

Julia Cornelia Schröder

Dr. med.

Bedeutung des Calcium Sensing Rezeptors für das Zytoskelett glomerulärer Epithelzellen

Promotionsfach: Kinderheilkunde

Doktorvater: Herr Prof. Dr. Claus Peter Schmitt

Der Calcium Sensing Rezeptor steuert die Sekretion von Parathormon an der Nebenschilddrüse. Calcimimetika, die die Sensitivität des CaSR gegenüber Calcium erhöhen, werden zur Behandlung des urämischen Hyperparathyreoidismus eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Westernblot und Immunofluoreszenz eine konstitutive Expression des CaSR in Mäusepodozyten nachgewiesen werden. Er findet sich im Bereich der Zellmembran sowie perinukleär. Elektronenmikroskopisch zeigt sich, dass der CaSR auch in den Podozytenfortsätzen, die in vivo die Schlitzmembran bilden, nachzuweisen ist.

Micorarrayanalysen von Podozyten, die mit dem Calcimimetikum R-568 behandelt wurden, zeigen eine Hochregulation von Gengruppen, die einen antioxidativen Effekt aufweisen. Gene zur Induktion der Apoptose werden unter R-568 herabreguliert.

Im Weiteren konnte ein Zytoskelett-stabilisierender Effekt nachgewiesen werden. So schützt R-568 Podozyten vor toxischen Einflüssen. Puromycin-Aminoglukosid führt zur Schrumpfung des Zellkörpers, einem Verlust der podozyten-spezifischen Fußfortsätze, zytoplasmatischer Vakuolisierung und Zerfall von Aktin- und Filaminbündeln. Vinculin-markierte Adhäsionsstellen sind unter Behandlung mit Puromycin extrem reduziert. Bei gleichzeitiger Inkubation der Podozyten mit Puromycin und R-568 werden diese degenerativen Prozesse deutlich gemindert, insbesondere bleiben die Struktur des Aktinzytoskeletts und die fokalen Adhäsionsstellen weitgehend erhalten.

Cytochalasin D ist ein Polymerisationsinhibitor, der das Zytoskelett der Podozyten degeneriert. Nach Behandlung von Podozyten mit Cytochalasin D und anschließender Inkubation in Zellkulturmedium kommt es zu einer langsamen Regeneration des Zytoskeletts. Gibt man in dieser Regenerationsphase R-568 hinzu, so beschleunigt sich die Regeneration der Zellen massiv, der normale Zytoskelettstatus wird bereits nach 24 Stunden anstatt nach 72 Stunden erreicht, die fokalen Adhäsionspunkte sind in Anzahl und Lokalisation normalisiert.

Im Weiteren wurden in der vorliegenden Arbeit Mauspodozytenklone selektiert, die den CaSR spontan überexprimierten sowie solche, bei denen der CaSR mittels siRNA supprimiert war. Die CaSR Knockdown Podozyten zeigen wesentliche Unterschiede im Vergleich zu Wildtyp-Podozyten. Sie sind kleiner, proliferieren langsamer und weisen im *Woundhealing Assay* eine signifikant reduzierte Migrationskapazität auf. Die Expression von Synaptopodin ist erhöht, Filamin wird weitgehend unverändert synthetisiert. CaSR überexprimierende Podozyten weisen dagegen eine Hochregulation von Filamin auf. Filamin ist für die Verbindung des CaSR mit dem podozytären Aktinzytoskelett notwendig. Synaptopodin, das in zahlreichen intrazellulären Prozessen interagiert, ist in den CaSR-überexprimierenden Zellen stark supprimiert.

Die im Rahmen dieser Dissertation in vitro erhobenen Befunde zeigen, dass durch Aktivierung des CaSR in Podozyten zahlreiche zelluläre Prozesse gesteuert werden, die eine Protektion bzw. raschere Regeneration der Podozyten gegenüber exogenen Noxen ermöglichen. In der Zwischenzeit durchgeführte tierexperimentelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen eine starke antiproteinurische Wirkung durch R-568. Inwieweit sich positive Effekte von Calcimimetika im Sinne einer protektiven bzw. progressionshemmenden Therapie unter akzeptabler klinischer Toleranz bei Patienten mit Glomerulopathien erzielen lassen, wird in entsprechenden Studien zu klären sein.