

Biologia e genetica del podocita

Zennaro Cristina¹, Armelloni Silvia², Li Min², Watanabe Shojiro², Pignatari Chiara², Ikehata Masami², Giardino Laura², Mattinzoli Deborah², Corbelli Alessandro², Rastaldi Maria Pia²

¹Laboratorio di Fisiopatologia Renale, Dipartimento di Scienze Mediche, Chirurgiche e della Salute, Università di Trieste

²Laboratorio di Ricerca Nefrologica, Fondazione IRCCS Ca' Granda Ospedale Maggiore Policlinico & Fondazione D'Amico per la Ricerca sulle Malattie Renali

Maria Pia Rastaldi
Laboratorio di Ricerca Nefrologica
Via Pace 9
20122 Milano
Tel 02 55033879
Fax 02 55033878
Email mariapia.rastaldi@policlinico.mi.it

Abstract

Gli sviluppi della biologia e della genetica del podocita sono stati finora strettamente associati perché l'analisi genetica di soggetti affetti da sindrome nefrosica ha permesso l'individuazione e lo studio di molecole fondamentali per il mantenimento della struttura e della funzione podocitaria.

Tali molecole possono essere raggruppate in tre categorie principali: a) proteine appartenenti allo *slit diaphragm*, la giunzione che connette lateralmente i processi podocitari ed è responsabile della selettività del filtro glomerulare, b) molecole coinvolte nelle dinamiche del citoscheletro di actina, quindi nel mantenimento della complessa struttura ramificata del podocita, e c) molecole appartenenti ad organuli intracellulari, quali mitocondri e lisosomi, che presiedono al metabolismo cellulare.

Considerando la centralità del podocita nel mantenimento della barriera di filtrazione glomerulare, la conoscenza completa dei meccanismi che regolano la biologia e la patologia podocitaria è un requisito fondamentale per lo sviluppo di terapie mirate delle malattie glomerulari.

Podocytes: genetics and biology

Progresses in podocyte biology have been strictly connected with genetic advances; the identification of genes mutated in familial and sporadic forms of nephrotic syndrome has been followed by functional studies of the encoded proteins, revealing numerous properties of the cell.

The molecules uncovered so far belong to three main categories: a) proteins located at the slit diaphragm, the intercellular junction which laterally connects podocyte processes and is responsible for selectivity of the glomerular filter, b) molecules involved in regulation of actin dynamics, which are essential for the maintenance of podocyte structure and function, and c) molecules belonging to intracellular organelles, such as mitochondria and lysosomes, which are central players in podocyte metabolism.

Considering the key role of the podocyte in health and disease of the glomerular filter, better knowledge of this cell is a pre-requisite for developing targeted therapies of glomerular diseases.

Parole chiave

Podocita, nefrina, citoscheletro, sindrome nefrosica, proteinuria

Podocyte, nephrin, cytoskeleton, nephrotic syndrome, proteinuria

Introduzione

La barriera di filtrazione del glomerulo renale è costituita da un capillare convoluto rivestito esternamente dalle ramificazioni dei podociti. I podociti rappresentano un fenotipo particolarmente evoluto dei periciti, popolazione eterogenea di cellule che si trovano sulla parete esterna dei vasi di piccolo calibro e che svolgono attività diverse a seconda del tessuto/organo in cui sono localizzati (1).

Nel glomerulo, i podociti hanno numerose funzioni (2). Durante lo sviluppo embrionale i podociti reclutano le cellule endoteliali all'interno del glomerulo e presiedono alla formazione della barriera di filtrazione producendo le molecole che costituiscono la membrana basale del capillare glomerulare. Dall'inizio della filtrazione e per tutta la durata della vita, sono responsabili del mantenimento di un filtro glomerulare "pulito" ed efficiente, e verosimilmente governano i segnali intercellulari che consentono alle cellule glomerulari di comunicare tra loro.

Infine, i podociti sono i primi responsabili della funzione di filtrazione. Quando i podociti non funzionano al meglio, il filtro glomerulare si altera e non trattiene molecole importanti per l'organismo, soprattutto molecole proteiche, che vengono perse nelle urine (proteinuria). Nelle sua forma più grave, definita "sindrome nefrosica", l'imponente proteinuria si associa ad alterazioni metaboliche prevalentemente a carico dei lipidi e della coagulazione. Morfologicamente, l'aspetto predominante è quello di un quadro di glomerulosclerosi segmentaria focale (GSF), cioè di addensamento sclerotico di una porzione del flocculo glomerulare. Anche nelle forme più lievi, la proteinuria è di per sé causa di ulteriore danno renale, sia a livello glomerulare che a livello tubulointerstiziale, con conseguente progressiva diminuzione delle funzioni del rene fino all'insufficienza renale terminale (3). Pertanto, la migliore conoscenza delle proprietà dei podociti e dei meccanismi che determinano il danno di queste cellule sono requisiti essenziali per lo sviluppo di terapie mirate.

A causa della struttura cellulare ramificata e del livello di estrema differenziazione, nonché della localizzazione profonda nel tessuto renale, i podociti sono stati per molti anni difficili da analizzare, fino a quando il miglioramento delle tecniche di coltura cellulare e di biologia molecolare, lo sviluppo di più sofisticati modelli transgenici, e l'evoluzione delle tecniche di microscopia hanno consentito un approccio diretto a questo tipo cellulare.

Sono stati in realtà soprattutto gli sviluppi della genetica a permettere i decisivi passi avanti avvenuti negli ultimi 15 anni. La genetica non solo ha consentito la definizione diagnostica di una serie di patologie gravi della filtrazione glomerulare, precedentemente classificate come "idiopatiche", ma soprattutto ha focalizzato l'attenzione sulla cellula podocitaria; la scoperta dei geni coinvolti nella sindrome nefrosica è diventata il punto di partenza per studi funzionali *in vitro* e *in vivo*, con il conseguente avanzamento delle conoscenze biologiche e molecolari.

Ancora oggi genetica e biologia del podocita procedono di pari passo, producendo un quadro sempre più preciso di quanto accade a livello podocitario nel glomerulo sano e patologico.

Lo slit diaphragm e il citoscheletro del podocita

L'esistenza di forme familiari e congenite di sindrome nefrosica ha stimolato i primi studi di genetica, che hanno condotto alla scoperta nel 1998 del gene NPHS1 responsabile della forma più grave di proteinuria del bambino, la sindrome nefrosica di tipo finnico (4). NPHS1 codifica per nephrina, una molecola di adesione presente nella giunzione intercellulare tra i prolungamenti podocitari, il cosiddetto *slit diaphragm* o poro di filtrazione, che costituisce uno dei determinanti principali della selettività della barriera di filtrazione (5). Nelle condizioni proteinuriche umane, così come nei modelli sperimentali, il danno podocitario è morfologicamente evidente, caratterizzato dalla cosiddetta "fusione" dei processi podocitari con scomparsa dello *slit diaphragm* o la sua sostituzione con una giunzione occludente (6), e un profondo rimodellamento del citoscheletro dei processi podocitari, che è costituito principalmente da filamenti di actina (7).

Pertanto non sorprende che NPHS1 e i numerosi geni successivamente individuati in forme familiari e sporadiche di sindrome nefrosica codifichino per molecole localizzate a livello dello slit diaphragm (NPHS2, NPHS3, CD2AP, TRPC6) o per proteine citoscheletriche (SMARCL1, ACTN4, MYH9, Myo1E, ARHGAP24, INF2), confermando il nesso molecolare tra la complessa morfologia del podocita e la sua funzione (8).

Questo legame è stato ulteriormente confermato dalla recente identificazione di casi di sindrome nefrosica dovuti a mutazioni di ARHGDI1, il gene che codifica per la proteina *Rho GDP dissociation inhibitor α* (9). Membri della famiglia delle piccole GTPasi Rho controllano le dinamiche del rimodellamento di actina. Le interazioni tra le piccole GTPasi RhoA, Rac1, e Cdc42 sarebbero dunque modificate dalle alterazioni di *Rho GDP dissociation inhibitor α* causate dalle mutazioni, col risultato finale di incrementare l'attività di Rac1 e Cdc42 (9), che si associa ad aumento della motilità dei podociti.

Se è vero che oggi prevale la teoria secondo cui la stabilità dei processi podocitari è rappresentata da un fenotipo stazionario, mentre la loro instabilità si concretizza in un fenotipo mobile, è tuttavia verosimile che sbilanciamenti in entrambi i sensi rappresentino una deviazione patologica da una situazione di equilibrio altamente regolata.

Infatti, da un lato le evidenze sperimentali confermano che topi transgenici che non esprimono le GTPasi Cdc42 (10) o quelli che esprimono una forma *dominant-negative* di Rho (11), o una forma costitutivamente attiva di Rac1 (12) sono proteinurici e, in vitro, i podociti con le stesse alterazioni molecolari presentano aumentata motilità. Tuttavia, è stato anche dimostrato che mutazioni di MYO1E presenti in soggetti con sindrome nefrosica sono causa di alterazioni della miosina non-muscolare di classe 1E che nei podociti causa una ridotta capacità di migrazione (13).

Un simile sbilanciamento delle dinamiche tra piccole GTPasi, actina e miosina si verifica quando è mutato il gene ANLN, che codifica per la proteina *actin-binding* anillina. La recente identificazione di mutazioni di ANLN in soggetti con GSF a trasmissione autosomica dominante ha consentito infatti di dimostrare che l'assenza di anillina si traduce in alterata espressione e funzione di Rho, actina e miosina (14).

Le proteine della famiglia *formin* hanno ruoli rilevanti nella coordinazione non solo del citoscheletro di actina, ma anche nell'assemblaggio e le dinamiche dei microtubuli. Mutazioni di *Inverted Formin 2* (INF2) sono state recentemente identificate come causa di forme di GSF autosomiche dominanti e in forme di GSF associata alla malattia di Charcot Marie Tooth (15, 16). La maggior parte delle mutazioni sono raggruppate negli esoni che codificano per il dominio diafano inibitorio (DID) della molecola, e quelle delle forme sindromiche sono per lo più situate tra due *DID-binding pockets*, e producono alterazioni funzionali più gravi della proteina rispetto alle mutazioni delle forme non-sindromiche. Il DID media l'autoinibizione di INF2 attraverso la sua interazione con il dominio diafano C-terminale e consente a INF2 di accelerare la polimerizzazione/depimerizzazione di actina e di regolare il *targeting* alla membrana cellulare mediante la formazione di complessi con Rho, Cdc42, MAL (*myelin and lymphocyte protein*), e MAL2 sia nei podociti che nelle cellule di Schwann (17, 18).

La centralità di nefrina

Tra le proteine che costituiscono lo *slit diaphragm*, nefrina sembra avere un ruolo prominente, dimostrato innanzitutto dal fatto che le mutazioni del gene che la codifica, NPHS1, sono responsabili della forma più grave di sindrome nefrosica del neonato, e confermato dall'osservazione del fenotipo letale dei topi *null* per nefrina (19).

In tutte le condizioni patologiche glomerulari, sia umane che sperimentali, l'espressione di nefrina risulta essere profondamente alterata. Si tratta inoltre di un'alterazione precoce, che precede la comparsa di alterazioni morfologiche podocitarie osservabili in microscopia elettronica nonché la comparsa di proteinuria (20, 21).

Nefrina è una proteina trans-membrana della superfamiglia delle immunoglobuline ed è costituita da un peptide di segnale nel dominio N-terminale, un dominio extracellulare che contiene otto moduli simil-immunoglobulinici e un modulo simil-fibronectina di tipo terzo, un singolo dominio transmembrana, e un dominio intracellulare C-terminale (4).

L'espressione di nefrina nel podocita è regolata da diversi fattori di trascrizione (22), di cui il più studiato è WT1, che costituisce un fattore determinante nello sviluppo embrionale del glomerulo, come pure nel mantenimento dello stato di salute del glomerulo maturo (23).

A partire dallo stadio capillare delle fasi di maturazione glomerulare l'espressione di WT1 diventa esclusivamente podocitaria, e WT1 attiva il gene di nefrina legandosi ad una regione conservata del promotore della nefrina umana (24). Nel topo, la regione di legame di WT1 si localizza a circa 600 paia di basi a monte del sito omologo del gene umano (25).

La sintesi di nefrina è regolata anche da meccanismi epigenetici, come inizialmente scoperto da Ristola et al (26), con l'identificazione dell'inibizione della trascrizione di nefrina imputabile a metilazione di tre isole CpG localizzate tra i geni di nefrina e Nph3 e nelle rispettive regioni codificanti. Inoltre, è stato dimostrato

che il fattore di trascrizione KLF4 è un regolatore della metilazione del DNA di nefrina (27); l'aumentata espressione di KLF4 è infatti in grado di demetilare il DNA di nefrina e indurre la trascrizione.

Inoltre, una regolazione indiretta post-trascrizionale è determinata dalla soppressione della trascrizione di WT1 da parte del microRNA-193a, come recentemente descritto da Gebeshuber et al (28). Gli autori hanno osservato un'espressione aumentata del microRNA-193a in pazienti affetti da GSF e hanno dimostrato che WT1 costituisce il target principale di questo microRNA. Il legame di microRNA-193a al RNA messaggero di WT1 riduce la sua traduzione, che si riflette in una ridotta espressione sia di WT1 che di nefrina, con conseguente danno podocitario.

Un ulteriore meccanismo di regolazione di nefrina è costituito dalla cosiddetta SUMOilazione. SUMO (*small ubiquitin-like modifier*) è una proteina della famiglia dell'ubiquitina (29). La molecola si lega e modifica residui di lisina delle proteine target, bloccandone l'ubiquitinazione e quindi la degradazione. Nel caso di nefrina, sembra che SUMO possa legarsi alle lisine 1114 and 1224 del dominio intracellulare della nefrina murina e alla lisina 1100 della nefrina umana, contribuendo alla preservazione di nefrina (30).

Il dominio dello slit diaphragm dove nefrina è localizzata costituisce un *lipid raft*, dove sono presenti altre proteine cruciali per il podocita, quali podocina (NPHS2) e il canale del calcio TRPC6 (31, 32), le cui mutazioni sono state identificate in soggetti affetti da sindrome nefrosica. In questo dominio di membrana nefrina agisce come una piattaforma di *signaling*, essendo in grado di trasmettere al citoscheletro di actina le informazioni provenienti dall'ambiente extracellulare (33). La trasmissione dei segnali è possibile grazie alla fosforilazione del dominio intracellulare di nefrina, dovuta prevalentemente all'attività della chinasi Fyn, appartenente alla famiglia Src (34).

La fosforilazione di nefrina è importante anche per la sua internalizzazione *raft*-mediata (35) ed è un evento molecolare necessario per lo sviluppo e il mantenimento della struttura dei processi podocitari. Nefrina fosforilata è in grado infatti di reclutare molecole adattatrici, come Nck1/2, Grb2 and Crk1/2, regolando l'assemblaggio di complessi proteici che regolano la polimerizzazione di actina (36).

Recentemente è stato dimostrato che la fosforilazione di nefrina può essere determinata dal legame di sFlit1, la forma solubile del recettore del fattore di crescita VEGF (*vascular endothelial growth factor*) *fms-related tyrosine kinase 1* (Flt1), prodotto dai podociti e quindi in grado di agire in modo paracrino nella regolazione del *signaling* intracellulare podocitario (37).

La fosforilazione di nefrina è un evento altamente regolato, e sia l'aumento che la riduzione di fosforilazione sono stati associati a danno podocitario in modelli animali e in patologia umana (38-40). In vitro, la formazione di clusters di nefrina fosforilata causano la formazione di lamellipodia (41) e contribuiscono al fenotipo mobile del podocita che è stato associato a stati patologici. I dati finora prodotti pertanto sembrano stabilire l'importanza di un controllo stretto della fosforilazione di questa proteina, confermando che il podocita necessita di uno stato di equilibrio molecolare per preservare la propria struttura e la propria funzione.

Il dominio extracellulare di nefrina sembra essere altamente glicosilato, contiene siti di legame per eparansolfato, e possiede cisteine libere che servono a formare legami disolfuro con molecole adiacenti. Le interazioni omofiliche e eterofiliche di nefrina, con sé stessa e con le molecole della famiglia proteica Neph (Neph1, Neph2 e Neph3) sono essenziali alla stabilità dello *slit diaphragm* e al mantenimento della funzione della barriera di filtrazione glomerulare (42-44).

Nefrina è una molecola ad espressione ristretta ad alcuni tipi cellulari. Oltre ai podociti, nefrina è presente in poche altre cellule dell'organismo dei mammiferi, come le cellule neuronali, i linfociti, e le cellule beta del pancreas (45-48). E' stata inoltre osservata nelle fasi di sviluppo embrionale a livello epicardico e dei vasi coronarici (49).

L'espressione di nefrina nelle cellule neuronali è particolarmente interessante, tenendo conto del fatto che gli ortologi di nefrina in *Caenorhabditis elegans* (Syg-2) e *Drosophila melanogaster* (Hibris) sono molecole cruciali per il posizionamento e il targeting delle sinapsi (50, 51), suggerendo che dal punto di vista evolutivo la funzione originaria di nefrina sia quella di una molecola di adesione sinaptica.

L'espressione neuronale di nefrina è stata immediatamente osservata fin dalla scoperta della molecola e successivamente confermata da diversi autori (4, 45, 52).

Durante lo sviluppo embrionale del topo l'mRNA di nefrina è stato osservato nel rombencefalo e nel midollo spinale. Dal tredicesimo al diciassettesimo giorno embrionale (E13-E17), nefrina è espressa nel neuroepitelio del primordio cerebellare a livello del tetto del quarto ventricolo (4).

Nel topo neonato l'espressione di beta-galattosidasi guidata dal promotore di nefrina è stata osservata nel cervelletto, nel mesencefalo, e in alcuni glomeruli del bulbo olfattivo (45). Al sedicesimo giorno dopo la nascita è inoltre osservabile nel giro dentato dello strato molecolare dell'ippocampo.

Lo studio del topo adulto (53) ha mostrato che nefrina endogena è espressa estesamente nella corteccia motoria, mentre è assente nella corteccia somatosensitiva. Inoltre esprimono nefrina alcune cellule del corpo calloso e la molecola è presente in modo diffuso nel plesso corioideo, nel ponte, nel midollo allungato e nel bulbo olfattivo. Nefrina si osserva nello striato dorsale (nucleo caudato e putamen) e nel talamo. Nell'ippocampo, nefrina è presente in alcuni neuroni piramidali della regione C3, in qualche cellula della regione CA1, mentre l'ilo è completamente negativo. Infine, a livello cerebellare, la molecola è presente nelle cellule del Purkinje e nelle cellule granulari dello strato nucleare (53).

La presenza di nefrina nei gangli della base e nella corteccia motoria unitamente alla sua assenza nella corteccia somatosensitiva suggerisce che la molecola sia importante per la formazione di circuiti neuronali legati al movimento. Questa associazione sembra trovare conferma nella sua presenza a livello cerebellare, che tra l'altro spiegherebbe la sintomatologia atassica che è stata osservata in topi *null* per nefrina la cui sopravvivenza era stata prolungata mediante re-introduzione di nefrina solo a livello renale (54).

Mitocondri, lisosomi, e nuove scoperte

Se è vero che la maggior parte delle mutazioni che causano sindrome nefrosica riguardano geni codificanti molecole dello *slit diaphragm* e del citoscheletro podocitario, non bisogna dimenticare un gruppo di mutazioni, osservate in forme prevalentemente sindromiche, di geni codificanti per molecole appartenenti ad organuli intracellulari, come i mitocondri (MTTL1, COQ6, COQ2, PDSS2) e i lisosomi (SCARB2) (55). Anche in questo caso, la genetica è stata determinante per focalizzare l'attenzione della ricerca sull'importanza delle funzioni mitocondriali e lisosomiali nel podocita.

In particolare, i mitocondri sembrano avere nel podocita un ruolo preminente rispetto ad altri tipi cellulari perché i podociti sono incapaci di ricorrere alla glicolisi in caso di disfunzione mitocondriale, quindi le richieste di energia sono demandate primariamente alla produzione mitocondriale (56).

Recentemente sono state identificate mutazioni del gene ADCK4 come causa di sindrome nefrosica accompagnata da GSF nella variante collapsing (57). ADCK4 codifica per una proteina (*AarF domain containing kinase 4*) la cui funzione rimane quasi completamente sconosciuta, ma che nel podocita si localizza a livello mitocondriale dove sembra interagire coi coenzimi CoQ6 e CoQ7. Nei soggetti con mutazioni di ADCK4 sono stati inoltre osservati livelli bassi di coenzima CoQ10, e la supplementazione dei pazienti con questo coenzima ha prodotto un miglioramento sintomatologico. Va aggiunto che i livelli di CoQ10 sembrerebbero ridotti nella GSF indipendentemente dalla presenza di mutazioni (58), il che farebbe pensare ad un ruolo più generale giocato da questa molecola e confermerebbe indirettamente la centralità del mitocondrio nel metabolismo podocitario.

SCARB2 codifica per Limp2 (*lysosomal integral membrane protein 2*), una glicoproteina della membrana lisosomiale con diverse funzioni che vanno dalla biogenesi e mantenimento di endosomi e lisosomi, al ruolo di recettore della glucocerebrosidasi, e di recettore per diversi enterovirus (59). Disordini lisosomiali possono avere come conseguenza immediata la disregolazione dell'autofagia, come recentemente osservato in cellule derivate da soggetti con mutazioni di SCARB2, che presentano aumentato numero di autofagosomi dovuto verosimilmente all'impossibilità di fusione lisosomiale (60).

Recentemente Cong et al hanno identificato una mutazione *missense* omozigote del gene TTC21B in sette famiglie con GSF a rapida progressione verso lo stadio di insufficienza renale terminale (61). Il tessuto renale dei pazienti con la mutazione presentava non solo il danno glomerulare, ma anche un ispessimento della membrana basale tubulare, che potrebbe spiegare il danno tubulointerstiziale e la rapida progressione verso l'insufficienza renale.

TTC21B è un gene localizzato nel ciglio primario e già associato a nefronoftisi (62). I nuovi dati mostrano che la proteina codificata da TTC21B, IFT139 (*intraflagellar transport protein 139*), si localizza alla base del ciglio primario nei podociti immaturi isolati da rene umano fetale e in una linea indifferenziata di podociti, mentre nel podocita maturo/adulto che non possiede il ciglio primario la molecola si trova lungo i microtubuli. La ridotta espressione di IFT139 determina difetti del ciglio primario, alterata capacità di

migrazione cellulare, e alterazioni citoscheletriche, tutte alterazioni solo parzialmente recuperate dopo transfezione dei podociti IFT139-KO con la proteina mutata, ad indicare un effetto ipomorfico della mutazione (61).

Infine, quest'anno è stato identificato per la prima volta un gene responsabile della sindrome di Galloway-Mowat, una patologia rara a trasmissione autosomica recessiva caratterizzata da sindrome nefrosica, microcefalia, e deficit neurologico (62). Gli autori hanno identificato mutazioni del gene WDR73 in due famiglie affette dalla sindrome (63). La proteina codificata da WDR73 è una molecola la cui funzione era completamente sconosciuta e che sembra essere coinvolta nella formazione dei poli del fuso mitotico e negli *asters* di microtubuli che si formano durante la mitosi. A conferma indiretta dell'associazione con la mitosi, l'espressione podocitaria è evidente nel tessuto renale embrionale, ma è completamente assente nel glomerulo maturo (64).

Conclusioni

Lo studio genetico della sindrome nefrosica ha consentito di focalizzare l'attenzione sulla cellula podocitaria e di scoprire una serie di molecole la cui funzione è cruciale per la morfologia e la funzione del podocita nella barriera di filtrazione glomerulare.

Il quadro sempre più completo della biologia del podocita sta aprendo una serie di possibilità terapeutiche mirate alla correzione specifica di *pathways* di segnale che si alterano nelle condizioni patologiche del glomerulo.

Ringraziamenti

Gli autori ringraziano l'Associazione Bambino Nefropatico ABN ONLUS per il costante supporto alle attività di ricerca.

Il Laboratorio di Ricerca Nefrologica e il Laboratorio di Fisiopatologia Renale fanno parte della "Rete Italiana per la lotta alla Glomerulosclerosi Focale" organizzata e supportata dalla Fondazione La Nuova Speranza ONLUS.

La Dr.ssa Cristina Zennaro e il Dr Alessandro Corbelli sono ricercatori Telethon (progetto GGP13149A).

Bibliografia

- 1) Armulik A, Genové G, Betsholtz C. Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*. 2011; 21: 193-215.
- 2) Reiser J, Sever S. Podocyte biology and pathogenesis of kidney disease. *Annu Rev Med*. 2013;64:357-66.
- 3) Snyder S, John JS. Workup for Proteinuria. *Prim Care*. 2014; 41: 719-35.
- 4) Kestilä M, Lenkkeri U, Männikkö M, et al. Positionally cloned gene for a novel glomerular protein--nephrin--is mutated in congenital nephrotic syndrome. *Mol Cell* 1998; 1: 575-82.
- 5) Kawachi H, Miyauchi N, Suzuki K, et al. Role of podocyte slit diaphragm as a filtration barrier. *Nephrology (Carlton)*. 2006; 11: 274-81.
- 6) Kriz W, Shirato I, Nagata M, et al. The podocyte's response to stress: the enigma of foot process effacement. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 304: F333-47.
- 7) 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: 428-37.
- 8) Rood IM, Deegens JK, Wetzels JF. Genetic causes of focal segmental glomerulosclerosis: implications for clinical practice. *Nephrol Dial Transplant*. 2012; 27: 882-90.
- 9) Gee HY, Saisawat P, Ashraf S, et al. ARHGDI1 mutations cause nephrotic syndrome via defective RHO GTPase signaling. *J Clin Invest*. 2013; 123: 3243-53.
- 10) Scott RP, Hawley SP, Ruston J, et al. Podocyte-specific loss of Cdc42 leads to congenital nephropathy. *J Am Soc Nephrol*. 2012; 23: 1149-54.
- 11) Wang L, Ellis MJ, Gomez JA, et al. Mechanisms of the proteinuria induced by Rho GTPases. *Kidney Int*. 2012; 81: 1075-85.
- 12) Yu H, Suleiman H, Kim AH, et al. Rac1 activation in podocytes induces rapid foot process effacement and proteinuria. *Mol Cell Biol*. 2013; 33: 4755-64.
- 13) Mele C, Iatropoulos P, Donadelli R, et al. MYO1E mutations and childhood familial focal segmental glomerulosclerosis. *N Engl J Med*. 2011; 365: 295-306.
- 14) Gbadegesin RA, Hall G, Adeyemo A, et al. Mutations in the gene that encodes the F-actin binding protein anillin cause FSGS. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25: 1991-2002.
- 15) Boyer O, Nevo F, Plaisier E, et al. INF2 mutations in Charcot-Marie-Tooth disease with glomerulopathy. *N Engl J Med*. 2011; 365: 2377-88.
- 16) Gbadegesin RA, Lavin PJ, Hall G, et al. Inverted formin 2 mutations with variable expression in patients with sporadic and hereditary focal and segmental glomerulosclerosis. *Kidney Int*. 2012; 81: 94-9.
- 17) Sun H, Schlondorff J, Higgs HN, Pollak MR. Inverted formin 2 regulates actin dynamics by antagonizing Rho/diaphanous-related formin signaling. *J Am Soc Nephrol*. 2013; 24: 917-29.

- 18) Gurel PS, Ge P, Grintsevich EE, et al. INF2-mediated severing through actin filament encirclement and disruption. *Curr Biol*. 2014; 24: 156-64.
- 19) Welsh GI, Saleem MA. Nephrin-signature molecule of the glomerular podocyte? *J Pathol*. 2010; 220: 328-37.
- 20) Pugliese G, Ricci C, Iacobini C, et al. Glomerular barrier dysfunction in glomerulosclerosis-resistant Milan rats with experimental diabetes: the role of renal haemodynamics. *J Pathol* 2007; 213: 210-8.
- 21) Li M, Armelloni S, Edefonti A, et al. Fifteen years of research on nephrin: what we still need to know. *Nephrol Dial Transplant*. 2013; 28: 767-70.
- 22) Ristola M, Lehtonen S. Functions of the podocyte proteins nephrin and Neph3 and the transcriptional regulation of their genes. *Clin Sci (Lond)* 2014; 126: 315-28.
- 23) Morrison AA, Viney RL, Saleem MA, Lodomery MR. New insights into the function of the Wilms tumor suppressor gene WT1 in podocytes. *Am J Physiol Renal Physiol* 2008; 295: F12-7.
- 24) Guo G, Morrison DJ, Licht JD, Quaggin SE. WT1 activates a glomerular-specific enhancer identified from the human nephrin gene. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 2851-6.
- 25) Wagner N, Wagner KD, Xing Y, et al. The major podocyte protein nephrin is transcriptionally activated by the Wilms' tumor suppressor WT1. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 3044-51.
- 26) Ristola M, Arpiainen S, Saleem MA, et al. Transcription of nephrin-Neph3 gene pair is synergistically activated by WT1 and NF- κ B and silenced by DNA methylation. *Nephrol Dial Transplant* 2012; 27: 1737-45.
- 27) Hayashi K, Sasamura H, Nakamura M, et al. KLF4-dependent epigenetic remodeling modulates podocyte phenotypes and attenuates proteinuria. *J Clin Invest* 2014; 124: 2523-37.
- 28) Gebeshuber CA, Kornauth C, Dong L, et al. Focal segmental glomerulosclerosis is induced by microRNA-193a and its downregulation of WT1. *Nat Med* 2013; 19: 481-7.
- 29) Wilson VG, Rangasamy D. Intracellular targeting of proteins by sumoylation. *Exp Cell Res* 2001; 271: 57-65.
- 30) Tossidou I, Himmelseher E, Teng B, et al. SUMOylation determines turnover and localization of nephrin at the plasma membrane. *Kidney Int* 2014; 86: 1161-73.
- 31) Schwarz K, Simons M, Reiser J, et al. Podocin, a raft-associated component of the glomerular slit diaphragm, interacts with CD2AP and nephrin. *J Clin Invest* 2001; 108: 1621-9.
- 32) Huber TB, Schermer B, Müller RU, et al. Podocin and MEC-2 bind cholesterol to regulate the activity of associated ion channels. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; 103: 17079-86.
- 33) Huber TB, Benzing T. The slit diaphragm: a signaling platform to regulate podocyte function. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 2005; 14: 211-6.
- 34) Verma R, Wharram B, Kovari I, et al. Fyn binds to and phosphorylates the kidney slit diaphragm component Nephrin. *J Biol Chem* 2003; 278: 20716-23.

- 35) Qin XS, Tsukaguchi H, Shono A, et al. Phosphorylation of nephrin triggers its internalization by raft-mediated endocytosis. *J Am Soc Nephrol* 2009; 20: 2534-45.
- 36) Garg P, Holzman LB. Podocytes: gaining a foothold. *Exp Cell Res* 2012; 318: 955–63.
- 37) Jin J, Sison K, Li C, et al. Soluble FLT1 binds lipid microdomains in podocytes to control cell morphology and glomerular barrier function. *Cell* 2012; 151: 384-99.
- 38) Uchida K, Suzuki K, Iwamoto M, et al. Decreased tyrosine phosphorylation of nephrin in rat and human nephrosis. *Kidney Int* 2008; 73: 926-32.
- 39) Ohashi T, Uchida K, Asamiya Y, et al. Phosphorylation status of nephrin in human membranous nephropathy. *Clin Exp Nephrol* 2010; 14: 51-5.
- 40) Veron D, Reidy KJ, Bertuccio C, et al. Overexpression of VEGF-A in podocytes of adult mice causes glomerular disease. *Kidney Int* 2010; 77: 989-99.
- 41) Venkatareddy M, Cook L, Abuarquob K, et al. Nephrin regulates lamellipodia formation by assembling a protein complex that includes Ship2, filamin and lamellipodin. *PLoS One* 2011; 6: e28710.
- 42) Gerke P, Huber TB, Sellin L, et al. Homodimerization and heterodimerization of the glomerular podocyte proteins nephrin and NEPH1. *J Am Soc Nephrol* 2003; 14: 918–26.
- 43) Gerke P, Sellin L, Kretz O, et al. NEPH2 is located at the glomerular slit diaphragm, interacts with nephrin and is cleaved from podocytes by metalloproteinases. *J Am Soc Nephrol* 2005; 16: 1693-702.
- 44) Heikkilä E, Ristola M, Havana M, et al. Trans-interaction of nephrin and Neph1/Neph3 induces cell adhesion that associates with decreased tyrosine phosphorylation of nephrin. *Biochem J* 2011; 435: 619-28.
- 45) Putaala H, Sainio K, Sariola H, Tryggvason K. Primary structure of mouse and rat nephrin cDNA and structure and expression of the mouse gene. *J Am Soc Nephrol* 2000; 11: 991–1001.
- 46) Aström E, Rinta-Valkama J, Gylling M, et al. Nephrin in human lymphoid tissues. *Cell Mol Life Sci* 2006; 63: 498–504.
- 47) Liu L, Aya K, Tanaka H, et al. Nephrin is an important component of the barrier system in the testis. *Acta Med Okayama* 2001; 55: 161–5.
- 48) Fornoni A, Jeon J, Varona Santos J, et al. Nephrin is expressed on the surface of insulin vesicles and facilitates glucose-stimulated insulin release. *Diabetes* 2010; 59: 190-9.
- 49) Wagner N, Morrison H, Pagnotta S, et al. The podocyte protein nephrin is required for cardiac vessel formation. *Hum Mol Genet.* 2011; 20: 2182-94.
- 50) Shen K, Fetter RD, Bargmann CI. Synaptic specificity is generated by the synaptic guidepost protein SYG-2 and its receptor, SYG-1. *Cell* 2004; 116: 869–81.
- 51) Sugie A, Umetsu D, Yasugi T, et al. Recognition of pre- and postsynaptic neurons via nephrin/NEPH1 homologs is a basis for the formation of the *Drosophila* retinotopic map. *Development* 2010; 137: 3303-13.

- 52) Putaala H, Soininen R, Kilpeläinen P, et al. The murine nephrin gene is specifically expressed in kidney, brain and pancreas: inactivation of the gene leads to massive proteinuria and neonatal death. *Hum Mol Genet* 2001; 10: 1-8.
- 53) Li M, Armelloni S, Ikehata M, et al. Nephrin expression in adult rodent central nervous system and its interaction with glutamate receptors. *J Pathol* 2011; 225: 118-28.
- 54) Juhila J, Lassila M, Roozendaal R, et al. Inducible nephrin transgene expression in podocytes rescues nephrin-deficient mice from perinatal death. *Am J Pathol* 2010; 176: 51-63.
- 55) Machuca E, Benoit G, Antignac C. Genetics of nephrotic syndrome: connecting molecular genetics to podocyte physiology. *Hum Mol Genet*. 2009; 18: R185-94.
- 56) Abe Y, Sakairi T, Kajiyama H, et al. Bioenergetic characterization of mouse podocytes. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2010; 299: C464-476.
- 57) Ashraf S, Gee HY, Woerner S, et al. ADCK4 mutations promote steroid-resistant nephrotic syndrome through CoQ10 biosynthesis disruption. *J Clin Invest*. 2013; 123: 5179-89.
- 58) Gasser DL, Winkler CA, Peng M, et al. Focal segmental glomerulosclerosis is associated with a PDSS2 haplotype and, independently, with a decreased content of coenzyme Q10. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2013; 305: F1228-38.
- 59) Gonzalez A, Valeiras M, Sidransky E, Tayebi N. Lysosomal integral membrane protein-2: a new player in lysosome-related pathology. *Mol Genet Metab*. 2014; 111: 84-91.
- 60) Gleich K, Desmond MJ, Lee D, et al. Abnormal Processing of Autophagosomes in Transformed B Lymphocytes from SCARB2-Deficient Subjects. *Biores Open Access*. 2013; 2: 40-6.
- 61) Cong EH, Bizet AA, Boyer O, et al. A Homozygous Missense Mutation in the Ciliary Gene TTC21B Causes Familial FSGS. *J Am Soc Nephrol*. 2014; 25: 2435-43.
- 62) Otto EA, Ramaswami G, Janssen S, et al. Mutation analysis of 18 nephronophthisis associated ciliopathy disease genes using a DNA pooling and next generation sequencing strategy. *J Med Genet*. 2011; 48: 105-16.
- 63) Cohen AH, Turner MC. Kidney in Galloway-Mowat syndrome: clinical spectrum with description of pathology. *Kidney Int*. 1994; 45: 1407-15.
- 64) Colin E, Huynh Cong E, et al. Loss-of-Function Mutations in WDR73 Are Responsible for Microcephaly and Steroid-Resistant Nephrotic Syndrome: Galloway-Mowat Syndrome. *Am J Hum Genet*. 2014; 95: 637-48.