

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin
Pädiatrische Nephrologie

Klinikdirektorin: Prof. Dr. med. A. Muntau

Der Calcium-sensitive Rezeptor stabilisiert die podozytäre Funktion in der Proteinurie

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Johanna Steingröver
aus Münster

Hamburg 2022

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 04.04.2023

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Christian Krebs

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Jun Oh

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: Prof. Dr. Lars Pape

Inhaltsverzeichnis

1	Originalpublikation	4
2	Einleitung	18
3	Ergebnisse.....	21
3.1.1	Der CaSR-KD verhinderte den R-568 induzierten Calciumeinstrom in Podozyten. 21	
3.1.2	Der CaSR-KD bewirkte eine Reduktion der Aktinfasern und der fokalen Bindungsstellen (FBS) sowie eine verlangsamte Migration der Podozyten.	21
3.1.3	Der CaSR ist an der durch ADR verursachten Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und an der Adhäsionsfähigkeit von Podozyten beteiligt.	22
3.1.4	In der ADR induzierten Glomerulonephritis zeigte sich eine vermehrte podozytäre CaSR-Expression.	22
3.1.5	CaSR ^{Δpod} -Mäuse zeigten keine Proteinurie.....	23
3.1.6	Der podozytäre CaSR- ^{Δpod} verstärkte die ADR induzierte Glomerulopathie.	23
3.1.7	Die Aktivierung des CaSR minimierte die ADR induzierte Albuminurie lediglich im WT. 23	
3.1.8	Die Aktivierung des CaSR minimierte die Proteinurie des NS.....	24
4	Diskussion	24
5	Abkürzungsverzeichnis.....	29
6	Literaturverzeichnis.....	30
7	Zusammenfassung	35
8	Summary	35
9	Erklärung des Eigenanteils.....	36
10	Danksagung	37
11	Lebenslauf.....	38
12	Eidesstattliche Erklärung.....	39

The calcium-sensing receptor stabilizes podocyte function in proteinuric humans and mice



see commentary on page 1110

Anne K. Mühlig^{1,2,3,14}, Johanna Steingröver^{1,2,14}, Hannah S. Heidelberg^{1,2}, Madelaine Wingerath^{1,2,3}, Wiebke Sachs⁴, Irm Hermans-Borgmeyer⁵, Catherine Meyer-Schwesinger⁴, Hoon Young Choi⁶, Beom Jin Lim⁷, Christian Patry⁸, Georg Friedrich Hoffmann⁸, Nicole Endlich^{9,10}, Katharina Bracke⁹, Mariella Weiß¹¹, Andreas H. Guse¹¹, Moritz Lassé³, Markus M. Rinschen^{3,12,13}, Fabian Braun³, Tobias B. Huber³, Victor G. Puelles³, Claus Peter Schmitt^{8,14} and Jun Oh^{1,2,14}

¹University Children's Research@Kinder-UKE, University Children's Hospital, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ²Department of Pediatric Nephrology, University Children's Hospital, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ³III. Department of Medicine, Nephrology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ⁴Center of Experimental Medicine, Institute of Cellular and Integrative Physiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ⁵Center for Molecular Neurobiology Hamburg, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ⁶Department of Internal Medicine, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea; ⁷Department of Pathology, Yonsei University College of Medicine, Seoul, Korea; ⁸Department of Pediatrics, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany; ⁹Department of Anatomy and Cell Biology, University of Greifswald, Greifswald, Germany; ¹⁰NIPOKA GmbH, Greifswald, Germany; ¹¹Department of Biochemistry and Molecular Cell Biology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany; ¹²Department of Biomedicine, Aarhus University, Aarhus, Denmark; and ¹³Aarhus Institute of Advanced Studies (AIAS), Aarhus, Denmark

Calcimimetic agents allosterically increase the calcium ion sensitivity of the calcium-sensing receptor (CaSR), which is expressed in the tubular system and to a lesser extent in podocytes. Activation of this receptor can reduce glomerular proteinuria and structural damage in proteinuric animal models. However, the precise role of the podocyte CaSR remains unclear. Here, a CaSR knockdown in cultured murine podocytes and a podocyte-specific CaSR knockout in BALB/c mice were generated to study its role in proteinuria and kidney function. Podocyte CaSR knockdown abolished the calcimimetic R-568 mediated calcium ion-influx, disrupted the actin cytoskeleton, and reduced cellular attachment and migration velocity. Adriamycin-induced proteinuria enhanced glomerular CaSR expression in wild-type mice. Albuminuria, podocyte foot process effacement, podocyte loss and glomerular sclerosis were significantly more pronounced in adriamycin-treated podocyte-specific CaSR knockout mice compared to wild-type littermates. Co-treatment of wild-type mice with adriamycin and the calcimimetic cinacalcet reduced proteinuria in wild-type, but not in podocyte-specific CaSR knockout mice. Additionally, four children with nephrotic syndrome, whose parents objected to glucocorticoid therapy, were treated with cinacalcet for one to 33 days. Proteinuria declined transiently by up to 96%, serum albumin increased, and edema

resolved. Thus, activation of podocyte CaSR regulates key podocyte functions *in vitro* and reduced toxin-induced proteinuria and glomerular damage in mice. Hence, our findings suggest a potential novel role of CaSR signaling in control of glomerular disease.

Kidney International (2022) **101**, 1186–1199; <https://doi.org/10.1016/j.kint.2022.01.036>

KEYWORDS: actin cytoskeleton; calcium-sensing receptor; focal adhesion; nephrotic syndrome; podocytes; proteinuria

Copyright © 2022, International Society of Nephrology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Translational Statement

Treatment of nonhereditary glomerular disease with immunosuppressive drugs, especially the use of corticosteroids, is associated with multiple severe side effects. Using gene knockdown and knockout models we demonstrate that the glomerular epithelial calcium-sensing receptor (CaSR) controls specific Ca²⁺-dependent cell functions *in vitro* and mitigates adriamycin-induced proteinuria excretion and kidney damage in mice. Treatment of children with idiopathic nephrotic syndrome with the CaSR-activating calcimimetic cinacalcet led to a transient reduction of urine albumin-creatinine ratio. CaSR activation represents a novel approach for treatment of proteinuric disease.

Correspondence: Jun Oh, Center for Pediatric and Adolescent Medicine, University Hospital Hamburg/Eppendorf, Martinistrasse 52, 20246 Hamburg, Germany. E-mail: j.oh@uke.de; or Claus Peter Schmitt, Center for Pediatric and Adolescent Medicine, University Hospital Heidelberg, Im Neuenheimer Feld 430, 69120 Heidelberg, Germany. E-mail: clauspeter.schmitt@med.uni-heidelberg.de

¹⁴These authors contributed equally to this work.

Received 25 November 2019; revised 15 December 2021; accepted 21 January 2022; published online 7 March 2022

The calcium-sensing receptor (CaSR) is a G-protein coupled receptor ubiquitously expressed in the body. It acts as a multifunctional receptor through G-proteins G_{q/11}, G_{i/o}, and G_{12/13} and activates ion channels. The type of intracellular answer depends on the cell type and the ligand.^{1–3}

Stimulation of the parathyroid CaSR with Ca^{2+} suppresses parathyroid hormone (PTH) secretion. In the kidney the CaSR is mainly expressed in the proximal tubule, the thick ascending loop of Henle, and the collecting duct, and CaSR regulates urinary Ca^{2+} reabsorption.^{4,5} Furthermore, there is a glomerular expression of the CaSR in podocytes.⁶ Their actin cytoskeleton essentially maintains the complex structure and the glomerular filtration function.⁷ Podocytes are attached to the glomerular basement membrane through focal adhesions (FAs), which are multiprotein complexes containing integrins and proteins such as FA kinase and paxillin.^{8,9} FA assembly, function, and turnover determine the attachment and motility of cells.^{10,11} Integrins are transmembrane receptors connecting the cytoskeleton biochemically and mechanically to the extracellular matrix.^{9,12–14} Integrin $\alpha_3\beta_1$ is responsible for the maintenance of the structure of the glomerulus.¹⁵ The integrin $\alpha_v\beta_3$ is activated by the soluble form of podocyte urokinase receptor, which is discussed to be involved in development of focal segmental glomerulosclerosis (FSGS).¹⁶

Intracellular Ca^{2+} homeostasis is important for the vitality and function of the actin cytoskeleton in podocytes.^{7,17} Transient increase in the free cytosolic Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) activates Ras homolog gene family member A (Rho A) kinase, which stabilizes the actin cytoskeleton by forming actin fibers and FAs.¹⁸ Continued activation of the Ca^{2+} channels, for example, gain-of-function mutations of the transient receptor potential cation channel 6 (TRPC6), leads to FSGS.^{19,20} Therefore, a balanced interplay between different Ca^{2+} transporters and channels is crucial.

Nephrotic syndrome (NS) is characterized by foot process (FP) effacement and requires corticosteroid treatments, which are associated with severe side effects. Alternative therapeutic approaches are urgently required. We previously demonstrated that activation of the podocyte CaSR with the calcimimetic R-568 stabilizes the actin cytoskeleton and protects from puromycin-induced cytotoxicity and glomerulosclerosis in rats.⁶ Furthermore, it has been shown that R-568 prevents podocyte loss, preserves podocytes ultrastructure, and reduces interstitial fibrosis in uninephrectomized ApoE^{-/-} mice²¹ and ameliorates kidney damage in subtotaly nephrectomized rats.²² These studies indicate the therapeutic potential of CaSR activation in patients with kidney diseases, albeit the precise molecular action of protection is uncertain. In particular, the specific pathophysiological role of the podocyte CaSR in glomerular disease has not yet been delineated, but needs to be prior to systematic therapeutic approaches in patients with kidney diseases.

In this study, we established and thoroughly analyzed a CaSR knockdown (KD) in murine podocytes and a podocyte-specific CaSR knockout (KO) in mice. We demonstrate that CaSR stabilized podocytes' cytoskeleton and promoted adhesion and migration *in vitro*. CaSR activation protected from toxin-induced damage *in vivo* and calcimimetic treatment lead to the induction of a remission in children with idiopathic NS.

METHODS

Cell culture

CaSR-KD in podocytes²³ was induced using small, interfering RNA, designed by selection program (siRNA at Whitehead, <http://sirna.wi.mit.edu/home.php>; Whitehead Institute for Biomedical Research) and pSUPER-zeocin (Oligoengine).²⁴ GGCTGGGCA-GATTCCAGGC was used as CaSR-KD insert, separated by noncomplementary spacer (TTCAAGAGA), from the reverse complement of the same sequence. Control cells were made by scrambled sequence (CCGCGACTCGCCGTCTGCG) with no homology to any gene sequence. Podocytes were transfected with small, interfering RNA plasmid using FuGENE agent (Roche). Cells were selected with 50 and maintained with 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ of Zeocin (Invitrogen). Adriamycin (ADR; 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$), prepared by the pharmacy at the University Hospital Hamburg-Eppendorf, and R-568 (1–5 $\mu\text{mol}/\text{l}$ [μM], diluted in dimethylsulfoxide [DMSO], Santa Cruz) were applied. Equal concentrations of DMSO were used as control. For migration assay, cells were grown in Culture-Insert 2-well in μ -Dish (Ibidi). The integrin inhibitor GRGDSP (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro; MedChemExpress) was used in a 500 μM concentration.

Ca^{2+} imaging

Podocytes were grown in μ -Slide-8-Well (Ibidi) and loaded with 4 μM Fura2-AM (Life Technologies) for 20 minutes at room temperature. Cells were rinsed and kept in Ca^{2+} containing buffer (140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgSO_4 , 1 mM CaCl_2 , 20 mM N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid (pH 7.4), 1 mM NaH_2PO_4 , 5 mM glucose). Slides were mounted onto Leica IRBE microscope with a Sutter DG-4 light source. Frames were acquired with an electron-multiplying charge-coupled device camera (C9100-13, Hamamatsu). The following filter set was used for measurement of Fura2: excitation, hard-coated (HC) 340/26, HC 387/11; beam splitter, 400DCLP (dichroic longpass); emission 510/84 (in nanometers). Image acquisition was done with Velocity software (PerkinElmer Inc.). Stimulation was performed by addition of R-568 (5 μM) and inhibition with the inhibitor SKF-96365 (100 μM , Sigma). Images for Fura2 ratios were generated and median-filtered with OpenLab software (PerkinElmer Inc.). Color scale was set to 0.2 to 1.5.

Proteomic analysis of cultured mouse podocytes

Samples were prepared as previously described with small modifications.²⁵ Pellets were lysed in 8 M urea, 50 mM ammonium bicarbonate, supplemented with 1 \times Halt protease inhibitor cocktail (Thermo Fisher Scientific), sonicated, reduced with 5 mM dithiothreitol, and alkylated using 10 mM Iodoacetamide (Sigma). Overnight digestion was carried out using trypsin at 1:50 enzyme to substrate ratio at 37 °C. Tryptic peptides were acidified using formic acid and purified using in-house-made stage-tips.²⁶ We used 1 μg of protein for liquid-chromatography-coupled to tandem mass spectrometer acquisition. Liquid-chromatography-coupled to tandem mass spectrometer measurements were performed on a quadrupole-ion-trap-orbitrap mass spectrometer (Orbitrap Fusion) operated in positive ion mode coupled to a nano-UPLC (Dionex Ultimate 3000 UPLC system, Thermo Fisher Scientific). Peptides were separated using an 80-minute gradient with linearly increasing acrylonitrile concentration from 2% to 30% acrylonitrile in 65 minutes. Raw files were searched, quantified, and normalized using MaxQuant version 1.6.17.0²⁷ with default settings for orbitraps. The match between runs, label-free quantification intensity, intensity-based absolute

quantification (IBAQC), and classical normalization features were enabled. We used the UniProt mouse reference proteome as database (downloaded in August 2021) with enzyme specificity set to Trypsin/P, cysteine carbamidomethylation as a fixed modification (+57.021464), and methionine oxidation (+15.994914) as well as protein N-terminal acetylation (+42.010565) were as variable modifications. Data analysis was performed using Perseus software suite (V1.6.15.0).²⁷

Adhesion assay

Cells were detached with Gibco Trypsin-EDTA (ethylenediamine tetraacetic acid; Thermo Fisher Scientific) and cells were seeded in fetal bovine serum-containing media onto cover slips. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde. Nuclei were stained with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI; Sigma).

Podocyte-specific CaSR-KO mice (CaSR^{Δpod})

CaSR^{tm1a(KOMP)Mbp} mice were generated by injecting JM8A3.N1 cells provided by the KOMP repository (project: CSD66803, clones D05, F07) into 8 cell-stage C57BL/6J embryos using the PiezoExpert (Eppendorf), resulting in chimeras positive for the tm1a allele. To obtain the conditional allele (tm1c) offspring of chimeras were bred to Flip recombinase-expressing mice.²⁸ Podocyte-specific KO was achieved after backcrossing CaSR^{tm1c(KOMP)Mbp} mice by mating to podocyte-specific Cre-recombinase-expressing mouse line on BALB/c background.²⁹ Glomerular DNA was isolated using the direct PCR-Tail kit (Peqlab) from isolated glomeruli. Polymerase chain reaction (PCR) was performed using DreamTaq Polymerase (Thermo Fisher Scientific) and the primers 5'-AGGATCGTCTCACITTCGCTT-3' and 5'-TTGCGTAGCTGGTGTGAGG-3'. For detection of Cre-recombinase 5'-TAACATTCTCCACCGCTAGTACG-3' and 5'-AAACGTTGATGCCGGTGAACGTGC-3' were used. PCR reaction was performed with the following settings: CaSR/Cre: 95 °C, 120 s/5 min; 35 cycles (95 °C, 60/30 seconds; 71 °C, 60 seconds; 55 °C, 30 seconds; 72 °C, 45 seconds); 72 °C, 480 seconds.

Animal experiments

Experiments were performed according to national and institutional animal care and ethical guidelines (Permissions: G73/12; N57/19). For induction of ADR nephritis, 11-week-old BALB/c mice (Jackson Laboratory), CaSR^{Δpod} and CaSR^{fl/fl} littermates were injected with 6 μl/g bodyweight of ADR (2 mg/ml). ADR was used at a concentration of 5 μl/g in the cinacalcet rescue model. Cinacalcet was diluted in 20% DMSO and administered i.p. at a dosage of 10 μg/g bodyweight 2 hours before, 1 day after, and 2 days after ADR injection. A 20% DMSO solution was used as the control. Glomeruli were isolated with Dynabeads (Thermo Fisher Scientific) perfusion.^{30,31} Urine albumin-creatinine quotient was measured using enzyme-linked immunosorbent assay (Bethyl Laboratories) and the Jaffe method (Hengler Analytik).

Light microscopy, immunohistochemistry, immunofluorescence

For periodic acid-Schiff (PAS; Sigma) 1.5-μm sections were stained following the manufacturer's instructions. For podocyte staining 2-μm sections were boiled in 10 mM citrate buffer (pH 6.1, Sigma), blocked with 5% horse serum and 0.05% Triton-X 100 (Merck-Millipore). Anti-p57 (rabbit polyclonal, 1:500, Santa Cruz) was incubated overnight, followed by incubation with ZytoChem-Plus AP Polymer Kit (Zytomed) and stained with new fuchsin. For

immunofluorescence, 2-μm sections were boiled in Dako AG Retrieval buffer, pH 9.0 (Sigma). Slides were incubated overnight with anti-CaSR (rabbit polyclonal, Invitrogen), anti-synaptopodin (guinea pig, Synaptic Systems), anti-endomucin (rat, Santa Cruz) 1:200 in DAKO antibody diluent (Sigma) and secondary antibody (Alexa Fluor anti-rabbit 647, anti-guinea pig 488, anti-rat 555, Abcam). Nuclei were stained with DAPI (Sigma) 1:1000 in phosphate-buffered saline. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde and blocked with 3% bovine serum albumin and 0.05% Triton-X 100 (all Sigma). Staining was done with anti-p-paxillin (1:200, rabbit polyclonal, Invitrogen), Alexa Fluor anti-rabbit 647, and Alexa Fluor 488-Phalloidin (both 1:400, Abcam). Imaging was done with LSM800 confocal microscope (Zeiss).

Two-dimensional image analysis

Evaluation was done blinded. Fifty glomeruli per animal were analyzed with PAS score ranging from 0 to 4: 0, normal; 1, mild injury in small regions of the glomerular tuft; 2, <50% injury; 3, >50% injury; 4, no glomerular structure visible. The number of positive p57 cells was related to glomerular area in 50 glomeruli. Content of phosphorylated (p)-paxillin was analyzed with the measurement of corrected total cell fluorescence with ImageJ (National Institutes of Health). Number of actin fibers was related to the diameter of the cell. A total of 15 randomly chosen fields were analyzed. Number of CaSR- and synaptopodin-positive cells was related to the number of synaptopodin-positive cells in 20 glomeruli per animal.

Podocyte exact morphology measurement procedure

Three-dimensional-structured illumination microscopy was performed as described.^{32,33} Zeiss Elyra PS.1 system with 5 horizontal shifts and 5 rotations of the illumination pattern and a slice-to-slice distance of 126 nm was used. To determine the filtration slit density (FSD), the ratio of the filtration slit length per analyzed area was determined. A range of 17 to 20 glomeruli per animal has been evaluated.

Quantitative PCR

mRNA was extracted and transcribed with NucleoSpin RNAII kit (Machery-Nagel) and cDNA synthesis kit (Life Technologies). Quantitative PCR was performed using TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific) on the QuantStudio Software (Applied Biosystems). Primers were obtained from Life Technologies (Mm0443374, Mm01344620). Relative expression was determined as compared to Podocin (fw 5'-TGACGTTCCCTTTTCCATC-3'; 5'-AGGAAGCAGATGCCCAGT-3'), which were measured using SYBR green master mix (Sigma).

Western blotting

Western blotting was performed as described.³⁴ Primary antibody incubation with anti-CaSR (rabbit, 1:500, Enzo, 1:500), anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (goat, 1:1000, Santa Cruz), anti-integrin β₁ (ITB1; rabbit, 1:1000, Abcam), and anti-ITB3 (rabbit, 1:1000, Merck) was followed by anti-rabbit 680RD or anti-goat 800CW (both 1:10000, Abcam), before being imaged with Odyssey Clx Blot Scanner (Li-cor). For measurement of the activation of RhoA, a RhoA pulldown activation assay was used, according to the manufacturer's instructions (Cytoskeleton). Control and CaSR-KD podocytes were treated with 5 μM R-568 for 30 minutes.

For measurement of total RhoA, an anti-RhoA antibody (rabbit, 1:500, Abcam) was used.

Cinacalcet treatment of NS

Four children (3–9 years) with idiopathic NS, objecting to standard glucocorticoid therapy, were treated with cinacalcet. Following informed consent, the patients were orally treated with cinacalcet 7.5 to 30 mg/m²/d in increasing dose and calcium 1000 mg/m²/d. Patients 1 and 2 received this treatment during their first nephrotic episode. Patients 3 and 4 during their second and third nephrotic episode, respectively. Serum analysis including electrolytes, albumin, protein, and urine analysis was done daily. Serum creatinine, liver function, and PTH were measured initially and at discharge. After cinacalcet discontinuation, all patients received standard therapy with prednisone according to the recommendations of the German Society of Pediatric Nephrology. The analysis was approved by the Ethical Committee of the Medical Faculty Heidelberg.

Statistics

Analysis and graphs were carried out using PRISM5 (GraphPad Software). Mann-Whitney *U* test or Student's *t* test were used and median values and 95% confidence intervals (95% CIs) or group medians are given in the text and figures, depending on Gaussian distribution. Results were considered significant when *P* < 0.05. Experiments were performed in at least 3 independent replicates.

RESULTS

CaSR-KD blocked TRPC-dependent R-568 mediated Ca²⁺ influx

A CaSR-KD was induced in murine podocytes. The KD was verified by Western blot (control vs. KD: 0.54 [95% CI: 0.4 to 0.88] vs. 0.31 [95% CI: 0.14 to 0.9] arbitrary units; *P* = 0.0022; Figure 1a and b). As the KD cells expressed a detectable amount of CaSR protein, [Ca²⁺]_i dynamics were

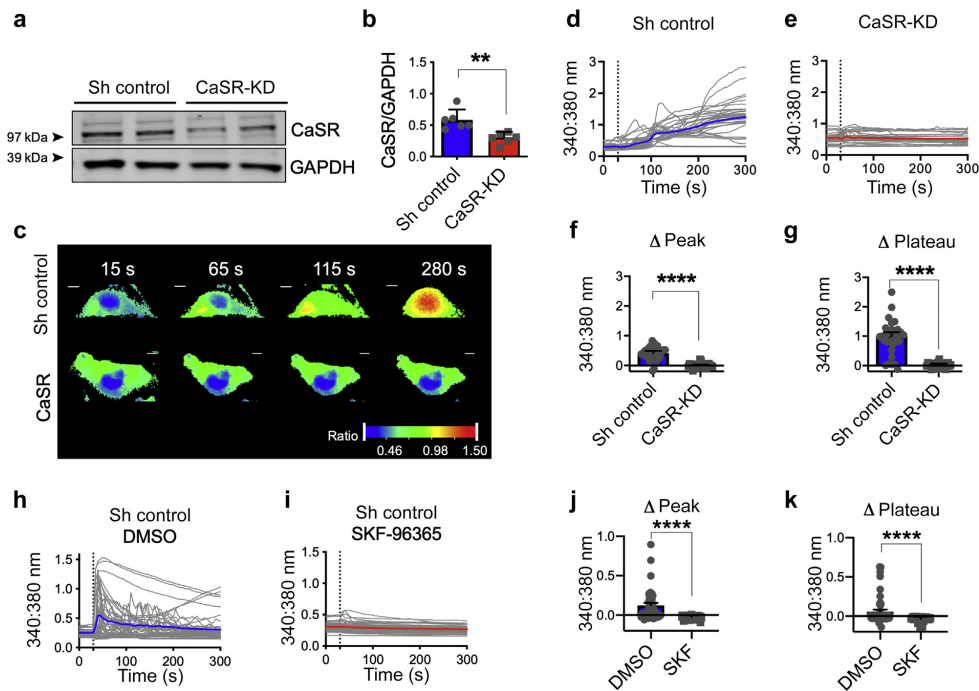


Figure 1 | Calcium-sensing receptor (CaSR) knockdown (KD) abolished Ca²⁺ influx mediated by R-568. (a,b) CaSR-KD was induced in immortalized mouse podocytes with small, interfering RNA, CaSR expression was quantified by Western blot and related to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) loading control. (Arrowhead indicates height of nearest marker bands.) (c–g) Measurement of Ca²⁺ influx: cells were preloaded with Fura2-AM and imaged in a Ca²⁺-containing buffer. Fura2-AM forms a complex with Ca²⁺ and shows excitation change from 380 to 340 nm in ultraviolet light. After 30 seconds of baseline imaging, cells were stimulated with R-568 (5 μmol/l) and changes in excitation rate were detected in live cell microscopy. (c) Imaging of changes in excitation ratio 340:380 nm in Fura2-AM-loaded control and CaSR-KD podocytes, indicating changes in intracellular calcium levels (representative images: original magnification: ×40; bar = 10 μm). Quantification of increase in excitation ratio 340:380 nm in control (d) and CaSR-KD podocytes (e) and in control podocytes treated with dimethylsulfoxide (DMSO; vehicle) (h) and SKF-9665 (SKF, unspecific TRPC inhibitor) (i). (f,g,j,k) Statistical analysis of peak (f) and plateau (g) excitation in control and CaSR-KD podocytes and peak (j) and plateau (k) excitation in DMSO- and SKF-treated podocytes. ***P* < 0.01, *****P* < 0.0001. (b) Each data point shows 1 independent experiment. (f,g,j,k) Medians and 95% confidence intervals of all evaluated single cells are shown. (d,e,h,i) Cells were measured in 4 independent experiments. Sh, small hairpin, used as control cells with no knockdown.

measured after CaSR activation using Fura2-AM.³⁵ Exposure to R-568 increased $[Ca^{2+}]_i$ in control podocytes within 60 seconds and reached a plateau after 200 to 300 seconds, whereas $[Ca^{2+}]_i$ remained unchanged in CaSR-KD podocytes (control vs. KD peak: 0.44 [95% CI: 0.3 to 0.49] vs. -0.0009 [95% CI: -0.03 to 0.03] rate 340/380 nm; plateau: 0.9098 [95% CI: 0.69 to 1.1] vs. 0.004473 [95% CI: -0.03 to 0.04] rate 340/380 nm; $P < 0.0001$; Figure 1c–g). These results demonstrate the complete functional loss of the CaSR, despite residual CaSR protein abundance as demonstrated in the Western blot. As the CaSR-mediated influx in podocytes also depends on TRPC6,¹⁸ an unspecific TRPC inhibitor SKF-96365 was added to the incubation of control cells. The R-568-dependent Ca^{2+} influx was inhibited (Figure 1h–k; DMSO vs. SKF peak: 0.12 [95% CI: 0.06 to 0.19] vs. -0.02 [95% CI: -0.03 to -0.02] rate 340/380 nm; plateau: 0.06 [95% CI: 0.007 to 0.11] vs. -0.03 [95% CI: -0.04 to -0.03] rate 340/380 nm; $P = 0.0005$). The CaSR- and TRPC6-dependent Ca^{2+} influx mediates an activation of the RhoA cascade, which stabilizes the actin cytoskeleton in podocytes.¹⁸ To prove whether a stimulation of the CaSR leads to an activation of RhoA a “RhoA GTP pull down assay” was performed. Here, we can show that there is an increase in active RhoA normalized to total RhoA in control podocytes after treatment with R-568. This effect could not be shown for CaSR-KD podocytes (Supplementary Figure S1A and B).

CaSR-KD disintegrated actin fibers, reduced FAs, and impaired podocyte migration velocity

An unbiased proteomic analysis revealed marked differences in protein expression in CaSR-KD compared with control podocytes (Figure 2a). This difference was particularly evidenced by a lower abundance of basement membrane or extracellular matrix (or both) components (both structural and extracellular matrix receptor interaction partners: Col4a1, Col4a2, Col8a1, Col18a1, Lama5, Nid2, Tinagl1, Itga1, Itgb5, Lamc1, Thbs1). These important factors govern structural integrity of the cells but also play vital roles for cell adhesion, motility, and differentiation. The corresponding enrichment analyses indicate strong downregulation of these entities in CaSR-KD versus control (Figure 2b). Motility, adhesion, and the integrity of the cytoskeleton are crucial for podocyte's function and dynamics and therefore were analyzed in CaSR-KD podocytes. Cells were stained for actin and p-paxillin, an element of FAs. Actin stress fibers were reduced in CaSR-KD podocytes (400.8 [95% CI: 351.8 to 444.6] vs. 463.8 [95% CI: 400.7 to 521.7] fibers/nm; $P = 0.036$) and single fibers seemed less organized. P-paxillin was less abundant in KD cells (0.88 [95% CI: 0.04 to 1.3] $\times 10^8$ vs. 1.44 [95% CI: 0.08 to 2.6] $\times 10^8$ corrected total cell fluorescence in control podocytes; $P = 0.041$; Figure 2c–e). To evaluate the impact on podocyte migration, capacity cells were grown separated by a plastic ridge until confluent with subsequent removal of the separator. CaSR-KD migration velocity was found to be reduced. The area closed after 48 hours, and the number of cells was significantly lower

compared to controls (68.0% [95% CI: 49.9% to 78.6%] vs. 92.6% [95% CI: 72.7% to 106.7%] in control podocytes; $P = 0.0286$). The CaSR-mediated migration depends on the function of integrins in tumor cells.³⁶ Therefore, the expression of ITB1 and ITB3, which are components of key podocyte integrins $\alpha_3\beta_1$ and $\alpha_v\beta_3$, were analyzed. ITB1 was reduced in CaSR-KD podocytes compared with controls (0.66 [95% CI: 0.60 to 0.72] vs. 1.0 [95% CI: 0.86 to 1.31] arbitrary units; $P < 0.0001$), whereas ITB3 abundance was similar (Supplementary Figure S1C and D). Additionally, the migration was scaled down in control podocytes that have been treated with the integrin inhibitor GRGDSP (Supplementary Figure S1E and F).

CaSR was involved in ADR-induced actin cytoskeleton rearrangement and podocyte attachment

ADR induces podocyte cytoskeleton rearrangement. CaSR-KD podocytes were less resistant to ADR and detached earlier from cell culture dishes (data not shown). In subsequent studies 2 μ g/ml ADR was used to induce actin cytoskeleton alterations without detachment of the CaSR-KD cells. ADR resulted in a redistribution of actin fibers in control podocytes from the center to cortical areas (8.4 [95% CI: 5.4 to 12.2] vs. 24.3 [95% CI: 5.1 to 46.7] central actin fibers in untreated vs. control podocytes; $P = 0.0286$). Cotreatment with R-568 prevented ADR-induced redistribution (27.4 [95% CI: 22.4 to 32.6] central actin fibers; $P = 0.0286$). Interestingly, CaSR-KD podocytes, which exhibited a lower actin fiber content than did controls (7.0 [95% CI: 0.9 to 1.7] central actin fibers; $P = 0.028$ vs. controls), increased central actin fiber number in response to ADR (21.5 [95% CI: 7.4 to 36.2]; $P = 0.0286$ vs. central actin fibers in untreated KD podocytes). This increase in central actin in KD podocytes was not influenced by R-568 cotreatment (Figure 3a and b).

An adhesion assay was used to test the role of the CaSR for podocyte attachment and ADR-induced detachment. CaSR-KD attached slower to cover slips than control podocytes did (2.7 [95% CI: 2.4 to 3.4] KD vs. 10.3 [95% CI: 7.4 to 15.3] controls/field after 6 hours; $P = 0.002$). ADR treatment reduced attachment of CaSR-KD and control podocytes (1.5 [95% CI: 1.1 to 1.9] KD cells/field and 6.7 [95% CI: 5.0 to 8.1] control cells/field; $P = 0.0022$ and 0.0043 vs. respective untreated cells). The ADR-induced detachment was prevented by cotreatment with R-568 in controls (ADR+R-568 8.9 [95% CI: 6.8 to 14.1] cells/field; $P = 0.0173$ vs. ADR-treated controls) but not in CaSR-KD podocytes. Treatment with R-568 alone did not modify attachment capacity of control or CaSR-KD podocytes (Figure 3c and d).

CaSR upregulation in ADR-induced glomerulonephritis

BALB/c mice were treated with ADR and followed for 12 days. ADR-induced podocyte damage resulted in heavy proteinuria at day (d) 7 (147.1 [95% CI: 62.3 to 272.4] vs. 0.21 [95% CI: 0.15 to 0.32] g/g albumin/creatinine; $P = 0.0012$) and d11 after ADR-injection (244.0 [95% CI: 164.0 to 379.4]

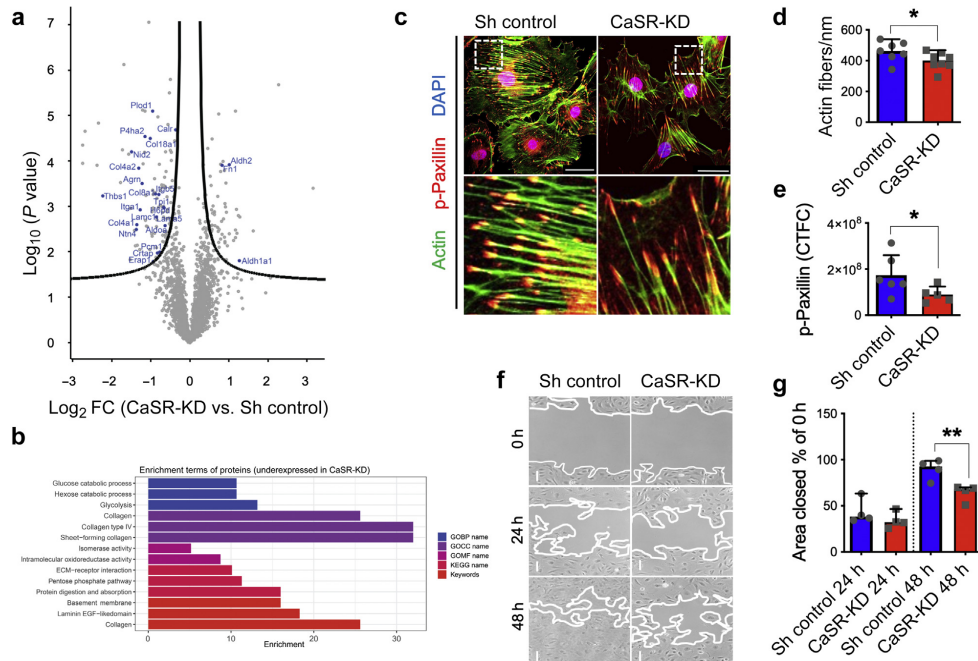


Figure 2 | Knockdown (KD) of calcium-sensing receptor (CaSR) resulted in reduced number of actin fibers, focal adhesions (FAs), migration, and expression of integrin β_1 (ITB1). (a) Volcano plot of proteomic analysis of CaSR-KD and control podocytes. The \log_2 fold change (FC) of label-free quantification intensities is plotted versus the negative decadic logarithm of the P value (Student's t test). A total of 151 proteins pass the criteria for significance (significance analysis of microarrays analysis, $s_0 = 0.1$; false discovery rate: 0.05). Significantly regulated proteins associated with collagen, laminin, extracellular matrix (ECM) and basement membrane, Proteins involved in adhesion, motility, collagen, laminin and extracellular matrix interaction and adhesion are highlighted in blue. (b) Gene ontology (GO) biological process (GOBP), cellular component (GOCC), molecular function (GOMF) as well as Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathways and UniProtKB Keyword term analysis indicating enriched terms based on proteins that were less abundant in CaSR-KD compared with small hairpin (Sh) control. (c–e) Immunofluorescence staining of actin (green), phosphorylated (p)-paxillin (red), and cell nuclei (blue, 4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI]) in control and CaSR-KD cells (c) (confocal, original magnification $\times 63$; bar = 50 μm ; representative images of 3 independent experiments). The graphs show number of actin fibers (d) and the corrected total cell fluorescence ([CTCF], correction was done for the cell area) for p-paxillin, marking FAs (e) in control and CaSR-KD podocytes (each data point [bullet] represents 1 biological replicate, and in each replicate at least 15 randomly chosen fields were analyzed). (f,g) Migration assay in control and CaSR-KD podocytes: cells were grown in migration chambers and a defined gap in the cell layer was induced by removal of a separator. Representative pictures of the gap at time point 0, after 24 and 48 hours (f) (original magnification $\times 20$; bar = 100 μm) and quantification of closed area (percentage of initial cell free area) (g). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Each data point shows 1 independent experiment, including 5 measuring points per experiment. EGF, epidermal growth factor. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

vs. 3.52 [95% CI: 0.89 to 6.7] g/g albumin/creatinine; $P = 0.0286$; Figure 4a). Glomerular CaSR mRNA was quantified in isolated glomeruli relative to podocin mRNA to account for podocyte loss. CaSR mRNA was 3- to 6-fold increased after ADR injection (d8: 4.06 [95% CI: 1.43 to 5.46] vs. 0.99 [95% CI: 0.48 to 1.55] CaSR/podocin mRNA in untreated control; $P = 0.0179$; d12: 7.17 [95% CI: 3.12 to 9.72] vs. 0.92 [95% CI: -0.23 to 2.39] CaSR/podocin mRNA in untreated control; $P = 0.05$; Figure 4b). CaSR protein was also more abundant in ADR-treated glomeruli. Costaining with podocyte (synaptopodin) and endothelial cell marker (endomucin) demonstrated an ADR-induced increase in CaSR-positive

podocytes (d4: 77.1% [95% CI: 60.3% to 92.7%] vs. 40.4% [95% CI: 28.5% to 49.7%] CaSR-positive podocytes in untreated mice; $P = 0.0286$; d8: 73.8% [95% CI: 70.0% to 85.7%] vs 41.1% [95% CI: 10.6% to 48.9%] CaSR-positive podocytes; $p=0.0286$). The CaSR signal was also higher in mesangial areas and early fibrotic lesions (Figure 4c and d).

Podocyte-specific CaSR-KO does not result in proteinuria

A podocyte-specific CaSR-KO (CaSR^{Δpod}) was established in BALB/c mice, using floxed CaSR (CaSR^{fl/fl}) mice crossed with mice expressing the Cre-recombinase in podocytes. Genomic DNA was analyzed from isolated glomeruli. The KO was

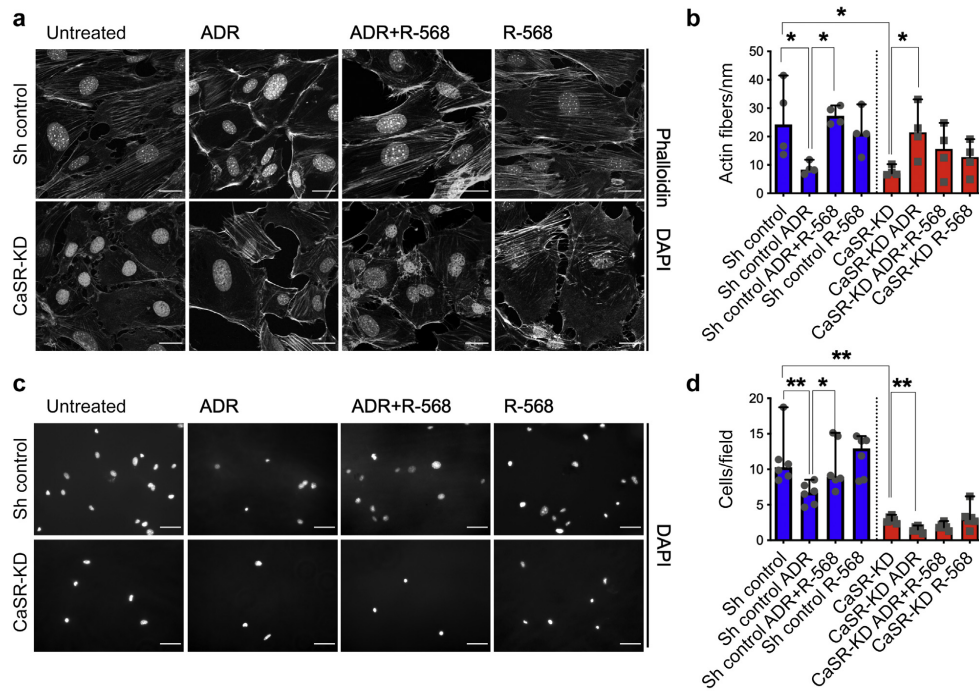


Figure 3 | Knockdown (KD) of the calcium-sensing receptor (CaSR) changed the kind of rearrangement of actin fibers mediated by adriamycin (ADR) and reduced podocyte attachment ability. (a,b) Control and CaSR-KD cells were treated with ADR (2 µg/ml) and the calcimimetic R-568 (1 µmol/l) for 24 hours. Actin staining was performed with phalloidin. Immunofluorescence staining (representative pictures, confocal, original magnification ×40; bar = 25 µm) (a) and counting of central actin fibers per cell diameter (b) in control and CaSR-KD podocytes after treatment with ADR and R-568. (c,d) Adhesion assay: control and CaSR-KD podocytes were seeded, and ADR and R-568 were added to the incubation medium. Cells were fixed after 6 hours. (c) Representative examples of adherent podocytes after 6 hours (epifluorescence microscope, original magnification ×20; staining of cell nuclei (4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI])); bar = 200 µm). (d) Number of adherent cells in control and CaSR-KD podocytes. **P* < 0.05; ***P* < 0.01. Each data point represents 1 independent experiment, in each replicate 15 randomly chosen fields were analyzed. Sh, small hairpin, used as control. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

detected only in glomeruli of homozygous floxed and podocin-Cre-positive mice (Supplementary Figure S2A). Immunofluorescence demonstrated the absence of CaSR staining in podocytes and maintained expression in tubules (Figure 5a). Podocyte-specific CaSR-KO did not result in renal histological alterations (Figure 5b), proteinuria (Supplementary Figure S2B) or any other phenotype up to the age of 1 year. Podocyte FP width, assessed by digital quantification³³ of the FSD in nephrin-stained kidneys, was similar between CaSR-KO and littermate controls (Figure 5d and e).

KO of podocyte CaSR aggravates ADR-induced glomerular injury

To study the role of podocyte CaSR in proteinuria BALB/c mice with podocyte-specific CaSR-KO (CaSR^{Δpod}) and littermate controls (CaSR^{fl/fl}) were treated with ADR and NaCl as control. ADR-treated mice developed proteinuria, which was 3-fold more severe in CaSR^{Δpod} mice compared to

littermate ADR-treated controls (d7: 79.5 [95% CI: 45.4 to 126.4] vs. 7.02 [95% CI: 0.0 to 59.7] g/g albumin/creatinine; *P* = 0.01; Figure 5c). ADR treatment resulted in a reduction in FSD per measured length of FP, indicating the development of FP effacement (d8: CaSR^{fl/fl}Ctrl vs. CaSR^{fl/fl}ADR: 4.25 [95% CI: 4.19 to 4.27] vs. 3.33 [95% CI: 3.25 to 3.4] FSD/µm; *P* < 0.0001; CaSR^{Δpod}Ctrl vs. CaSR^{Δpod}ADR: 4.31 [95% CI: 4.23 to 4.32] vs. 3.17 [95% CI: 2.99 to 3.17]; *P* < 0.0001). This was more pronounced in ADR-treated CaSR^{Δpod} animals compared with ADR-treated littermate controls (*P* = 0.001; Figure 5d and e).

Kidneys were stained for p57, which is highly expressed in podocytes. Podocyte number was reduced in both ADR-treated groups, but 8 days after ADR injection CaSR^{Δpod} mice had a lower podocyte number per glomerular area compared to ADR-treated littermate controls (d8: CaSR^{fl/fl}ADR vs. CaSR^{Δpod} ADR: 3662 [95% CI: 3376 to 3902] vs. 3172 [95% CI: 2395 to 3543] p57+cells/mm²; *P* = 0.0238; Figure 6a

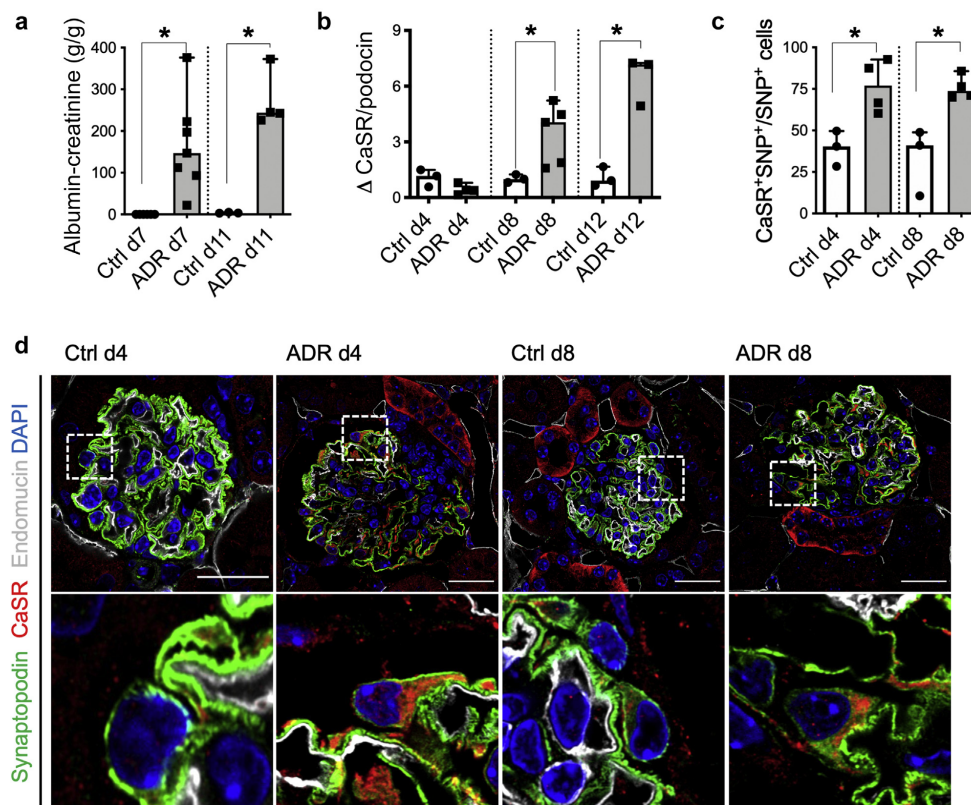


Figure 4 | The glomerular and podocyte calcium-sensing receptor (CaSR) was upregulated in adriamycin (ADR)-induced nephropathy in BALB/c mice. Wild-type BALB/c mice were treated with ADR, and urine and kidneys were examined and compared with those of NaCl-treated controls (Ctrl). **(a)** Albuminuria (urinary albumin-creatinine ratio in g/g) after day (d) 7 and d11 of ADR. **(b)** Expression of CaSR/podocin mRNA in isolated glomeruli on d8 and d12 evaluated by quantitative polymerase chain reaction. **(c,d)** Kidneys were stained for CaSR (red), synaptopodin ([SNP], green), endomucin (white), and nuclei (4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI], blue) and analyzed under a confocal microscope **(d)** (representative images of at least 3 animals per group, confocal, original magnification $\times 40$; bars = 25 μm). Nuclei, which were totally surrounded by SNP, were counted as podocytes and the number of CaSR-positive podocytes was related to total number of podocytes **(c)**. Per animal at least 20 glomeruli (10 from inner cortex, 10 from outer cortex) were analyzed. * $P < 0.05$. **(a–c)** Each data point represents 1 animal. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

and b). ADR treatment resulted in sclerotic lesions in both groups, but lesions were more pronounced in $\text{CaSR}^{\Delta\text{pod}}$ mice (2.60 [95% CI: 1.26 to 3.95] vs. 1.22 [95% CI: 0.73 to 1.82] PAS glomerular injury score in $\text{CaSR}^{\text{fl/fl}}$; $P = 0.0286$; Figure 6a and c).

Activation of CaSR reduced ADR-induced albuminuria in WT but not in podocyte-specific CaSR KO mice

As stimulation of the CaSR reduces proteinuria in different kidney disease models^{6,21,22} and stabilized podocytes' skeleton *in vitro*, we wanted to define the specific role of the podocyte CaSR. Therefore, we studied the effect of cinacalcet in ADR-treated wild-type (WT) and $\text{CaSR}^{\Delta\text{pod}}$ animals (Figure 6d–g).

The simultaneous treatment of ADR with cinacalcet led to a reduction of the albumin-creatinine ratio at d10 to 0.004 (95% CI: 0.01 to 1.2) relative to the ratio of ADR-treated WT animals of 1.0 (95% CI: 0.06 to 1.94; $P = 0.041$). At d12 respective values were 0.015 (95% CI: 0.007 to 0.54) relative to the ratio in the WT ADR-treated mice of: 1.0 (95% CI: 0.009 to 1.99; $P = 0.041$). In contrast, no reduction in proteinuria was observed in response to cinacalcet in $\text{CaSR}^{\Delta\text{pod}}$ mice (Figure 6d–g).

CaSR activation reduced proteinuria in pediatric NS

Children with idiopathic NS, whose parents objected standard glucocorticoid therapy, were treated with cinacalcet and calcium. Clinical and biochemical data prior to treatment are

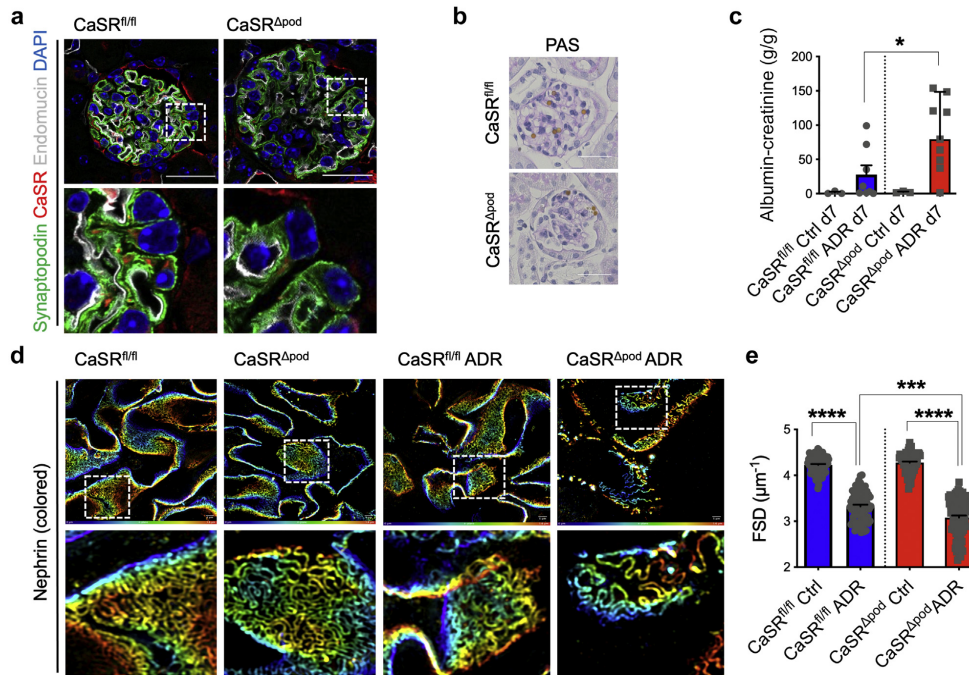


Figure 5 | Podocyte-specific (pod) calcium-sensing receptor (CaSR) knockout (KO) did not result in a kidney phenotype, but adriamycin (ADR) treatment resulted in an enhanced albuminuria and foot process effacement. Podocyte-specific KO was induced by the mating of mice with floxed (fl) CaSR with podocyte-specific Cre-recombinase mice. (a) Expression of CaSR (red) in costaining with synaptopodin (green) and endomucin (white) in CaSR^{fl/fl} and CaSR^{Δpod} mice in immunofluorescence staining (confocal, original magnification ×40; 4',6-diamidino-2-phenylindole [DAPI], (blue)); representative pictures of 3 independent experiments; bar = 25 μm). (b) Representative histological pictures of CaSR^{fl/fl} and CaSR^{Δpod} in periodic acid-Schiff (PAS) staining (light microscopy, original magnification ×40; bar = 25 μm). (c) Podocyte-specific CaSR-KO mice (CaSR^{Δpod}) and littermate controls (CaSR^{fl/fl}) were treated either with ADR or NaCl, and their kidneys and urine were analyzed for albuminuria. (d,e) Podocyte exact morphology measurement procedure was performed in kidney sections. (d) The micrographs show images of nephrin-stained glomeruli obtained by 3-dimensional structured illumination microscopy reconstructions from untreated and ADR-treated CaSR^{fl/fl} and CaSR^{Δpod} mice (bar = 5 μm). The slit diaphragm (colored) and single podocyte foot process (FP; black) can be distinguished. As shown by the magnification, kidneys from untreated animals show a regular staining pattern with single FP bridged by a meandering slit density (SD) in between. In the CaSR^{Δpod} mice, the SD appears less meandering and the FP are effaced. (e) Podocyte FP effacement was quantified with the measurement of SD length per glomerular area (filtration slit density [FSD]). (e) Each data point represents 1 animal. (e) Each data point stands for 1 glomerulus from at least 4 animals per group, and from each animal about 20 glomeruli were measured. **P* < 0.05; ****P* < 0.001; *****P* < 0.0001. Ctrl, control; d7, day 7. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

given in Table 1. There were no signs for another proteinuria-causing disease different from minimal change glomerulonephritis. For safety reasons, the first patient only received 1 dose cinacalcet; the subsequent patients were treated with increasing doses until remission. The first patient had 60% reduction and also the 3 other patients experienced a decline in proteinuria and albuminuria (Figure 7, Table 2), edema resolved within 6 to 13 days and serum albumin increased (d0: 612.5 [95% CI: 201.7 to 1361] vs. d6 132.5 [95% CI: 23.46-293.5] mg/mmol; *P* = 0.0286). Urinary Ca²⁺ excretion was normal in all patients. Patients 2 to 4 experienced minor viral infections (adenovirus gastroenteritis on d10 and upper airway infections with fever on d10 and d8, respectively). A relapse of proteinuria developed

after 10, 19, and 23 days, which prompted cinacalcet discontinuation. Standard prednisone treatment was initiated, which resulted in complete remission within 7 to 20 days (Figure 7). In patients 1 and 4, treatment was guided based on home urine dipstick findings. None of the 4 patients showed any cinacalcet-related side effects. Patients 1 and 4 did not experience any subsequent relapses, but patients 2 and 3 developed frequent relapses and were successfully treated with tacrolimus and mcofenolate mofetil, respectively.

DISCUSSION

This study provides evidence for a crucial role of the CaSR in podocyte actin cytoskeleton regulation and adhesion and for

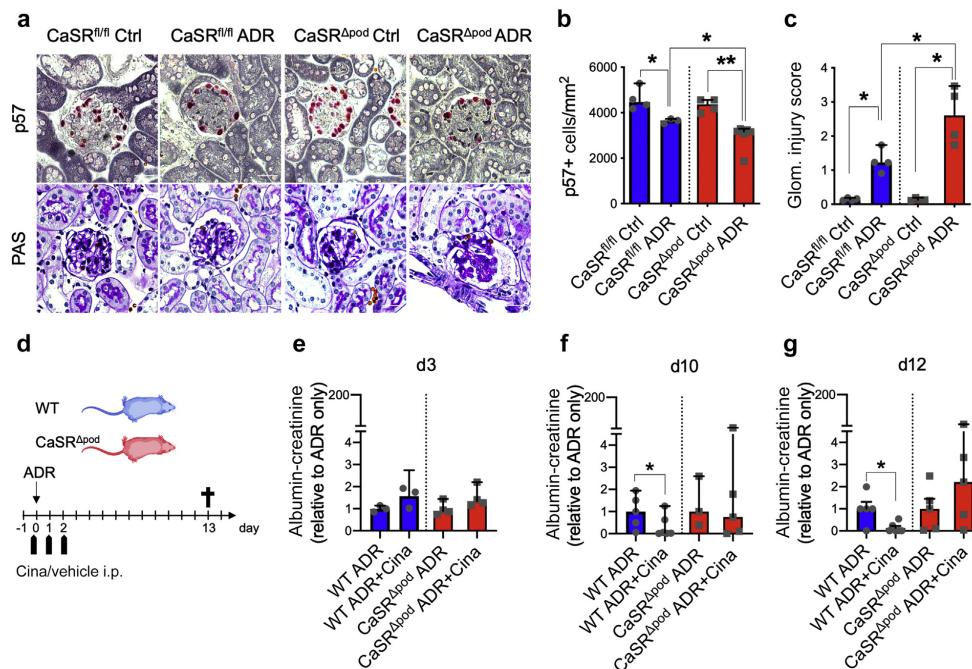


Figure 6 | Calcium-sensing receptor (CaSR) knockout (KO) aggravates adriamycin (ADR)-induced glomerular (Glom.) injury. Stimulation of the CaSR with cinacalcet (Cina) results in reduction of ADR-induced proteinuria in wild-type (WT) animals. Podocyte-specific CaSR-KO mice (CaSR^{Δpod}) and littermate controls (CaSR^{fl/fl}) were treated with either ADR or NaCl and kidneys were analyzed. **(a)** Kidney sections were stained after treatment with p57 and number of podocytes (p57-positive intraglomerular cells) were counted per glomerular area. Glomerular injury was evaluated 12 days after ADR treatment with periodic acid–Schiff (PAS) staining. **(a–c)** Representative p57 stainings (podocyte nuclei in red) and PAS stainings are shown (light microscopy, original magnification $\times 40$; bar = 25 μm) **(a)**. The respective quantification for p57 **(b)** and the semi-quantification analysis of glomerular PAS score **(c)** are shown. **(d–g)** Podocyte-specific CaSR-KO mice (CaSR^{Δpod}) and littermate controls (CaSR^{fl/fl}) were treated with ADR. Mice received i.p. injections of Cina or dimethylsulfoxide (as vehicle), 2 hours before and at days 1 and 2 after ADR administration. Urine was analyzed for albumin-creatinine ratio at day 3 (d3) **(e)**, d10 **(f)** and d12 **(g)** (values were normalized to ADR-only treated WT or CaSR-KO mice, respectively; each data point represents 1 animal, and for each animal 50 randomly chosen glomeruli were scored **(b,c)**). * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. Ctrl, control. To optimize viewing of this image, please see the online version of this article at www.kidney-international.org.

podocyte resistance against toxin-induced damage. ADR treatment is a well-established model for podocyte diseases,³⁷ because it primarily attacks podocytes and leads to FP effacement, the hallmark of childhood NS. The ADR-induced podocyte damage is not reversible, because ADR treatment induces secondary sclerotic lesions, which share similarities with human FSGS. In children with NS (mostly minimal change disease), the majority of cases responds to glucocorticoid therapy. In steroid-resistant NS, however, the disease also progresses to FSGS. The ADR-induced cytoskeleton rearrangement in the *in vitro* cell culture studies recapitulate the mechanisms of FP effacement *in vivo*. CaSR^{Δpod} mice developed increased levels of proteinuria, podocyte FP effacement, podocyte loss, and sclerosis compared with their littermates in response to ADR. Together with our earlier findings on R-568 induced stabilization of the podocyte actin

cytoskeleton and mitigation of puromycin-induced proteinuria,⁶ our study points to a therapeutic potential of pharmacological modulation of CaSR activity in podocyte-related diseases. Our findings confirmed that podocyte CaSR is critical for podocyte stabilization and the probable target of CaSR stimulation in proteinuric disease. WT mice, where the CaSR is active in all cells, are less sensitive to ADR treatment, and the systemic stimulation of the CaSR leads to a significant reduction of albuminuria. Podocyte-specific CaSR-KO led to an enhanced sensitivity to ADR treatment, and the systemic stimulation of CaSR with cinacalcet showed no protective effect.

The critical role of podocyte Ca²⁺ homeostasis has been well characterized.³⁸ In podocytes the intracellular Ca²⁺ balance is extremely important for actin cytoskeleton dynamics, which is crucial for maintenance of the glomerular

Table 1 | Clinical and biochemical data of the 4 children with idiopathic nephrotic syndrome prior to cinacalcet treatment

Parameters	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Age, yr	3	4	4	8
Relapse	0	1	2	2
Gender	Male	Male	Female	Male
Body weight, kg	15.9	16.2	22.6	30.2
Serum albumin, g/l	22.3	26.4	28.0	29.1
Serum protein, g/l	41.1	48.1	57.7	50.6
Serum calcium, mmol/l	1.82	1.91	2.18	2.06
Serum ionized calcium, mmol/l	1.21	1.23	1.18	1.20
Serum calcium albumin correction, mmol/l	2.26	2.25	2.48	2.33
Serum phosphorus, mmol/l	1.49	1.42	1.79	1.68
Serum magnesium	NA	0.75	0.75	0.79
Serum triglyceride, mg/dl	612	135	122	77
Urine albumin-creatinine ratio, mg/mmol creatinine	861	1541	648	834
Urine protein-creatinine ratio, mg/mmol creatinine	1232	1617	820	891
Urine β_2 per molar creatinine, mg/mmol creatinine	0.1	0.33	0.00	0.06
Urine calcium-creatinine ratio, mg/mg	0.02	0.08	0.01	0.00

NA, not available.

filtration barrier.³⁹ In contrast to other cell types, where the activation or inhibition of the CaSR regulates system calcium homeostasis (i.e., in the parathyroid gland or in the tubular

system, via various different feedback loops),⁵ in podocytes the CaSR exerts specific intracellular effects on the actin cytoskeleton. The activation of the CaSR results in activation

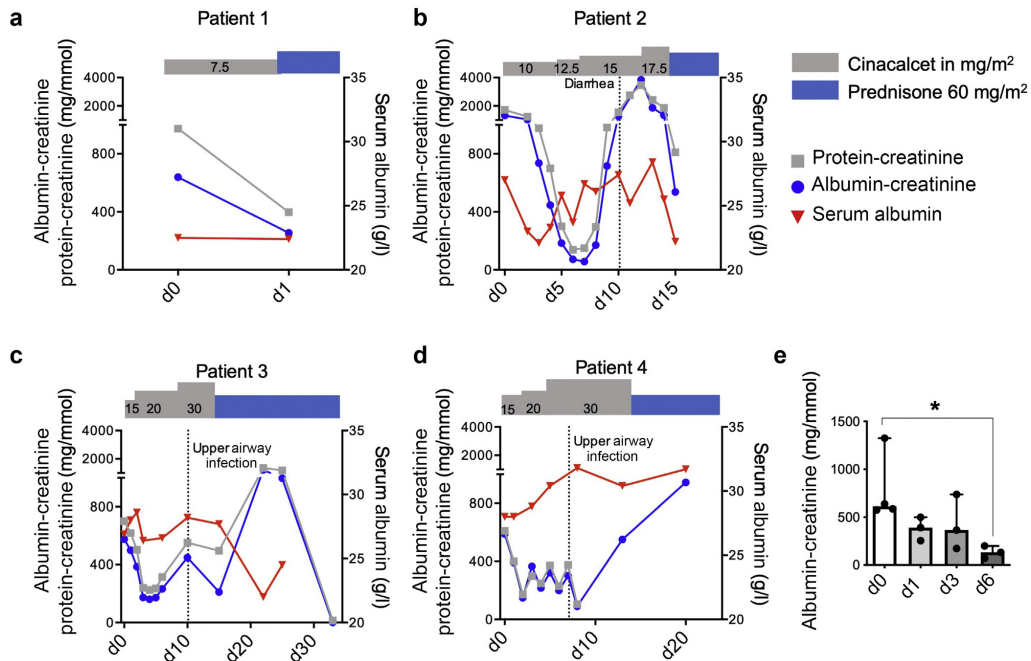


Figure 7 | Reduction of albuminuria and proteinuria in 4 pediatric patients with nephrotic syndrome treated with cinacalcet. (a–d) Four pediatric patients with idiopathic nephrotic syndrome were treated with increasing doses of cinacalcet (gray bars). Spot urine albumin and protein/creatinine ratios and serum albumin concentrations were measured. Following a single dose of cinacalcet, albuminuria and proteinuria declined within 24 hours in patient 1 (a). The 3 subsequent patients experienced a rapid and marked suppression in albuminuria and proteinuria and a subsequent rebound following viral infections and were then treated with prednisone (blue bars). (e) Summary of initial albuminuria in the 4 patients at 1, 3, and 6 days after start of cinacalcet treatment. Each data point represents proteinuria of 1 patient. * $P < 0.05$. d0, day 0.

Table 2 | Best biochemical findings achieved during cinacalcet treatment

Parameters	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Highest serum albumin, g/l	22.5	31.0	28	31.8
Highest serum protein, g/l	42.6	50.8	57.7	52.1
Lowest serum calcium albumin correction, mmol/l	2.21	2.3	2.46	2.13
Lowest serum ionized calcium, mmol/l	1.02	1.03	1.17	1.08
Lowest serum triglyceride, mg/dl	612	54	122	77
Lowest urine albumin-creatinine ratio, mg/mmol creatinine	330	45.58	125	149
Lowest urine protein-creatinine ratio, mg/mmol creatinine	468	91.15	179	172
Lowest urine β_2 per molar creatinine, mg/mmol creatinine	0.1	0.00	0.00	0.06
Lowest urine calcium-creatinine ratio, mg/mg	0.02	0.01	0.01	0.0
Highest urine calcium-creatinine ratio, mg/mg	3.42	0.45	0.08	0.13

of TRPC6 in podocytes, which increases intracellular Ca^{2+} concentration, induces downstream signaling, and regulates podocyte actin dynamics.⁴⁰ Gain-of-function mutations of TRPC6 alter the cellular Ca^{2+} balance and lead to major podocyte damage, proteinuria, and progressive glomerulosclerosis.^{19,20} For a better understanding of the role of the CaSR in podocyte Ca^{2+} homeostasis and to define a putative novel therapeutic target, we established a CaSR-KD podocyte cell line, which abolished R-568-induced Ca^{2+} influx and led to a disturbed function of the actin cytoskeleton. The Ca^{2+} influx is controlled by the activation of TRPCs^{18,40} which activate Rho A kinase. Rho A is involved in the stabilization of the actin cytoskeleton by forming actin stress fibers and FA.^{40,41} The formation and assembly of FA is crucial for the migration of attached cells, and the balanced interplay between a stationary and a more mobile phenotype is important for podocyte-specific functions.^{42–49} In an unbiased proteomic approach, we could identify various proteins, which are influenced by the CaSR. Some of them are involved in important podocyte functions, such as adhesion, motility, and extracellular matrix interaction. These findings could also be shown in functional assessment of migration and adhesion and the potential of remodeling on ADR treatment. Nevertheless, these data were generated in an *in vitro* cell culture system, lacking the influence of circulating factors and neighboring cells, such as endothelial or mesangial cells. Intravital dynamic intracellular Ca^{2+} imaging⁵⁰ should provide deeper insights into the interactions and influence of podocytes and other glomerular cells.

Integrins do not only link the cell mechanically to the extracellular matrix, they also sense attachment and act as bidirectional signal transducers.¹² Especially, ITB1 is essential for the motility and the movement of cells, as previously demonstrated for invading tumor cells³⁶ and confirmed for podocytes in our migration assay. The CaSR in tumor cells interacts with ITB1 and modulates cell adhesion and migration.³⁶ Therefore our findings of reduced ITB1 expression in CaSR-KD podocytes may explain the reduced migration capacity.

Under physiological conditions, the renal morphology and function of CaSR^{ΔPod} mice were normal. Exposure to ADR in these mice, however, resulted in aggravation of glomerular injury compared with in their littermate controls. Of note,

WT mice upregulated podocyte CaSR expression after ADR exposure, suggesting a protective mechanism to preserve the actin cytoskeleton. The enhanced podocyte loss on ADR damage mirrors the reduced adhesion *in vitro*. CaSR-KD cells needed more time to rebuild functional FA to attach to the cell culture dish. The altered ability of FA and actin cytoskeleton dynamics is a hallmark of podocyte damage and has been extensively studied in the past.^{9,39} We previously demonstrated major protection from puromycin-induced proteinuria in rats by R-568. Podocyte number and integrity were preserved and glomerulosclerosis was reduced.⁶ These and our present experimental findings demonstrate a key role of the kidney and especially podocyte CaSR in glomerular proteinuric diseases. The underlying mechanisms, however, are only partly understood. The role of the highly abundant tubular CaSR within a tubular-glomerular feedback system requires further study.

In addition to our experimental findings, we provide first patient-level evidence that the kidney CaSR could represent a novel putative therapeutic target for the treatment of podocyte injury. Primary idiopathic NS is usually characterized by FP effacement.⁵¹ Few weeks of prednisone therapy result in complete remission in most cases but relapses are frequent.^{52,53} Due to major adverse effects associated with extended glucocorticoid treatment, including severe metabolic and clinical alterations, a second-line steroid-sparing immunosuppression is often needed, including calcineurin inhibitors and mycophenolate mofetil or alternative medications such as leflunomide, despite major adverse effects.^{54,55} In search of alternative treatments and based on our experimental findings, we used cinacalcet as an off-label therapy in 4 children. To minimize the risk of hypocalcemia and to optimize the effect of cinacalcet, oral calcium was co-administered. All patients experienced a suppression of albuminuria. An increase in serum albumin and clinical remission of edema was observed, but was followed by a rebound of albuminuria, presumably triggered by common viral infections. This suggests that the cinacalcet treatment improved podocyte FP function but did not sufficiently counteract underlying immunological pathomechanisms. There are various immunological dysregulations most likely synergizing in podocyte FP alteration and proteinuria.⁵¹ Other putative mechanisms involved in the antiproteinuric action of

calcimimetics may comprise hemodynamic^{56,57} or immunomodulatory⁵⁸ effects. Nevertheless, benefits of calcimimetics, which are currently licensed for treatment of primary and secondary hyperparathyroidism in patients on dialysis, have to be balanced against potential side effects associated with prolonged calcimimetic therapy, such as mesangial cell proliferation.⁵⁹ At least in experimental *in vivo* studies, such effects were not described. In patients with reduced kidney function, stimulation of the CaSR increases calciuria. Our patients had normal glomerular filtration rates, and Ca²⁺ excretion measured together with proteinuria were in the low normal ranges. In line with this, in patients with primary hyperparathyroidism Ca²⁺ excretion does not increase with cinacalcet treatment.^{60,61} Taken together, our findings point to a promising therapeutic option of calcimimetic compounds as a supportive, steroid-sparing treatment in patients with NS. Such approaches, however, require thorough validation in adequately powered, randomized prospective trials.

Whether the antiproteinuric action of CaSR activation is also effective in other glomerular proteinuric diseases and has the potential to reduce side effects of current mainly immunosuppressive-based regimens is unclear.²¹

In conclusion, we demonstrate that the podocyte CaSR stabilizes the actin cytoskeleton and FA in podocytes and improves podocyte migration and adhesion capacity. It is required for cellular Ca²⁺ homeostasis and protects from toxin-induced proteinuria, podocyte loss, and glomerulosclerosis. The antiproteinuric action of calcimimetics is specifically exerted via the podocyte CaSR. The marked, albeit transient antiproteinuric action of CaSR sensitization in children with idiopathic, steroid-sensitive NS suggests that modulation of podocyte Ca²⁺ homeostasis could represent a promising and innovative approach to treat glomerular diseases.

DISCLOSURE

NE declares that the podocyte exact morphology measurement procedure that has been referred to in this manuscript has been registered for a patent. CPS received research funding from AMGEN, outside the submitted work. All the other authors declared no competing interests.

DATA STATEMENT

The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the Proteomics Identifications (PRIDE)⁶² partner repository with the dataset identifier PXD030416.

ACKNOWLEDGMENTS

Laboratory work was supported by Anja Obser, Jana Christin Abt, Johannes Bockenbauer, and Marlies Sachs. The genotyping of the mice was performed by Sarah Hohmann and Melanie Schaper. Laboratory work and several authors (AKM, JS, TBH, VGP, CM-S, MMR) were supported by resources of the German Research Foundation (SFB 1182 and SFB 1192).

We want to thank Mandy Weise and Annabel Schnarre for their technical assistance. The podocyte exact morphology measurement procedure and TBH were supported by the Bundesministerium für Bildung und Forschung (STOP-FSGS 01GM1518B [to NE]). CPS and JO

are members of the European Rare Kidney Diseases Reference Network. VGP was funded by Bundesministerium für Bildung und Forschung eMed Consortia "Fibromap."

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Supplementary File (TIFF)

Figure S1. Analysis of calcium-sensing receptor–knockdown (CaSR-KD) and control podocytes. **(A,B)** Western blot and evaluation of densitometry of RhoA guanosine triphosphate (GTP) and total RhoA from RhoA pull down assay in CaSR-KD and control podocytes. **(C,D)** Expression of integrin β₁ (ITB1) and integrin β₃ (ITB3) in control and KD podocytes. Representative Western blots of ITB1 and ITB3 **(C)** and quantification **(D)**. (*P < 0.05, ****P < 0.0001, NS = not significant; each data point is showing 1 independent experiment; arrowheads indicate height of nearest marker bands.) **(E,F)** Migration assay in control and GRGDSP (IGly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro) unspecific integrin inhibitor treated podocytes. Cells were grown in migration chambers and a defined gap in the cell layer was induced by removing a separator. Representative pictures of the gap at time point 0, after 12 and 24 hours **(F)** (original magnification ×20; bar = 100 μm) and quantification of closed area (percentage of initial cell free area) **(E)**. (*P < 0.05, **P < 0.01, each data point is showing 1 independent experiment, including 5 measuring points per experiment.)

Figure S2. Analysis of podocyte-specific calcium-sensing receptor–knockout (CaSR-KO) mice. **(A)** Genotyping of isolated glomeruli demonstrated CaSR-floxed band at 1451 base pairs (bp), CaSR wild-type (WT) band at 1322 bp and CaSR-KO band at 443 bp; CaSR^{fl/fl} = Cre-negative = functional WT; CaSR^{+/fl} Cre+ = podocyte-specific heterozygous CaSR-KO (CaSR^{hetΔpod}); CaSR^{fl/fl} Cre+ = podocyte-specific homozygous CaSR-KO (CaSR^{Δpod}). **(B)** Albumin-creatinine ratio in untreated CaSR^{fl/fl} and CaSR^{Δpod} mice at the age of 3 and 6 months.

REFERENCES

- Alfadda TI, Saleh AM, Houillier P, et al. Calcium-sensing receptor 20 years later. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2014;307:C221–C231.
- Brown EM, MacLeod RJ. Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev.* 2001;81:239–297.
- Magno AL, Ward BK, Ratajczak T. The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr Rev.* 2011;32:3–30.
- Riccardi D, Brown EM. Physiology and pathophysiology of the calcium-sensing receptor in the kidney. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2010;298:F485–F499.
- Riccardi D, Valenti G. Localization and function of the renal calcium-sensing receptor. *Nat Rev Nephrol.* 2016;12:414–425.
- Oh J, Beckmann J, Bloch J, et al. Stimulation of the calcium-sensing receptor stabilizes the podocyte cytoskeleton, improves cell survival, and reduces toxin-induced glomerulosclerosis. *Kidney Int.* 2011;80:483–492.
- Greka A, Mundel P. Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol.* 2012;74:299–323.
- Albiges-Rizo C, Destaing O, Fourcade B, et al. Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci.* 2009;122:3037–3049.
- Sever S, Schiffer M. Actin dynamics at focal adhesions: a common endpoint and putative therapeutic target for proteinuric kidney diseases. *Kidney Int.* 2018;93:1298–1307.
- Schell C, Rogg M, Suhm M, et al. The FERM protein EPB41L5 regulates actomyosin contractility and focal adhesion formation to maintain the kidney filtration barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017;114:E4621–E4630.
- Schell C, Huber TB. The evolving complexity of the podocyte cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol.* 2017;28:3166–3174.
- Hynes RO. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell.* 2002;110:673–687.
- Harburger DS, Calderwood DA. Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci.* 2009;122:159–163.
- Schell C, Sabass B, Helmstaedter M, et al. ARP3 controls the podocyte architecture at the kidney filtration barrier. *Dev Cell.* 2018;47:741–757.e748.

15. Sterk LM, de Melker AA, Kramer D, et al. Glomerular extracellular matrix components and integrins. *Cell Adhes Commun.* 1998;5:177–192.
16. Wei C, El Hindi S, Li J, et al. Circulating urokinase receptor as a cause of focal segmental glomerulosclerosis. *Nat Med.* 2011;17:952–960.
17. Wieder N, Greka A. Calcium, TRPC channels, and regulation of the actin cytoskeleton in podocytes: towards a future of targeted therapies. *Pediatr Nephrol.* 2016;31:1047–1054.
18. Zhang L, Ji T, Wang Q, et al. Calcium-sensing receptor stimulation in cultured glomerular podocytes induces TRPC6-dependent calcium entry and RhoA activation. *Cell Physiol Biochem.* 2017;43:1777–1789.
19. Winn MP, Conlon PJ, Lynn KL, et al. A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science.* 2005;308:1801–1804.
20. Reiser J, Polu KR, Moller CC, et al. TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet.* 2005;37:739–744.
21. Gut N, Piecha G, Pradel A, et al. The calcimimetic R-568 prevents podocyte loss in uninephrectomized ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2013;305:F277–F285.
22. Piecha G, Kokeny G, Nakagawa K, et al. Calcimimetic R-568 or calcitriol: equally beneficial on progression of renal damage in subtotally nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 2008;294:F748–F757.
23. Mundel P, Reiser J, Zuniga Mejia Borja A, et al. Rearrangements of the cytoskeleton and cell contacts induce process formation during differentiation of conditionally immortalized mouse podocyte cell lines. *Exp Cell Res.* 1997;236:248–258.
24. Asanuma K, Kim K, Oh J, et al. Synaptopodin regulates the actin-binding activity of alpha-actinin in an isoform-specific manner. *J Clin Invest.* 2005;115:1188–1198.
25. Rinschen MM, Schroeter CB, Koehler S, et al. Quantitative deep mapping of the cultured podocyte proteome uncovers shifts in proteostatic mechanisms during differentiation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2016;311:C404–C417.
26. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M. Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem.* 2003;75:663–670.
27. Tyanova S, Temu T, Cox J. The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc.* 2016;11:2301–2319.
28. Rodriguez CI, Buchholz F, Galloway J, et al. High-efficiency deleter mice show that FLPe is an alternative to Cre-loxP. *Nat Genet.* 2000;25:139–140.
29. Moeller MJ, Sanden SK, Soofi A, et al. Podocyte-specific expression of cre recombinase in transgenic mice. *Genesis.* 2003;35:39–42.
30. Takemoto M, Asker N, Gerhardt H, et al. A new method for large scale isolation of kidney glomeruli from mice. *Am J Pathol.* 2002;161:799–805.
31. Radon V, Czesla M, Reichelt J, et al. Ubiquitin C-terminal hydrolase L1 is required for regulated protein degradation through the ubiquitin proteasome system in kidney. *Kidney Int.* 2018;93:110–127.
32. Artelt N, Siegerist F, Ritter AM, et al. Comparative analysis of podocyte foot process morphology in three species by 3D super-resolution microscopy. *Front Med (Lausanne).* 2018;5:292.
33. Siegerist F, Ribback S, Dombrowski F, et al. Structured illumination microscopy and automatized image processing as a rapid diagnostic tool for podocyte effacement. *Sci Rep.* 2017;7:11473.
34. Dettmar AK, Binder E, Greiner FR, et al. Protection of human podocytes from shiga toxin 2-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and apoptosis by human serum amyloid P component. *Infect Immun.* 2014;82:1872–1879.
35. Gryniewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985;260:3440–3450.
36. Tharmalingam S, Daulat AM, Antflick JE, et al. Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins. *J Biol Chem.* 2011;286:40922–40933.
37. Wang YM, Wang Y, Harris DCH, et al. Adriamycin nephropathy in BALB/c mice. *Curr Protoc Immunol.* 2015;108:15.28.1–15.28.6.
38. Campbell AK. Intracellular calcium: friend or foe? *Clin Sci.* 1987;72:1–10.
39. Faul C, Asanuma K, Yanagida-Asanuma E, et al. Actin up: regulation of podocyte structure and function by components of the actin cytoskeleton. *Trends Cell Biol.* 2007;17:428–437.
40. Tian D, Jacobo SM, Billing D, et al. Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci Signal.* 2010;3:ra77.
41. Yang H, Zhao B, Liao C, et al. High glucose-induced apoptosis in cultured podocytes involves TRPC6-dependent calcium entry via the RhoA/ROCK pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 2013;434:394–400.
42. Reiser J, Oh J, Shirato I, et al. Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *J Biol Chem.* 2004;279:34827–34832.
43. Hackl MJ, Burford JL, Villanueva K, et al. Tracking the fate of glomerular epithelial cells in vivo using serial multiphoton imaging in new mouse models with fluorescent lineage tags. *Nat Med.* 2013;19:1661–1666.
44. Endlich N, Simon O, Gopferich A, et al. Two-photon microscopy reveals stationary podocytes in living zebrafish larvae. *J Am Soc Nephrol.* 2014;25:681–686.
45. Brahler S, Yu H, Suleiman H, et al. Intravital and kidney slice imaging of podocyte membrane dynamics. *J Am Soc Nephrol.* 2016;27:3285–3290.
46. Scott RP, Hawley SP, Ruston J, et al. Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2012;23:1149–1154.
47. Blattner SM, Hodgins JB, Nishio M, et al. Divergent functions of the Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in podocyte injury. *Kidney Int.* 2013;84:920–930.
48. Gee HY, Saisawat P, Ashraf S, et al. ARHGDI1A mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest.* 2013;123:3243–3253.
49. Shibata S, Nagase M, Yoshida S, et al. Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med.* 2008;14:1370–1376.
50. Burford JL, Villanueva K, Lam L, et al. Intravital imaging of podocyte calcium in glomerular injury and disease. *J Clin Invest.* 2014;124:2050–2058.
51. Vivarelli M, Massella L, Ruggiero B, et al. Minimal change disease. *Clin J Am Soc Nephrol.* 2017;12:332–345.
52. Sureshkumar P, Hodson EM, Willis NS, et al. Predictors of remission and relapse in idiopathic nephrotic syndrome: a prospective cohort study. *Pediatr Nephrol.* 2014;29:1039–1046.
53. Ruth EM, Kemper MJ, Leumann EP, et al. Children with steroid-sensitive nephrotic syndrome come of age: long-term outcome. *J Pediatr.* 2005;147:202–207.
54. van Husen M, Kemper MJ. New therapies in steroid-sensitive and steroid-resistant idiopathic nephrotic syndrome. *Pediatr Nephrol.* 2011;26:881–892.
55. Mühlhig AK, Lee JY, Kemper MJ, et al. Levamisole in children with idiopathic nephrotic syndrome: clinical efficacy and pathophysiological aspects. *J Clin Med.* 2019;8:860.
56. Odenwald T, Nakagawa K, Hadtstein C, et al. Acute blood pressure effects and chronic hypotensive action of calcimimetics in uremic rats. *J Am Soc Nephrol.* 2006;17:655–662.
57. Zhang T, Tang N, Xi D, et al. Calcimimetic R568 improved cardiac remodeling by classic and novel renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med.* 2019;244:789–801.
58. Klein GL, Castro SM, Garofalo RP. The calcium-sensing receptor as a mediator of inflammation. *Semin Cell Dev Biol.* 2016;49:52–56.
59. Kwak JO, Kwak J, Kim HW, et al. The extracellular calcium sensing receptor is expressed in mouse mesangial cells and modulates cell proliferation. *Exp Mol Med.* 2005;37:457–465.
60. Bilezikian JP. Bone strength in primary hyperparathyroidism. *Osteoporos Int.* 2003;14(suppl 5):S113–S115 [discussion S115–S117].
61. Iglesias P, Ais G, Gonzalez A, et al. Acute and one-year effects of cinacalcet in patients with persistent primary hyperparathyroidism after unsuccessful parathyroidectomy. *Am J Med Sci.* 2008;335:111–114.
62. Perez-Riverol Y, Csordas A, Bai J, et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* 2019;47:D442–D450.

2 Einleitung

Die Proteinurie, ein pathologischer Eiweißverlust über den Urin, ist das Leitsymptom nephrotischer Erkrankungen und kann auf eine Schädigung des glomerulären Filters zurückgeführt werden. Ein wichtiger Bestandteil der glomerulären Filtrationsbarriere ist der Podozyt, eine hochspezialisierte Zelle mit einem komplexen Aufbau und Aktinzytoskelett. Die Literatur zeigt, dass das Aktinzytoskelett für die Funktionalität der Podozyten und damit der Aufrechterhaltung der Filtrationsbarriere von zentraler Bedeutung ist. Hierbei spielt die intrazelluläre Calciumhomöostase eine wesentliche Rolle (Greka & Mundel, 2012a).

Für die Regulation des Ein- und Ausstroms von Calcium sind Calciumrezeptoren und -kanäle relevant. Zuvor durchgeführte Forschungsarbeiten unserer Arbeitsgruppe gingen in dem Artikel „Stimulation of the calcium-sensing receptor stabilizes the podocyte cytoskeleton, improves cell survival, and reduces toxin-induced glomerulosclerosis“ (Oh et al., 2011) der Frage nach, ob der Calcium-sensitive Rezeptor (CaSR) in Podozyten exprimiert wird und funktionell relevant ist. Der CaSR ist ein transmembranärer Rezeptor, der die extrazelluläre Konzentration von Calcium misst und abhängig von seiner Aktivierung in verschiedene intrazelluläre Stoffwechselprozesse involviert ist.

Es konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass das Calcimimetikum R-568, ein Stimulans des CaSR, *in vitro* verschiedene Signalwege, wie die Regulation des oxidativen Stresses und des Aktinzytoskeletts, sowie das Zellwachstum von kultivierten Podozyten beeinflusst (Oh et al., 2011). Das Calcimimetikum schützte das Aktinzytoskelett vor einer Puromycin (PAN) -Schädigung und unterstützte dessen Wiederaufbau nach Schädigung mit Cytochalasin D, einem reversiblen Hemmstoff der Aktinpolymerisation. Zusätzlich minimierte die Gabe von R-568 den Zelltod von Podozyten nach PAN-Gabe (Oh et al., 2011).

In vivo verhinderte R-568 das Auftreten einer Proteinurie nach einmaliger Gabe von PAN, verlangsamte die Entwicklung einer Glomerulosklerose und verbesserte die glomeruläre Filtrationsrate. Daraus lässt sich ableiten, dass Calcimimetika wahrscheinlich den podozytären Schaden durch antiapoptotische und Zytoskelett-stabilisierende Effekte minimieren. Der Einsatz dieser Medikamentengruppe zur Verhinderung oder zur Therapie glomerulärer Erkrankungen liegt daher nahe (Oh et al., 2011). Calcimimetika sind bisher nur für die Behandlung des sekundären Hyperparathyreoidismus bei dialysepflichtigen Patienten sowie beim Nebenschilddrüsenkarzinom und primären Hyperparathyreoidismus zugelassen (AMGEN, 2020, Januar).

Der darauffolgende Kommentar „Calcium sensing in podocytes“ von Rastaldi, 2011, hob jedoch hervor, dass diese Ergebnisse nicht verallgemeinert werden können und weitere Untersuchungen erforderlich seien, um ein genaueres Verständnis der zugrundeliegenden Mechanismen zu ermöglichen. Dafür wurde die Etablierung eines induzierbaren CaSR-Knockout (KO) -Modells vorgeschlagen (Rastaldi, 2011).

Weitere Studien legten bereits den schützenden Effekt des CaSR dar. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit R-568 in einseitig-nephrektomierten ApoE^(-/-)-Mäusen einen Podozytenverlust verhindert, die podozytäre Ultrastruktur erhält und die interstitielle Fibrose reduziert. Dieses Modell hebt sich dadurch hervor, dass der induzierte Nierenschaden nur sehr gering ist und dass die Ergebnisse unabhängig vom Blutdruck und der PTH-Sekretion sind (Gut et al., 2013). Ferner konnte durch die Calcimimetika-Gabe die Nierenschädigung in subtotal nephrektomierten Ratten abgemildert werden. In diesem Modell wird den Tieren zunächst die komplette rechte Niere und 7 Tage später die Nierenrinde der linken Niere entfernt. Hierdurch wird ein schwerer Nierenschaden mit Glomerulosklerose und Endothelschäden verursacht (Piecha et al., 2008). Diese Ergebnisse stellen ebenfalls das mögliche therapeutische Potenzial der Aktivierung des humanen CaSR bei Patienten mit Nierenerkrankungen dar, auch wenn der zugrundeliegende molekulare Mechanismus bisher noch unklar ist. Hierzu zählt, dass die spezifische Pathophysiologie des podozytären CaSR in glomerulären Erkrankungen noch nicht identifiziert, für den therapeutischen Anwendungsbereich aber dringend erforderlich ist.

Der CaSR gehört zur Gruppe der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren und wird im Körper ubiquitär in verschiedenen Zellarten exprimiert. Er ist vor allem in Zellen von Organen zu finden, die in die Calciumausscheidung und -aufnahme eingebunden sind (Darm, Knochen, Nebenschilddrüse, Niere). Hierdurch hat er Einfluss auf die Calciumhomöostase. Über die G-Proteine G_{q/11}, G_{i/o}, G_{12/13} fungiert er als multifunktionaler Rezeptor und ist unter anderem an der Aktivierung von Ionenkanälen beteiligt. Mutationen dieses Rezeptors können z.B. schweren, neonatalen Hyperparathyreoidismus verursachen. In Mäusen kann ein homozygoter KO Knochenveränderungen und einen verfrühten Tod auslösen (Hendy, D'Souza-Li, Yang, Canaff, & Cole, 2000; Pollak et al., 1994). Die Signalkaskade, die der Rezeptor auslöst, ist vom jeweiligen Zelltyp und Liganden abhängig (Alfadda, Saleh, Houillier, & Geibel, 2014; Brown & MacLeod, 2001; Magno, Ward, & Ratajczak, 2011). Calcium stimuliert den CaSR der Nebenschilddrüse und hemmt dadurch die Sekretion des Parathormons (PTH). Diese Funktion kann man sich in der Behandlung des sekundären Hyperparathyreoidismus zu Nutze machen. So kommen Calcimimetika, wie das derzeitig zugelassene Cinacalcet zum Einsatz und führen durch die geringere PTH-Freisetzung zu niedrigeren Calcium- und Phosphatspiegeln. Vorteilhaft ist dessen geringes Nebenwirkungsprofil.

In der Niere wird der CaSR hauptsächlich im proximalen Tubulus, im aufsteigenden Ast der Henle-Schleife und dem Sammelrohr exprimiert. Die Calciumreabsorption gehört zu den Primäraufgaben dieses Rezeptors in der Niere. Zudem wurde der CaSR in den Glomeruli und

in Podozyten nachgewiesen (Oh et al., 2011). Die Bedeutung dieser Expression des CaSR konnte allerdings noch nicht aufgeklärt werden.

In vitro konnte gezeigt werden, dass die Stimulation des CaSR zu einer Aktivierung des „transient receptor potential cation channel 6“ (TRPC6) in Podozyten führt und damit den intrazellulären Calciumhaushalt des Podozyten reguliert (Kistler et al., 2013). Das podozytäre Aktinzytoskelett ist maßgeblich an der Aufrechterhaltung der glomerulären Filtrationseinheit beteiligt (Greka & Mundel, 2012b). Podozyten sind durch fokale Adhäsionen (FA) an der glomerulären Basalmembran (GBM) angeheftet. Diese FA sind aus Proteinkomplexen aufgebaut, die Integrine und Proteine, wie Paxillin und die fokale Adhäsionskinase (FAK), beinhalten (Albiges-Rizo, Destaing, Fourcade, Planus, & Block, 2009; Sever & Schiffer, 2018). Der Zusammenschluss der FA bestimmt die Adhäsion und Beweglichkeit der Zellen (Schell & Huber, 2017; Schell et al., 2017). Als Transmembranproteine verbinden Integrine das Zytoskelett biochemisch und mechanisch an die extrazelluläre Matrix (EZM) (Harburger & Calderwood, 2009; Hynes, 2002; Schell et al., 2018; Sever & Schiffer, 2018).

Für die Flexibilität und Funktion des podozytären Aktinzytoskeletts ist die intrazelluläre Calciumhomöostase von besonderer Bedeutung (Greka & Mundel, 2012b; Wieder & Greka, 2016). Ein kurzzeitiger Anstieg des freien, zytosolischen Calciums aktiviert die „Ras homolog gene family member A“ (RhoA) Kinase. Diese Aktivierung stabilisiert durch die Bildung von Aktinfasern und FA das Aktinzytoskelett (L. Zhang et al., 2017). Eine dauerhafte Aktivierung der Calciumkanäle durch z.B. eine Gain-of-function-Mutation des TRPC6 kann dahingegen in einer fokalen segmentalen Glomerulosklerose (FSGS) enden (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005). Hieraus lässt sich ableiten, dass ein Gleichgewicht zwischen den Calciumtransportern und -rezeptoren essentiell ist.

Eine Störung des Aktinzytoskeletts führt zu einer Funktionseinschränkung der glomerulären Filtrationsbarriere. Klinisch entsteht eine Proteinurie. Diese tritt im Rahmen des pädiatrischen NS auf. Diese Erkrankung ist durch die Verschmelzung der podozytären Fußfortsätze (FP) gekennzeichnet und bedarf einer Glucocorticoidtherapie. In der Regel spricht die Erkrankung sehr gut auf diese Therapie an. Viele Patienten erleiden aber ein oder mehrere Rückfälle, die eine erneute Therapie notwendig machen. Gerade diese wiederholten Zyklen von Glucocorticoiden sind mit einer großen Rate an schwerwiegenden Nebenwirkungen assoziiert. Daher sind weitere Therapiemöglichkeiten alternativ zu Steroiden oder aber unterstützend, um die Steroiddosis zu reduzieren, dringend gesucht.

Ziel dieser Forschungsarbeit war, die Funktion des CaSR genauer zu untersuchen und seine Bedeutung für die Entstehung einer Proteinurie und sein Potential als therapeutisches Target

zu evaluieren. Hierfür sollte die Bedeutung des CaSR *in vitro* für die Ausbildung und Stabilität des Aktinzytoskeletts und für das Adhäsionsverhalten der Podozyten untersucht werden.

Dafür wurde ein Knockdown (KD) des CaSR in murinen Podozyten für die *in vitro* Betrachtungen und ein podozytärer CaSR KO (CaSR^{Δpod}) in BALB/c-Mäusen für die entsprechenden *in vivo* Versuche etabliert.

Es erfolgte die Charakterisierung von CaSR^{Δpod}-Mäusen unter physiologischen Bedingungen und im Rahmen eines experimentellen Podozytenschädigungsmodells, der ADR-Nephropathie. Zusätzlich wurde ein therapeutischer Ansatz durch die Gabe des Calcimimetikums Cinacalcet in diesem Schädigungsmodell untersucht. In einer klinischen Fallserie wurde ein Therapieversuch mit Cinacalcet bei Kindern mit einem NS durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1.1 Der CaSR-KD verhinderte den R-568 induzierten Calciumeinstrom in Podozyten.

Der Nachweis des erfolgreichen CaSR-KD in Podozyten erfolgte mittels Western Blot und funktionell mit der Messung der intrazellulären Calciumströme. Es konnte gezeigt werden, dass eine Stimulation mit R-568 zu einem Calciumeinstrom führt. Wie bereits beschrieben, ist dieser Vorgang in Podozyten von TRPC6 abhängig. Durch die Hemmung dieser Kanäle mit SKF-96365 wurde der R-568 induzierte Calciumeinstrom in den Kontrollzellen gestoppt. In CaSR-KD-Zellen führte die Stimulation mit R-568 zu keinem Einstrom von Calcium. Es ist bekannt, dass der CaSR und der TRPC6 abhängige Calciumeinstrom die RhoA-Signalkaskade aktiviert, die für die Stabilisierung des podozytären Aktinzytoskeletts von besonderer Bedeutung ist (L. Zhang et al., 2017). Die Stimulation des CaSR mit R-568 führte in den Kontrollzellen zu einem Anstieg des aktivierten RhoA im Verhältnis zum gesamten RhoA. Dies konnte für die CaSR-KD-Podozyten nicht gezeigt werden.

3.1.2 Der CaSR-KD bewirkte eine Reduktion der Aktinfasern und der fokalen Bindungsstellen (FBS) sowie eine verlangsamte Migration der Podozyten.

Eine Proteom-Analyse von CaSR-KD-Zellen zeigte erhebliche Veränderungen der gesamten Proteinexpression im Vergleich zu den Kontrollzellen. Insbesondere ergab sich in einer „gene ontology term“ (GO-Term) Analyse eine Reduktion von Komponenten, die an der Bildung der Basalmembran und der EZM beteiligt sind. Außerdem waren Proteine betroffen, welche die Zelladhäsion, -bewegung und -differenzierung beeinflussen. Diese Eigenschaften sind eng mit der Funktionalität des podozytären Aktinzytoskeletts verknüpft.

Zur Beurteilung dieses Aktinzytoskeletts in der Immunfluoreszenz wurden die Aktinfasern und das p-Paxillin, ein zentraler Bestandteil der fokalen Bindungsstellen (FBS), angefärbt. In den CaSR-KD-Podozyten stellte sich eine verringerte Anzahl der Aktinfasern dar. p-Paxillin lag in den CaSR-KD-Zellen vermindert vor. Darüber hinaus ließ sich eine reduzierte Migrationsgeschwindigkeit der CaSR-KD-Zellen nachweisen. Die CaSR abhängige Bewegung von Zellen wird über Integrine vermittelt (Tharmalingam et al., 2011). In den CaSR-KD-Podozyten zeigte sich eine verminderte Expression von ITB1. Die Expression des ITB3, einem weiteren wichtigen Integrin in Podozyten, war nicht verändert.

3.1.3 Der CaSR ist an der durch ADR verursachten Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts und an der Adhäsionsfähigkeit von Podozyten beteiligt.

ADR sorgt *in vitro* für eine Schädigung von Podozyten und führt zu einer Umstrukturierung des Aktinzytoskeletts. Durch die ADR-Gabe zeigte sich eine Umverteilung der Aktinfasern von zentral in die Randbereiche der Zellen. Eine Inkubation von ADR und R-568 verhinderte die Verlagerung der Aktinfasern in den Kontrollzellen. In den CaSR-KD-Podozyten führte eine ADR-Gabe nicht zu der in den Kontrollzellen beobachteten Veränderung. Vermutlich ist der CaSR an dieser ADR induzierten Veränderung, die eine Art Kompensationsmechanismus sein könnte, beteiligt.

Um die Funktionalität der FBS zu untersuchen, wurde ein „Adhesion Assay“ durchgeführt. Die CaSR-KD-Zellen zeigten hier eine langsamere Adhäsion. Die Gabe von ADR führte in beiden Versuchsgruppen zu einer reduzierten Adhäsion der Zellen. R-568 konnte den schädigenden Einfluss von ADR in den Kontrollzellen, aber nicht in den CaSR-KD-Zellen, reduzieren, was durch einen Anstieg der adhärennten Zellen belegt wurde.

3.1.4 In der ADR induzierten Glomerulonephritis zeigte sich eine vermehrte podozytäre CaSR-Expression.

Um den Einfluss einer Proteinurie besser verstehen zu können, wurde das experimentelle Schädigungsmodell der ADR-Nephropathie verwendet. Hierbei werden in der Maus die Podozyten relativ spezifisch geschädigt und eine Proteinurie verursacht, die in einer Glomerulosklerose, einer tubulointerstitiellen Inflammation und Fibrose endet. Das injizierte ADR verursacht eine FSGS ähnliche Schädigung.

In den verwendeten BALB/c-Mäusen zeichnete sich nach 7 Tagen (t) der durch ADR hervorgerufene Podozytenschaden durch das Auftreten einer Proteinurie ab. In isolierten Glomeruli konnte ein 3-6facher Anstieg der CaSR-Expression nach ADR-Gabe berechnet werden. Zusätzliche Färbungen mit den Podozyten- und Endothelmarkern Synaptopodin und Endomucin stellten einen deutlichen Expressionsanstieg des CaSR in den Podozyten dar.

Auch in Bereichen des Mesangiums und in frühen fibrotischen Läsionen konnte ein verstärktes CaSR-Signal nachgewiesen werden.

3.1.5 CaSR^{Δpod}-Mäuse zeigten keine Proteinurie.

Um die Funktion des murinen, podozytären CaSR *in vivo* zu untersuchen, wurde ein podozyten-spezifischer CaSR KO (CaSR^{Δpod}) in BALB/c-Mäusen etabliert. Mit Hilfe der Immunfluoreszenz konnte die fehlende Expression des CaSR in Podozyten bei vorhandener Expression in den Tubuli bestätigt werden. Die CaSR^{Δpod}-Mäuse zeigten während ihres ersten Lebensjahres weder histologische noch phänotypische Veränderungen. Die Breite der FP wurde durch digitale Quantifizierung der Schlitzmembrandichte „filtration slit density“ (FSD) (Siegerist et al., 2017) in Nephrin gefärbten Nieren berechnet und wiesen keine Unterschiede zwischen den Untersuchungsgruppen auf.

3.1.6 Der podozytäre CaSR^{Δpod} verstärkte die ADR induzierte Glomerulopathie.

Nach Injektion von ADR entwickelten die CaSR^{Δpod}- und die Kontrolltiere eine Proteinurie. Das Ausmaß der Proteinurie war in den CaSR^{Δpod}-Mäusen allerdings dreifach höher als in der Kontrollgruppe. Korrespondierend dazu führte ADR zu einer Reduktion der FP-Breite, die für eine Entwicklung eines FP Verlustes spricht. Diese Reduktion war in den CaSR^{Δpod}-Tieren deutlich ausgeprägter als in der Kontrollgruppe.

Beide Gruppen zeigten durch die Behandlung mit ADR eine verminderte Podozytenanzahl. Hier konnten nach 8 Tagen in den CaSR^{Δpod}-Mäusen deutlich weniger Podozyten in der vorgegebenen Fläche ausgezählt werden. Die Gabe von ADR führte in beiden Gruppen zu sklerotisch veränderten Läsionen an Tag 12, die sich in den CaSR^{Δpod}-Mäusen verstärkt darstellten.

3.1.7 Die Aktivierung des CaSR minimierte die ADR induzierte Albuminurie lediglich im WT.

Wie bereits in der Literatur beschrieben führt die Stimulation des CaSR zu einer Reduktion der Proteinurie in diversen Nierenschädigungsmodellen (Gut et al., 2013; Oh et al., 2011; Piecha et al., 2008) und zu einer Stabilisierung des podozytären Aktinzytoskeletts *in vitro*. Aus diesem Grund wurde der Effekt einer zeitgleichen Applikation von ADR und Cinacalcet, einem CaSR-Stimulans, in Kontroll- und CaSR^{Δpod}-Tieren untersucht. Die simultane Gabe führte zu einer Reduktion der Proteinurie an t 10 und t 12 in den Kontrolltieren. Eine Verminderung der Proteinurie wurde in den CaSR^{Δpod}-Mäusen nach Cinacalcet- und ADR-Gabe nicht beobachtet.

Die protektive Wirkung des Calcimimetikums im Rahmen der ADR induzierten Proteinurie lässt sich daher auf den CaSR im Podozyten zurückführen.

3.1.8 Die Aktivierung des CaSR minimierte die Proteinurie des NS.

Aufgrund der experimentellen Ergebnisse und der Hinweise darauf, dass die Stimulation des CaSR protektiv in Podozyten zu wirken scheint, entschied man sich die Wirksamkeit von Cinacalcet im Rahmen eines NS zu testen. Cinacalcet ist bisher für die Behandlung eines sekundären Hyperparathyreodismus zugelassen und mit relativ wenigen Nebenwirkungen assoziiert. Beim idiopathischen NS im Kindesalter sind vor allem Podozyten von der Erkrankung betroffen. Kinder mit idiopathischem NS, deren Eltern die Glucocorticoidtherapie ablehnten, wurden nach ausführlicher Aufklärung und Zustimmung der Eltern mit Cinacalcet behandelt. Aus Sicherheitsgründen bekam Patient 1 nur eine Dosis des Calcimimetikums. Die weiteren Patienten 2, 3 und 4 wurden mit einer steigenden Dosis bis zum Eintreten der Remission behandelt. Patient 1 zeigte bereits eine 60%ige Reduktion des renalen Eiweißverlustes. Nach 6 bis 13 Tagen wiesen die Patienten 2, 3 und 4 ebenfalls eine signifikante Reduktion der Proteinurie auf. Ödeme, die auf Grund des erhöhten Eiweißverlustes über die Nieren auftraten, reduzierten sich und es zeigte sich ein Anstieg des Serumalbumins. Die Patienten 2, 3 und 4 erkrankten im Verlauf an leichten viralen Infektionen, welche jeweils an t 10, 19 und 23 mit einem Rückfall der Erkrankung und dem erneuten Auftreten der Proteinurie assoziiert waren. Diese führten zum Abbruch der Cinacalcettherapie und dem Beginn der Standard-Glucocorticoidtherapie. Alle Patienten erreichten eine komplette Remission nach 7 bis 20 Tagen. Keiner der 4 Patienten wies Nebenwirkungen der Cinacalcettherapie auf.

4 Diskussion

Die Studie zeigt die bedeutende Rolle des CaSR für die Regulierung des podozytären Aktinzytoskeletts, der Adhäsion und der Widerstandsfähigkeit gegenüber schädlichen Substanzen.

Die Behandlung mit ADR ist ein bewährtes Modell für die Untersuchung einer podozytären Erkrankung, da hauptsächlich die Podozyten geschädigt werden und in einem Verlust von FP endet. Das Modell zeigt gerade in der Frühphase der Proteinurie Parallelen zum NS bei Kindern. Das pädiatrische NS ist in der Regel durch eine unauffällige lichtmikroskopische Untersuchung der Nierenbiopsie und einer Verschmelzung der FP in der elektronenmikroskopischen Untersuchung gekennzeichnet. Darüber hinaus treten bei der ADR-

Nephropathie im Verlauf sklerotische Läsionen auf, die der FSGS ähneln. Das NS wird primär mit Glucocorticoiden therapiert. In den meisten Fällen zeigt sich ein gutes Ansprechen auf die Therapie, es kommt jedoch zu zahlreichen Rückfällen der Erkrankung. In einzelnen Fällen ist die Steroidtherapie jedoch unwirksam, so dass sich die Erkrankung in eine FSGS entwickelt, was neue therapeutische Ansätze erfordert.

Die kritische Rolle der podozytären Calciumhomöostase ist in der Literatur vielfach beschrieben (Campbell, 1987). In der Nebenschilddrüse und im Tubulussystem der Niere sorgt der CaSR für die Aufrechterhaltung des systemischen Calciumgleichgewichts. Der podozytäre CaSR hingegen reguliert am ehesten die intrazelluläre Calciumbalance und beeinflusst somit das dynamische podozytäre Aktinzytoskelett, das wiederum für die Funktionalität der glomerulären Filtrationsbarriere erforderlich ist. Der durch CaSR aktivierte TRPC6 steigert in Podozyten die intrazelluläre Calciumkonzentration, beeinflusst Signalwege und reguliert damit auch das podozytäre Aktinzytoskelett (Tian et al., 2010). Mutationen dieses Kanals verändern das zelluläre Calciumgleichgewicht und führen zu schwerwiegenden podozytären Schäden, Proteinurie und fortschreitender Glomerulosklerose (Reiser et al., 2005; Winn et al., 2005).

Um die Rolle des CaSR in der podozytären Calciumhomöostase besser nachvollziehen und ein potentiell neues therapeutisches Ziel zur Therapie einer Proteinurie definieren zu können, wurde ein CaSR-KD in kultivierten Podozyten generiert. Dadurch kam der R-568 induzierte Calciumeinstrom in diesen Zellen zum Erliegen, was die funktionelle Relevanz des CaSR-KD und die bereits beschriebene Beteiligung des Rezeptors am Calciumeinstrom bestätigt.

Zudem ist bekannt, dass der durch eine Stimulation des CaSR ausgelöste Calciumeinstrom zu einer Aktivierung von TRPC6 führt. Dieser spezifische Calciumkanal führt wiederum zu einer RhoA-Aktivierung, was unter anderem eine Stabilisierung des Aktinzytoskeletts zur Folge hat (Reiser et al., 2005; Tian et al., 2010; L. Zhang et al., 2017). Diese Signalkette konnten wir in den vorliegenden Untersuchungsergebnissen bestätigen. Durch die Hemmung des TRPC6 blieb der podozytäre Calciumeinstrom aus. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die CaSR-KD-Zellen eine verminderte RhoA-Aktivierung aufwiesen. RhoA ist durch die Bildung der Aktinfasern und FBS an der Stabilisierung des Aktinzytoskeletts beteiligt (Tian et al., 2010; Yang et al., 2013). Dadurch lässt sich auch das verändert aufgebaute Zytoskelett der CaSR-KD-Zellen erklären.

Ein Gleichgewicht zwischen dem stationären und beweglichen Phänotyp der Zellen ist für die podozytäre Funktion notwendig (Blattner et al., 2013; Brahler et al., 2016; Endlich et al., 2014; Gee et al., 2013; Hackl et al., 2013; Reiser et al., 2004; Scott et al., 2012; Shibata et al., 2008). In Proteomanalysen wurden diverse Proteine dargestellt, die durch den CaSR-KD beeinflusst

wurden und unter anderem in Funktionen wie Adhäsion, Beweglichkeit und der Interaktion der EZM involviert sind. Diese Erkenntnisse konnten mit weiteren funktionellen Untersuchungen verknüpft werden. Es konnte gezeigt werden, dass die Migration der CaSR-KD-Podozyten verlangsamt ist. Ein Grund hierfür könnte sein, dass die CaSR-KD-Zellen langsamer funktionelle FBS ausbilden und sich damit langsamer fortbewegen können.

Integrine verankern die Zelle nicht nur mechanisch an die EZM, sondern regulieren auch deren Anheftung und agieren als bidirektionaler Vermittler in den FBS (Hynes, 2002). Besonders ITB1 besitzt eine Schlüsselrolle in der Beweglichkeit und Fortbewegung der Zellen. Dies wurde zuvor in invasiv wachsenden Tumorzellen beschrieben. Der CaSR interagiert mit ITB1 und moduliert darüber die Zelladhäsion und -migration (Tharmalingam et al., 2011). Unsere Ergebnisse zeigten eine reduzierte Expression des ITB1 in CaSR-KD-Podozyten. Der zuvor beschriebene Zusammenhang könnte die reduzierte Migationskapazität dieser Zellen ergänzend erklären. All diese Veränderungen heben die besondere Bedeutung dieses Rezeptors hervor.

In der ADR-Glomerulonephritis stellte sich in den BALB/c-Mäusen eine vermehrte Expression des CaSR dar. Diese Induktion konnte sowohl auf mRNA-Ebene als auch in Nierenschnitten innerhalb der Glomeruli gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre eine verstärkte Reaktion infolge der ADR-Schädigung und ein möglicher Kompensationsmechanismus als Antwort auf den podozytären Stress.

Unter physiologischen Bedingungen zeigten die CaSR^{Δpod}-Mäuse keine morphologischen oder funktionellen Veränderungen in der Niere. Der Verlust des Rezeptors scheint demnach durch andere, bisher noch nicht geklärte Mechanismen kompensiert zu werden. Allerdings war das Ausmaß des glomerulären Schadens in den CaSR^{Δpod}-Tieren nach ADR-Injektion deutlich ausgeprägter. Die Tiere zeigten einen höheren und früheren Anstieg der Proteinurie und einen vermehrten Verlust der Podozyten. Daraus resultierte ein erhöhter sklerotischer Schaden. Der KO scheint die Tiere anfälliger gegenüber einer podozytären Schädigung zu machen. Diese Anzeichen sind außerdem durch die Anzahl der Podozyten und das Ausmaß der Glomerulosklerose belegt.

In anderen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass R-568 die Proteinurie in Ratten im Rahmen einer PAN induzierten Nephropathie reduziert. Auch in den mit ADR behandelten Tieren wirkte Cinacalcet protektiv und reduzierte die Proteinurie. Wie zu erwarten war, ergab sich keine Veränderung der Schädigung in den CaSR^{Δpod}-Tieren, was erneut bestätigt, dass eine Stimulation des podozytären nicht aber des ubiquitär exprimierten CaSR die Nierenschädigung reduzieren kann.

Vorarbeiten und die Ergebnisse dieser Studie demonstrieren eine Schlüsselrolle des renalen CaSR in glomerulären, proteinurischen Erkrankungen. Die dafür zugrundeliegenden Mechanismen sind bisher nur teilweise geklärt. Die Untersuchung der Interaktion zwischen dem tubulären CaSR und dem tubulär-glomerulären Feedbacksystem benötigt daher einen weiteren Forschungsaufwand.

Zusätzlich zu unseren experimentellen Ergebnissen konnten erste Belege gesammelt werden, dass der podozytäre CaSR bei Patienten mit einem NS als therapeutisches Ziel eine Rolle spielen könnte. Ein Zeichen des primären, idiopathischen NS ist die Verschmelzung der FP (Vivarelli, Massella, Ruggiero, & Emma, 2017). In den meisten Fällen wird durch die Prednisolontherapie eine komplette Remission erreicht. Rückfälle treten dabei aber bei einem Großteil der Patienten auf. Mit der Prednisolontherapie sind starke Nebenwirkungen verbunden, so dass gerade bei Patienten mit häufigen Rezidiven eine Zweitlinientherapie mit dem Einsparen von Glucocorticoiden zum Einsatz kommt. Hierzu werden Calcineurin-Hemmstoffe und das Mycophenolat Mofetil seit Jahren erfolgreich eingesetzt, zeigen aber auch starke Nebenwirkungen. Auf der Suche nach alternativen Therapieansätzen und auf der Grundlage der vorgestellten Ergebnisse kam Cinacalcet als Off-Label-Therapie in der Primärtherapie bei 4 Patienten zum Einsatz. Alle 4 Patienten zeigten eine rückläufige Albuminurie, einen Anstieg des Serumalbumins und eine klinische Remission der Ödeme. Ein Rückfall der Erkrankung und der Wiederanstieg der Albuminurie, der wahrscheinlich durch virale Infektionen ausgelöst wurde, legen nahe, dass die Behandlung mit Cinacalcet die podozytäre Funktion zwar stabilisiert, die immunologischen Interaktionen hingegen unbeeinflusst bleiben. In diesem Zusammenhang sind bereits verschiedene immunologische Wechselwirkungen beschrieben, die zu Veränderungen der podozytären FP und dem Entstehen einer Proteinurie führen können (Vivarelli et al., 2017).

Andere potentielle Mechanismen, die den antiproteinurischen Effekt der Calcimimetika erklären, könnten auf hämodynamische (Odenwald et al., 2006; T. Zhang et al., 2019) und immunmodulatorische (Klein, Castro, & Garofalo, 2016) Effekte beruhen. Trotzdem müssen natürlich die vermuteten positiven Wirkungen der Calcimimetika gegen die möglichen Nebenwirkungen bei Einnahme dieser Medikamentengruppe abgewogen werden. Weitere klinische Studien sind hierfür erforderlich.

Aus unseren Ergebnissen kann man aber dennoch ableiten, dass Calcimimetika als eine vielversprechende Alternative zur unterstützenden und Glukortikoid einsparenden Therapie für Patienten mit NS gelten können. Eine weitere Validierung mit aussagekräftigen, randomisierten prospektiven Studien ist jedoch für eine abschließende Beurteilung elementar. Inwiefern der antiproteinurische Effekt des aktivierten CaSR auch bei anderen glomerulären, proteinurischen Erkrankungen wirkt, bleibt offen.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der podozytäre CaSR sowohl das Aktinzytoskelett als auch die FBS in Podozyten stabilisiert. Der CaSR ist für die physiologische Zellanheftung erforderlich und schützt vor einer toxinbedingten Proteinurie, Podozytenverlust und Glomerulosklerose. Der antiproteinurische Effekt im NS der Kinder, hervorgerufen durch die Stimulation des CaSR, legt eine Modulation der podozytären Calciumhomöostase nahe und bildet einen vielversprechenden und innovativen Ansatz zur Behandlung glomerulärer Erkrankungen.

Das Editorial „Should we consider calcimimetics as a therapeutic option for nephrotic syndrome“ von Lenoir und Tharaux, 2022, als erste Reaktion auf die zugrundeliegende Arbeit zeigte, dass es uns gelungen ist, die protektiven Mechanismen der Aktivierung des CaSR darzustellen. Des Weiteren bringen sie zustimmend hervor, wie vielversprechend die Anwendung von Calcimimetika in der Behandlung des NS sein könnte. Zudem wird durch die Autoren beleuchtet, welche Forschungsfragen offen bleiben und welche Ansatzpunkte in Zukunft betrachtet werden müssen, um die Interaktionen und Auswirkungen des CaSR noch besser verstehen zu können (Lenoir & Tharaux, 2022).

5 Abkürzungsverzeichnis

CaSR	Calcium-sensitive Rezeptor
EZM	Extrazelluläre Matrix
FA	Fokale Adhäsion
FAK	Fokale Adhäsionskinase
FBS	Fokale Bindungsstelle
FP	Fußfortsätze
FSD	Filtration Slit Density
FSGS	Fokale segmentale Glomerulosklerose
GBM	Glomeruläre Basalmembran
GO-Term	Gene ontology term
KD	Knockdown
KO	Knockout
PAN	Puromycin-Aminonukleosid
PTH	Parathormon
RhoA	Ras homolog gene family member A
t	Tag
TRPC6	Transient receptor potential cation channel 6

6 Literaturverzeichnis

- Albiges-Rizo, C., Destaing, O., Fourcade, B., Planus, E., & Block, M. R. (2009). Actin machinery and mechanosensitivity in invadopodia, podosomes and focal adhesions. *J Cell Sci*, 122(Pt 17), 3037-3049. doi:10.1242/jcs.052704
- Alfadda, T. I., Saleh, A. M., Houillier, P., & Geibel, J. P. (2014). Calcium-sensing receptor 20 years later. *Am J Physiol Cell Physiol*, 307(3), C221-231. doi:10.1152/ajpcell.00139.2014
- AMGEN. (2020, Januar). Fachinformation (Zusammenfassung der Merkmale des Arzneimittels)
Retrieved from <https://arzneimittel-cdn.amboss.com/Fachinformation/96045.pdf>
- Blattner, S. M., Hodgins, J. B., Nishio, M., Wylie, S. A., Saha, J., Soofi, A. A., . . . Kretzler, M. (2013). Divergent functions of the Rho GTPases Rac1 and Cdc42 in podocyte injury. *Kidney Int*, 84(5), 920-930. doi:10.1038/ki.2013.175
- Brahler, S., Yu, H., Suleiman, H., Krishnan, G. M., Saunders, B. T., Kopp, J. B., . . . Shaw, A. S. (2016). Intravital and Kidney Slice Imaging of Podocyte Membrane Dynamics. *J Am Soc Nephrol*, 27(11), 3285-3290. doi:10.1681/ASN.2015121303
- Brown, E. M., & MacLeod, R. J. (2001). Extracellular calcium sensing and extracellular calcium signaling. *Physiol Rev*, 81(1), 239-297. doi:10.1152/physrev.2001.81.1.239
- Campbell, A. K. (1987). Intracellular calcium: friend or foe? *Clin Sci (Lond)*, 72(1), 1-10. doi:10.1042/cs0720001
- Endlich, N., Simon, O., Gopferich, A., Wegner, H., Moeller, M. J., Rumpel, E., . . . Endlich, K. (2014). Two-photon microscopy reveals stationary podocytes in living zebrafish larvae. *J Am Soc Nephrol*, 25(4), 681-686. doi:10.1681/ASN.2013020178
- Gee, H. Y., Saisawat, P., Ashraf, S., Hurd, T. W., Vega-Warner, V., Fang, H., . . . Hildebrandt, F. (2013). ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest*, 123(8), 3243-3253. doi:10.1172/JCI69134
- Greka, A., & Mundel, P. (2012a). Calcium regulates podocyte actin dynamics. *Semin Nephrol*, 32(4), 319-326. doi:10.1016/j.semnephrol.2012.06.003
- Greka, A., & Mundel, P. (2012b). Cell biology and pathology of podocytes. *Annu Rev Physiol*, 74, 299-323. doi:10.1146/annurev-physiol-020911-153238

- Gut, N., Piecha, G., Pradel, A., Geldyyev, A., Potemkina, A., Ritz, E., . . . Gross-Weissmann, M. L. (2013). The calcimimetic R-568 prevents podocyte loss in uninephrectomized ApoE^{-/-} mice. *Am J Physiol Renal Physiol*, 305(3), F277-285. doi:10.1152/ajprenal.00514.2012
- Hackl, M. J., Burford, J. L., Villanueva, K., Lam, L., Susztak, K., Schermer, B., . . . Peti-Peterdi, J. (2013). Tracking the fate of glomerular epithelial cells in vivo using serial multiphoton imaging in new mouse models with fluorescent lineage tags. *Nat Med*, 19(12), 1661-1666. doi:10.1038/nm.3405
- Harburger, D. S., & Calderwood, D. A. (2009). Integrin signalling at a glance. *J Cell Sci*, 122(Pt 2), 159-163. doi:10.1242/jcs.018093
- Hendy, G. N., D'Souza-Li, L., Yang, B., Canaff, L., & Cole, D. E. (2000). Mutations of the calcium-sensing receptor (CASR) in familial hypocalciuric hypercalcemia, neonatal severe hyperparathyroidism, and autosomal dominant hypocalcemia. *Hum Mutat*, 16(4), 281-296. doi:10.1002/1098-1004(200010)16:4<281::AID-HUMU1>3.0.CO;2-A
- Hynes, R. O. (2002). Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*, 110(6), 673-687. doi:10.1016/s0092-8674(02)00971-6
- Kistler, A. D., Singh, G., Altintas, M. M., Yu, H., Fernandez, I. C., Gu, C., . . . Reiser, J. (2013). Transient receptor potential channel 6 (TRPC6) protects podocytes during complement-mediated glomerular disease. *J Biol Chem*, 288(51), 36598-36609. doi:10.1074/jbc.M113.488122
- Klein, G. L., Castro, S. M., & Garofalo, R. P. (2016). The calcium-sensing receptor as a mediator of inflammation. *Semin Cell Dev Biol*, 49, 52-56. doi:10.1016/j.semcd.2015.08.006
- Lenoir, O., & Tharaux, P. L. (2022). Should we consider calcimimetics as a therapeutic option for nephrotic syndrome? *Kidney Int*, 101(6), 1110-1112. doi:10.1016/j.kint.2022.04.008
- Magno, A. L., Ward, B. K., & Ratajczak, T. (2011). The calcium-sensing receptor: a molecular perspective. *Endocr Rev*, 32(1), 3-30. doi:10.1210/er.2009-0043
- Odenwald, T., Nakagawa, K., Hadtstein, C., Roesch, F., Gohlke, P., Ritz, E., . . . Schmitt, C. P. (2006). Acute blood pressure effects and chronic hypotensive action of calcimimetics in uremic rats. *J Am Soc Nephrol*, 17(3), 655-662. doi:10.1681/ASN.2005090914

- Oh, J., Beckmann, J., Bloch, J., Hettgen, V., Mueller, J., Li, L., . . . Schmitt, C. P. (2011). Stimulation of the calcium-sensing receptor stabilizes the podocyte cytoskeleton, improves cell survival, and reduces toxin-induced glomerulosclerosis. *Kidney Int*, 80(5), 483-492. doi:10.1038/ki.2011.105
- Piecha, G., Kokeny, G., Nakagawa, K., Koleganova, N., Geldyyev, A., Berger, I., . . . Gross, M. L. (2008). Calcimimetic R-568 or calcitriol: equally beneficial on progression of renal damage in subtotal nephrectomized rats. *Am J Physiol Renal Physiol*, 294(4), F748-757. doi:10.1152/ajprenal.00220.2007
- Pollak, M. R., Brown, E. M., Estep, H. L., McLaine, P. N., Kifor, O., Park, J., . . . Seidman, J. G. (1994). Autosomal dominant hypocalcaemia caused by a Ca(2+)-sensing receptor gene mutation. *Nat Genet*, 8(3), 303-307. doi:10.1038/ng1194-303
- Rastaldi, M. P. (2011). Calcium sensing in podocytes. *Kidney Int*, 80(5), 445-447. doi:10.1038/ki.2011.168
- Reiser, J., Oh, J., Shirato, I., Asanuma, K., Hug, A., Mundel, T. M., . . . Mundel, P. (2004). Podocyte migration during nephrotic syndrome requires a coordinated interplay between cathepsin L and alpha3 integrin. *J Biol Chem*, 279(33), 34827-34832. doi:10.1074/jbc.M401973200
- Reiser, J., Polu, K. R., Moller, C. C., Kenlan, P., Altintas, M. M., Wei, C., . . . Pollak, M. R. (2005). TRPC6 is a glomerular slit diaphragm-associated channel required for normal renal function. *Nat Genet*, 37(7), 739-744. doi:10.1038/ng1592
- Schell, C., & Huber, T. B. (2017). The Evolving Complexity of the Podocyte Cytoskeleton. *J Am Soc Nephrol*, 28(11), 3166-3174. doi:10.1681/ASN.2017020143
- Schell, C., Rogg, M., Suhm, M., Helmstadter, M., Sellung, D., Yasuda-Yamahara, M., . . . Huber, T. B. (2017). The FERM protein EPB41L5 regulates actomyosin contractility and focal adhesion formation to maintain the kidney filtration barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 114(23), E4621-E4630. doi:10.1073/pnas.1617004114
- Schell, C., Sabass, B., Helmstaedter, M., Geist, F., Abed, A., Yasuda-Yamahara, M., . . . Huber, T. B. (2018). ARP3 Controls the Podocyte Architecture at the Kidney Filtration Barrier. *Dev Cell*, 47(6), 741-757 e748. doi:10.1016/j.devcel.2018.11.011
- Scott, R. P., Hawley, S. P., Ruston, J., Du, J., Brakebusch, C., Jones, N., & Pawson, T. (2012). Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy. *J Am Soc Nephrol*, 23(7), 1149-1154. doi:10.1681/ASN.2011121206

- Sever, S., & Schiffer, M. (2018). Actin dynamics at focal adhesions: a common endpoint and putative therapeutic target for proteinuric kidney diseases. *Kidney Int*, 93(6), 1298-1307. doi:10.1016/j.kint.2017.12.028
- Shibata, S., Nagase, M., Yoshida, S., Kawarazaki, W., Kurihara, H., Tanaka, H., . . . Fujita, T. (2008). Modification of mineralocorticoid receptor function by Rac1 GTPase: implication in proteinuric kidney disease. *Nat Med*, 14(12), 1370-1376. doi:10.1038/nm.1879
- Siegerist, F., Ribback, S., Dombrowski, F., Amann, K., Zimmermann, U., Endlich, K., & Endlich, N. (2017). Structured illumination microscopy and automatized image processing as a rapid diagnostic tool for podocyte effacement. *Sci Rep*, 7(1), 11473. doi:10.1038/s41598-017-11553-x
- Tharmalingam, S., Daulat, A. M., Antflick, J. E., Ahmed, S. M., Nemeth, E. F., Angers, S., . . . Hampson, D. R. (2011). Calcium-sensing receptor modulates cell adhesion and migration via integrins. *J Biol Chem*, 286(47), 40922-40933. doi:10.1074/jbc.M111.265454
- Tian, D., Jacobo, S. M., Billing, D., Rozkalne, A., Gage, S. D., Anagnostou, T., . . . Greka, A. (2010). Antagonistic regulation of actin dynamics and cell motility by TRPC5 and TRPC6 channels. *Sci Signal*, 3(145), ra77. doi:10.1126/scisignal.2001200
- Vivarelli, M., Massella, L., Ruggiero, B., & Emma, F. (2017). Minimal Change Disease. *Clin J Am Soc Nephrol*, 12(2), 332-345. doi:10.2215/CJN.05000516
- Wieder, N., & Greka, A. (2016). Calcium, TRPC channels, and regulation of the actin cytoskeleton in podocytes: towards a future of targeted therapies. *Pediatr Nephrol*, 31(7), 1047-1054. doi:10.1007/s00467-015-3224-1
- Winn, M. P., Conlon, P. J., Lynn, K. L., Farrington, M. K., Creazzo, T., Hawkins, A. F., . . . Rosenberg, P. B. (2005). A mutation in the TRPC6 cation channel causes familial focal segmental glomerulosclerosis. *Science*, 308(5729), 1801-1804. doi:10.1126/science.1106215
- Yang, H., Zhao, B., Liao, C., Zhang, R., Meng, K., Xu, J., & Jiao, J. (2013). High glucose-induced apoptosis in cultured podocytes involves TRPC6-dependent calcium entry via the RhoA/ROCK pathway. *Biochem Biophys Res Commun*, 434(2), 394-400. doi:10.1016/j.bbrc.2013.03.087

Zhang, L., Ji, T., Wang, Q., Meng, K., Zhang, R., Yang, H., . . . Jiao, J. (2017). Calcium-Sensing Receptor Stimulation in Cultured Glomerular Podocytes Induces TRPC6-Dependent Calcium Entry and RhoA Activation. *Cell Physiol Biochem*, 43(5), 1777-1789. doi:10.1159/000484064

Zhang, T., Tang, N., Xi, D., Zhao, Y., Liu, Y., Wang, L., . . . He, F. (2019). Calcimimetic R568 improved cardiac remodeling by classic and novel renin-angiotensin system in spontaneously hypertensive rats. *Exp Biol Med (Maywood)*, 244(10), 789-801. doi:10.1177/1535370219854325

7 Zusammenfassung

Calcimimetika erhöhen die Sensitivität des Calcium-sensitiven Rezeptors (CaSR), der im Tubulussystem der Nieren und geringfügig in Podozyten exprimiert wird. Die CaSR-Aktivierung kann die Entstehung einer Proteinurie und den damit verbundenen strukturellen Schaden minimieren. Um die genaue Funktion des CaSR zu untersuchen, wurde ein Knockdown (KD) in murinen Podozyten sowie ein podozytenspezifischer CaSR-Knockout (CaSR^{Δpod}) in Mäusen generiert. Die CaSR-KD-Podozyten wiesen strukturelle und funktionelle Unterschiede auf. Bei BALB/c-Mäusen führte die Adriamycin (ADR)-Gabe zu einer Induktion der CaSR-Expression. ADR behandelte CaSR^{Δpod}-Mäuse zeigten eine Steigerung der Proteinurie, des Podozytenverlustes und der Glomerulosklerose sowie eine wachsende Verschmelzung der Fußfortsätze im Vergleich zu ADR behandelten Kontrolltieren. Durch die simultane Gabe von ADR und dem Calcimimetikum Cinacalcet konnte der schädigende Effekt des ADR in der Kontrollgruppe minimiert werden. Dieser Proteinurie reduzierende Effekt konnte in CaSR^{Δpod}-Tieren nicht nachgewiesen werden. Außerdem wurden 4 Patienten mit einem nephrotischen Syndrom (NS) mit Cinacalcet behandelt. Hierbei zeigte sich ein vorübergehender Rückgang der Proteinurie von bis zu 96% und ein Rückgang der Ödeme. Die Aktivierung des CaSR spielt in der Regulation der podozytären Funktion *in vitro* eine bedeutende Rolle. Die Aktivierung des Rezeptors in Podozyten reduzierte die durch Toxine entstandene Proteinurie sowie den glomerulären Schaden. Die Studie belegt damit ein mögliches Potenzial des CaSR in der Regulation glomerulärer Erkrankungen.

8 Summary

Calcimimetika, like R-568 or Cinacalcet enhance the CaSR's sensitivity which is expressed in the renal tubule system and to a little extend in the podocytes. The receptor's activation can reduce the development of a proteinuria and the resulting histological changes. The precise role of the CaSR is still unclear. To analyze its function, a CaSR KD in podocytes and a podocyte specific CaSR KO (CaSR^{Δpod}) in mice was generated. In CaSR-KD-podocytes the R-568 mediated Calcium-influx could not be measured. These cells also showed a disrupted cytoskeleton, reduced adhesion and slower migration. After ADR injection BALB/c-mice showed an increased CaSR expression. The CaSR^{Δpod}-mice presented a higher proteinuria, more foot process effacement, podocytes loss and glomerulosclerosis after ADR exposition compared to ADR treated littermate controls. The application of ADR and the calcimimetic Cinacalcet reduced the injury in the control group. 4 patients with NS objecting glucocorticoid therapy were treated with Cinacalcet for 1-33 days. They showed a reduction of proteinuria and edema. In summary the CaSR seems to play an important role regulating the podocyte function *in vivo*. In mice the activation of the podocyte CaSR reduces the toxin induced proteinuria and glomerular injury. Our study shows the potential of the CaSR in the regulation of glomerular diseases.

9 Erklärung des Eigenanteils

Die Arbeit wurde größtenteils im Labor der pädiatrischen Nephrologie der Kinderklinik des Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf durchgeführt. Der Leitgedanke wurde von Dr. A. Mühlig PhD, Prof. Dr. J. Oh und in Kooperation mit Prof. Dr. C. P Schmitt, Universität Heidelberg, entwickelt.

Dank Prof. Dr. Hoon Young Choi und Prof. Dr. Beom Jin Lim konnten wir auf die CaSR-KD-Podozyten zurückgreifen. Dr. M. Weiß und Prof. Dr. Dr. Andreas H. Guse führten die Calciummessungen in den Podozyten durch.

Die Generierung der CaSR^{Apod}-Mäuse erfolgte durch PD Dr. I. Hermans-Borgmeyer. Prof Dr. V. Puelles und Prof. Dr. C. Meyer-Schwesinger unterstützten uns mit ihrer Expertise bei den immunhistologischen Färbungen. Prof. Dr. N. Endlich und K. Bracke wirkten bei dieser Studie mit der Durchführung der PEMP-Färbungen mit. Im Labor standen uns H. Heidelberg, M. Wingerath und Dr. W. Sachs tatkräftig zur Seite. Dr. F. Braun, Dr. M. Lassé, Prof. Dr. M. Rinschen und Prof. Dr. T. Huber unterstützen in der Entwicklung, Ausführung und Auswertung der durchgeführten Experimente. PD Dr. C. Patry, Prof. Dr. G. F. Hoffmann und Prof. Dr. C.P. Schmitt lieferten mit den klinischen Daten ihren Beitrag zu unserer gemeinsamen Studie.

Seit 2015 unterstütze ich das Labor der pädiatrischen Nephrologie unter der Leitung von Prof. Dr. J. Oh als wissenschaftliche Mitarbeiterin und medizinische Doktorandin. Für die hier vorliegende Studie führte ich größtenteils die Zellkulturexperimente durch. Zusammen mit meiner Betreuerin Dr. A. Mühlig PhD tätigten wir die *in vivo* Experimente. Für die Auswertung, Zusammenstellung aller Daten und das Verfassen dieser Studie war ich gemeinsam mit Dr. A. Mühlig zuständig. Diese Publikation konnte nach Korrektur aller Mitwirkenden am 07.03.2022 in dem Journal „Kidney International“ veröffentlicht werden.

10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen Beteiligten bedanken, die mich während der Fertigstellung dieser Promotion begleitet haben.

Mein besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jun Oh für die unermüdliche Unterstützung und exzellente Betreuung. Durch ihn erhielt ich die Möglichkeit, in diesem spannenden Forschungsthema meine Dissertation zu schreiben.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Ania Muntau danken, dass ich in Ihrer Abteilung für Kinder- und Jugendmedizin promovieren durfte.

Mein spezieller Dank gilt meiner Betreuerin, Dr. med. Anne Mühlig PhD. Sie stand mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite. Für Ihre stetige Hilfsbereitschaft und große Diskussionsbereitschaft möchte ich mich ganz besonders bedanken.

Ich bedanke mich zudem bei PD Dr. Irm Hermans-Borgmeyer, die die CaSR^{Δpod}-Mäuse generiert hat und bei Prof. Dr. Schmitt für die Durchführung der klinischen Untersuchungen.

Einen weiteren besonderen Dank möchte ich unserer kleinen Laborgruppe widmen. Zusammen haben wir vieles erreicht und sind ein starkes Team geworden. Hier möchte ich besonders Jana Abt für die vielen Stunden danken, die wir zusammen im Labor verbracht haben. Während der gemeinsamen Arbeit ist eine enge Freundschaft entstanden, die uns durch die vielen Höhen und Tiefen der wissenschaftlichen Arbeit getragen hat.

Allen übrigen Mitarbeitern der III. Med., insbesondere Marlies Sachs, danke ich für die Unterstützung und Hilfsbereitschaft, die wir zu jeder Zeit erfahren durften.

Der größte Dank gilt meinem Vater, meinen Geschwistern, meinem Freund David und meinen Freundinnen für die grenzenlose Liebe, Unterstützung und Kraft, die sie mir jeden Tag geben.

Diese Doktorarbeit widme ich meiner Mutter, die viel zu früh von uns gegangen ist und so stolz gewesen wäre, diese Arbeit ihrer jüngsten Tochter in den Händen zu halten. Mit all ihrer Liebe, unvergesslichen Unterstützung und der eigenen, eisernen Disziplin hat sie mir gezeigt, das Ziel nie aus den Augen zu verlieren.

11 Lebenslauf

Johanna Steingröver

*21.04.1991 in Münster

Beruflicher Werdegang

seit April 2022	Assistenzärztin, Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsklinikum Münster
März 2021 - März 2022	Assistenzärztin Viszeralchirurgie, Agaplesion Diakonieklinikum Hamburg
Juni 2020	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung an der Universität Hamburg, Note: sehr gut
Juli - Oktober 2017	Forschungsprojekt Yonsei University, Prof. Dr. Shin, Seoul, Südkorea
April 2016 - April 2017	Teilnahme am Graduiertenkolleg des SFB 1192 "Immunvermittelte glomeruläre Erkrankungen" gefördert durch die DFG
März 2016	Vortragspreis "Der calciumsensitive Rezeptor führt zu einer Reorganisation fokaler Bindungsstellen in Podozyten", Jahrestagung der Gesellschaft für pädiatrische Nephrologie, Essen

Publikationen

Mühlig AK*, Steingröver J*, Heidelberg HS, Wingerath M, Sachs W, Hermans-Borgmeyer I, Meyer-Schwesinger C, Choi HY, Lim BJ, Patry C, Hoffmann GF, Endlich N, Bracke K, Weiß M, Guse AH, Lassé M, Rinschen MM, Braun F, Huber TB, Puellas VG, Schmitt CP, Oh J. **The calcium-sensing receptor stabilizes podocyte function in proteinuric humans and mice.** *Kidney Int.* 2022 Jun;101(6):1186-1199. doi: 10.1016/j.kint.2022.01.036. Epub 2022 Mar 7. PMID: 35271934. [* geteilte Erstautorenschaft]

Jong Yeob Kim*, Johanna Steingroever*, Keum Hwa Lee, Jun Oh, Min Jae Choi, Jiwon Lee, Nicholas G. Larkins, Franz Schaefer, Sung Hwi Hong, Gwang Hun Jeong, Jae Il Shin, Andreas Kronbichler. 2020. **Clinical Interventions and All-Cause Mortality of Patients with Chronic Kidney Disease: An Umbrella Systematic Review of Meta-Analyses.** *Journal of Clinical Medicine.* <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32024136> [* geteilte Erstautorenschaft]

Keum Hwa Lee, Jae Won Yang, Jin Young Cho, Joo Yup Lee, Eun Kyung Lim, Michael Eisenhut, Dong Yeon Jeong, Johanna Steingroever, Jae Il Shin. 2017. **The Role of Thymic Stromal Lymphopoietin (TSLP) in Glomerulonephritis.** *Childhood Kidney Diseases.* ISSN 2384-0250.

Muntau Ania Carolina, Driemeier Joenna, Abt Jana-Christin, Steingröver Johanna. 2018. **Pädiatrie hoch2.** Urban & Fischer Verlag/Elsevier GmbH, München. ISBN-13: 978-3437434815

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: