhysiology, London - 13.09.-16.09.2018. In: Proceedings of the Physiological Society, S. 171P

Liebe, F.; Liebe, H.; Vitzthum, C.; Kaessmeyer, S.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2018): **Establishing an antibody to verify expression of the bovine TRPV3 channel by the rumen of cattle.** Europhysiology, London - 13.09.-16.09.2018. In: Proceedings of the Physiological Society, S. 357P

Liebe, F.; Liebe, H.; Käßmeyer, S.; Vitzthum, C.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2018): **Characterization of the bovine TRPV3 channel in Xenopus oocytes.** 72nd Conference of the Society of Nutrition Physiology, Göttingen - 13.03.-15.03.2018. In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology - Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hrsg.), Frankfurt am Main: DLG -Verlag; S. 84, ISBN: 978-3-7690-4111-8

Liebe, F.; Liebe, H.; Vitzthum, C.; Käßmeyer, S.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2018): **The bovine rumen expresses bTRPV3 channels as a pathway for the uptake of NH<sub>4</sub><sup>+</sup>.** 23. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Wien - 21.02.-23.02.2018. In: 23. Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft: PROGRAMM & ABSTRACTS - Veterinärmedizinische Universität Wien (Hrsg.), S. 51, ISBN: 978-3-86345-307-7

Liebe, H.; Liebe, F.; Vitzthum, C.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2018): **Investigation of the NH<sub>4</sub><sup>+</sup> conductance of the human analogue of TRPV3.** 23. Tagung der DVG-Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft, Wien - 21.02.-23.02.2018. In: 23. Tagung der Fachgruppe Physiologie und Biochemie der Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft: PROGRAMM & ABSTRACTS - Veterinärmedizinische Universität Wien (Hrsg.), Wien, S. 35, ISBN: 978-3-86345-307-7

## 2017

Liebe, H.; Liebe, F.; Vitzthum, C.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2017): **Establishing *Xenopus oocytes* as a model system for studying the  $\text{NH}_4^+$  conductance of human TRPV3 via pH-sensitive microelectrodes.** 6th Symposium of the young physiologists, Jena - 28.09.-29.09.2017. In: 6th symposium of the young physiologists, Jena 2017, S. 54

Liebe, F.; Liebe, H.; Vitzthum, C.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2017): **Characterizing the bovine TRPV3 using two classical expression systems.** 6th Symposium of the young physiologists, Jena - 28.09.-29.09.2017. In: 6th symposium of the young physiologists, Jena 2017, S. 40–41

Liebe, F.; Liebe, H.; Schrapers, K. T.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2017): **A patch clamp and fura-2 study of the bovine TRPV3 channel.** Deutsche Physiologische Gesellschaft, Greifswald - 16.03.-18.03.2017. In: Acta physiologica Scandinavica; **219**(S711), S. B05–B08

Liebe, F.; Liebe, H.; Schrapers, K. T.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2017): **A study of the bovine TRPV3 channel as a pathway for the uptake of  $\text{Ca}^{2+}$ .** 71st Conference of the Society of Nutrition Physiology, Göttingen - 14.03.-16.03.2017. In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology - Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hrsg.), Frankfurt am Main: DLG-Verlag; **26**, S. 40, ISBN: 978-3-7690-4110-1

## 2016

Hille, K. T.; Sponder, G.; Liebe, F.; Braun, H. S.; Stumpff, F. (2016): **Determination of the  $\text{NH}_4^+$  permeability of the bovine TRPV3 as a candidate protein mediating the ruminal efflux of ammonium.** 22. Tagung der DVG-Fachgruppe "Physiologie und Biochemie", Berlin - 30.03.-01.04.2016. In: Tagung der DVG-Fachgruppe "Physiologie und Biochemie" (Hrsg.) (1. Aufl.) Gießen, S. 75-76, ISBN: 978-3-86345-307-7

Hille, K.; Liebe, F.; Rabbani, I.; Sponder, G.; Stumpff, F. (2016): **A study of the bovine TRPV3 channel as a candidate protein mediating the ruminal transport of ammonium.** 70th Conference of the Society of Nutrition Physiology, Hannover - 08.03.-10.03.2016. In: Proceedings of the Society of Nutrition Physiology - Gesellschaft für Ernährungsphysiologie (Hrsg.), Frankfurt am Main: DLG-Verlag; **25**, S. 21 ISBN: 978-3-7690-4109-5

Hille, K.; Sponder, G.; Liebe, F.; Stumpff, F. (2016): **The bovine analogue of TRPV3 conducts the  $\text{NH}_4^+$  ion.** 95th Annual Meeting of the German Physiological society Lübeck - 03.03.-05.03.2016. In: Acta physiologica Scandinavica; **216**(Supplement S707), S. 43

## Danksagung

Mein größter Dank gilt **Prof. Dr. Friederike Stumpff**. Für mich ein Zufall, dass du mir direkt zum Abschlussball meines Veterinärstudiums das Angebot unterbreitet hattest, in deiner Arbeitsgruppe zu beginnen. Bereits während der Anfangsphase motiviertest du mich, die Techniken zu erlernen und das Thema für die Anträge zur Finanzierung meiner Doktorarbeit zu erarbeiten, sodass wir gleich nach Zusage mit den Projekten beginnen konnten. Vielen Dank, dass du dir immer umgehend für meine Fragen und Auswertungsgespräche Zeit genommen hast.

Ich möchte mich zudem bei **Prof. Dr. Salah Amasheh** bedanken, dass du dich bereit erklärt hast, mein Mentoren-Team zu vervollständigen und insbesondere mit deiner Expertise in der *Xenopus laevis* Oozyten Forschung hilfreiche Anregungen eingebracht hast.

Dank möchte ich auch an **Dr. Gerhard Sponder** richten. Du warst mit großem Eifer bei den Immunoblots und Vektorsynthesen dabei und lehrtest mich die Molekularbiologie. Zum Verzweifeln war *bTRPA1*, aber *bTRPV4* konnte erfolgreich synthetisiert werden. Trotz Arbeitswechsel hattest du mich weiterhin als Mentor betreut, was ich sehr zu schätzen weiß.

Für die Zusammenarbeit, die Formulierungs- und Berechnungsdiskussionen danke ich dir Außerordentlich, **Hendrik Liebe**. Auch wenn es an manchen Tagen anstrengend wurde. Wir haben gemeinsam die Höhen und Tiefen über Studium und Promotion gemeistert. Die X. Oozyten Serie wird mir durch die arbeitsamen Nächte noch lange in Erinnerung bleiben.

**Susanne Trappe, Manfred Sommerer, Dr. Katharina Schrapers, Dr. Constanze Vitzthum** und **Gisela Manz** möchte ich danken, für eure technische Einarbeitung, Unterstützung bei Fragen, Lieferungen oder auch bei Arbeiten in der Zellkultur oder an Computerprogrammen.

**Prof. Dr. Jörg Aschenbach** und **allen Institutsmitarbeitern** möchte ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre im Institut danken, die durch die regelmäßigen gemeinsamen Zusammenkünfte ermöglicht wurden. Hoffentlich werden diese wieder verstärkt nach der Pandemie aufleben. Des Weiteren bedanke ich mich für alle konstruktiven Fragen und Anregungen bei den Meetings.

**PD Dr. Stefan Mergler, Prof. Dr. Dorothee Günzel** und **Prof. Dr. Sabine Käßmeyer** danke ich für die erfolgreichen Kooperationen.

Mein persönlicher Dank gilt **meiner Familie** und **meinen Freunden** für den Rückhalt und den Ausgleich neben der Arbeit. Insbesondere meinen Eltern und Schwiegereltern danke ich für Ihre unentbehrliche Unterstützung, sodass ich trotz widriger Umstände wie der COVID-19 Pandemie weiterarbeiten konnte.

Ich will auch meinem Sohn **Tristan** herzlich danken. Mit dir kann ich die Welt jeden Tag neu entdecken. Du zeigtest mir Wichtiges im Leben, selbst wenn es in der Doktorarbeit schwieriger wurde. Du machst mich sehr glücklich.

---

Es besteht **kein Interessenskonflikt** durch finanzielle Unterstützung der Arbeiten.

Das Gehalt von Franziska Liebe wurde finanziert von der Deutschen Forschungsgesellschaft (DFG STU 258/7-1). Der in Kooperation stehende Kollege Hendrik Liebe wurde mit einem Stipendium von der Sonnenfeld Stiftung unterstützt.

Die Teilnahmekosten am Kongress der Jungen Physiologen (2017) und Deutschen Veterinärmedizinischen Gesellschaft (DVG) -Biochemie und Physiologie- (2018) wurden von der Tierseuchenforschungsförderung (Ansprechpartner: Prof. Dr. Marcus Doherr, FU Berlin) übernommen.

Die Teilnahmekosten für die Europhysiologie (2018) übernahm die Deutsche Physiologische Gesellschaft (DPG).

# Selbständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt habe.  
Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch  
genommen habe.

Berlin, den 26.04.2022 Unterschrift: Franziska Liebe



<http://dx.doi.org/10.17169/refubium-34738>

