

Puromycin aminonucleoside 투여에 따른 사구체 족세포 β -catenin의 변화

충북대학교 의과대학 소아과학교실, 연세대학교 의과대학 소아과학교실*

최지영 · 안은미 · 박혜영 · 신재일* · 하태선

= Abstract =

The Change of Podocyte β -Catenin by Puromycin Aminonucleoside

Ji-Young Choi, M.S., Eun-Mi Ahn, M.S., Hye-Young Park, M.S.
Jae Il Shin, M.D.* and Tae-Sun Ha, M.D.

Department of Pediatrics, College of Medicine, Chungbuk National University Cheongju,
The Institute of Kidney Disease, Department of Pediatrics*,
Yonsei University College of Medicine, Severance Children's Hospital, Seoul, Korea

Purpose : To test whether the expression of β -catenin, a component of podocyte as a filtration molecule, would be altered by puromycin aminonucleoside (PAN) in the cultured podocyte *in vitro*.

Methods : We cultured rat glomerular epithelial cells (GEpC) with various concentrations of PAN and examined the distribution of β -catenin by confocal microscope and measured the change of β -catenin expression by Western blotting and reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR).

Results : We found that β -catenin relocated from peripheral cytoplasm to inner cytoplasm, therefore, intercellular separations were seen in confluent cultured cells by high concentrations of PAN in immunofluorescence views. In Western blotting of GEpC, PAN (50 μ g/mL) decreased β -catenin expression by 34.9% at 24 hrs and 34.3% at 48 hrs, compared to those in without PAN condition ($P < 0.05$). In RT-PCR, high concentrations (50 μ g/mL) of PAN also decreased β -catenin mRNA expression similar to protein suppression by 25.4% at 24 hrs and 51.8% at 48 hrs ($P < 0.05$).

Conclusion : Exposure of podocytes to PAN *in vitro* relocates β -catenin internally and reduces β -catenin mRNA and protein expression, which could explain the development of proteinuria in experimental PAN-induced nephropathy. (*J Korean Soc Pediatr Nephrol* 2011;15:138-145)

Key Words : β -Catenin, Puromycin aminonucleoside (PAN)-induced nephropathy, Glomerular epithelial cells (GEpC), Podocyte

*이 논문은 2007년도 정부재원(교육인적자원부 학술연구조성사업비)으로 한국학술진흥재단의 지원(기초과학연구 지원사업, 313-2007-2-E00269), 2010년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원(기초연구 사업, 2010-0005009)과 2009년도 대한신장학회 아스텔라스연구비에 의하여 수행되었음.

접수 : 2011년 9월 1일, 수정 : 2011년 10월 4일, 승인 : 2011년 10월 4일

책임저자 : 하태선, 충북 청주시 흥덕구 개신동 12 충북대학교 의과대학 소아과학교실

Tel : 043)269-6374 Fax : 043)264-6620 E-mail : tsha@chungbuk.ac.kr

This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/bync/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

소아 신증후군은 소아 단백뇨질환에서 매우 중요한 부분을 차지하고 있으며, 이중 미세변화형은 조직학적 원인으로 특발성 신증후군의 대부분을 차지한다[1, 2]. 이러한 미세변화형 신증후군의 병태생리의 연구를 위해 직접 환자 또는 이와 유사한 동물실험모델을 사용하는데, 이중 백서에게 puromycin aminonucleoside (PAN)를 주사하여 발생하는 단백뇨나 사구체 족세포(podocyte; glomerular epithelial cells, GEpC)에 특이적인 조직학적 변화, 예를 들면, 족돌기의 편평화와 탈락 등은 특발성 미세변화형 신증후군의 조직상과 매우 유사하며 이를 PAN (-유발성) 신증이라 한다[3-6]. GEpC의 이러한 변화는 생체 내 뿐만 아니라 생체 외, 즉, 배양상태의 GEpC에도 유사한 영향을 끼쳐서 PAN 신증과 유사하다[7-9].

사구체의 여과는 혈관내피세포, 사구체 기저막(glomerular basement membrane), 그리고 족세포에 의하여 이루어지며, 이중 족세포의 족돌기 사이의 세극막(slit diaphragm)이 여과의 마지막 단계인 선택적 여과에 관여한다[10, 11]. 세극막은 서로 다른 양측의 족세포들로부터 나온 족돌기들 사이를 연결하는 유일한 구조로서, 간상체(rod-like units)들이 지퍼형태의 선상구조를 이루고 있어 여과 장벽의 역할을 한다[12, 13]. 최근에 많은 연구에서 세극막 부위에 존재하는 여러 가지 단백질로 nephrin, P-cadherin, FAT, podocin 등이, 그리고 이들을 세포내부와 연결하는 단백질(adapter proteins)으로 zonula occludens-1 (ZO-1), catenin, CD2-associated protein (CD2AP) 등이 밝혀졌고, 이러한 단백질들의 변화가 사구체 질환에서 단백뇨의 병인이라고 추측된다[13-15]. 이중 β -catenin은 세포중

식에 중요한 역할을 하는 Wnt 신호전달에 핵심적인 단백질로[16], 핵 내에서 Lef/TCF family와 결합하여 유전자의 전사를 조절한다[17]. 한편으로는, 사구체에서 세포간의 중요한 접착분자로서 세극막에도 분포하는 cadherin에 결합하여 세포내부와 연결한다[13-15, 18].

본 연구에서는 배양한 족세포에서 PAN에 의한 β -catenin의 질적, 양적 변화연구를 통하여 실험적 신증후군의 발생에 있어서 β -catenin의 역할을 보고자 하였다.

대상 및 방법

1. 사구체 족세포 배양과 PAN 투여

백서의 사구체 상피세포(glomerular epithelial cells, GEpC)는 Kreisberg가 성상을 확인하고 공여한 세포를 배양하여 실험에 이용하였다[19]. 유지 배양액으로는 10% fetal bovine serum (FBS)과 1 M Hepes, 0.2 M L-glutamine, 0.01 U/mL insulin 그리고 항생제를 혼합한 RPMI 1640 배양액(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)을 사용하였고 배경을 줄이기 위해 각각의 실험 전에 FBS 0.5%만을 첨가하였다. 배양액 교환은 2일에 한 번씩 하였고 계대배양은 0.05% trypsin으로 이탈시킨 후 위의 배양액으로 다시 배양하였다[20]. 세포에 다양한 농도의 PAN (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)을 투여하고, 24시간 혹은 48시간 노출시켰고 대조군은 vehicle만 투여하였다.

2. Confocal microscopy를 이용한 β -catenin의 분포변화 관찰

백서의 사구체 상피세포를 collagen type-I (Up-

state Biotechnology Incorporation, Lake Placid, NY, USA)으로 coating한 glass cover slips에 각각의 조건으로 24시간 동안 배양을 하였으며 PBS로 3번 세척을 해준 후 4% paraformaldehyde를 200 μ L씩 실온에서 10분간 처리하여 세포를 고정하고 0.02 M glycine이 들어있는 PBS을 이용하여 3번 세척하였다. 그 후 10% normal goat serum (GIBCO BRL, Rockville, MD, USA)을 well 당 200 μ L씩 처리하여 37°C에서 30분간 배양한 다음, goat serum을 버리고 polyclonal rabbit 항 rat β -catenin (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) 항체를 1:100으로 희석하여 well 당 200 μ L씩 37°C에서 1시간 노출시킨 뒤 PBS를 이용하여 10분간 3번씩 shaker에서 세척하였다.

준비된 세포들에 이차항체로 Alexa-488 또는 TRITC-conjugated anti-rabbit IgG 항체 (Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 우선 25 μ g/mL으로 PBS에 희석하여 37°C에서 40분간 배양하고 0.1% triton X-100이 들어있는 PBS로 10분씩 2번 세척한 후 PBS로 2번을 10분간 세척하였다. 관찰은 Fluorescence microscope (TCS SP2 AOBS, Leica, Germany)으로 했는데 Alexa-488-conjugated는 emission 496-534 nm, excitation 488 nm의 파장에서 관찰하였으며, Alexa-594-conjugated는 emission 555-635 nm, excitation 594 nm의 파장에서 항원의 분포변화를 관찰하였다.

3. β -Catenin 단백질 측정

족세포를 6-well plate에 5×10^6 cells이 되도록 분주하여 confluence가 70-80% 되도록 세포를 배양하였다. 24시간, 48시간 지난 후에 protein extraction solution (PRO-PREP, Intron, Seongnam, Kyungki, Korea)을 well 당 400 μ L을 넣고 세포를 용해하였다. 이 용해물을 4°C 원심분리기로 13,200 rpm에서 30분간 원심분리하였고, 이로부터 얻은 세포 용해물의 상층액을 Bradford 방법으로 정량한

후 5X SDS loading dye와 혼합하여 95°C에서 5분간 가열하여 준비하였다. 준비된 시료를 10% polyacrylamide-SDS mini gel에 전기영동(SE 250 mini-vertical gel electrophoresis unit; Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA)하고 electroelution법을 이용하여 polyvinylidene fluoride (PVDF) membrane (Immobilon-P Membrane, Millipore, Bedford, MA, USA)에 200 mA로 4시간 30분 동안 전사시켰다(TE 22 tank transfer unit; Amersham Biosciences). PVDF membrane을 5% non-fat dry milk를 tris-buffered saline-0.1% tween20 (TBS-T)에 용해시켜 1시간 동안 처리한 다음, TBS-T로 간단히 세척하고 일차항체를 TBS-T에 희석하여 4시간 동안 반응시킨 후, PVDF membrane을 TBS-T로 5분간 3회 세척하였다. 이차항체(goat anti-rabbit IgG-HRP, Santa Cruz Biotechnology Inc.)를 1:5,000 희석하여 45분 동안 반응시킨 후, TBS-T로 5분간 3회 세척하였다. 반응이 모두 끝난 PVDF membrane을 West-Zol plus (Intron, Seongnam, Kyungki, Korea)의 용액 A와 B를 1:1로 섞어 PVDF membrane에 반응시킨 후 이를 LAS-3000 imaging system (Fujifilm Life Science, Minato-ku, Tokyo, Japan)에 노출시켜 이미지를 현상하였다. 단백질은 β -tubulin에 대한 항체(Santa Cruz Biotechnology Inc.)로 보정하였다. 현상한 이미지를 Multi Gauge V3.1 프로그램을 사용하여 band density를 측정하고, 이를 대조군 평균치에 100%에 대한 상대값으로 표시하였다.

4. β -catenin에 대한 RT-PCR

각 조건에서 배양한 세포를 RNA isolation solution과 chloroform으로 추출을 한 후에 isopropanol, 3% sodium acetate와 100% ethanol을 이용하여 침전시킨 다음 전체 RNA를 분리하였다. RNA 5 μ g의 농도로 AMV reverse transcriptase (Int-

ron, Korea)과 oligo-dT (KDR, Korea), 2.5 mM dNTP (Intron, Seongnam, Kyungki, Korea) 그리고 증류수로 최종 20 μ L로 부피를 맞춘 후 37°C에서 20분간, 42°C에서 50분간 반응 후 효소를 불활성화시킨 다음 합성된 cDNA를 주형으로 RT-PCR을 수행하였다.

사용한 β -catenin의 sense 염기서열은 5'-TG GACTACCACGCAGCGAAC-3'이며 β -catenin antisense의 염기서열은 5'-GCTCTGGCTTAGG CAACGC-3'이다. Housekeeper로서 백서의 GAPDH sense는 5'-CTCTACCCACGGCAAGT TCAA-3'이고, antisense의 염기서열은 5'-GGA TGACCTTGCCCACAGC-3'이었으며 Bionics (Korea)에 주문 제작하였다. 10 \times PCR buffer (Intron, Korea), 2.5 mM dNTP (Intron, Korea)와 각각의 특정 primer에 증류수를 더하여 전체 양을 25 μ L로 맞춘 후 94°C에서 5분간 가열한 다음 94°C 30초, 각각에 맞는 annealing 온도에서 1분간, 72°C에서 50초간 30 cycles를 시행하였다. 생성물을 2.0% agarose gel을 이용하여 각 시료의 PCR 생성물과 dye을 포함하여 15 μ L의 양을 전기영동하고 ethidium bromide로 염색하여 UV light 하에서 polaroid film에 감광시키고 densitometry (Lab-

Works 4.0, UVP, Inc. Upland, CA, USA)로 각각 측정된 후 GAPDH의 값으로 보정하였다.

5. 통계적 분석

대조군과 함께 각 항목에 대하여 Western 분석은 3회, RT-PCR은 3회 실험한 후 결과는 mean \pm standard deviation (SD)로 표시하였고, 실험군과 대조군간의 차이에 대한 통계적 유의성 분석은 독립 표본 T-검정법(SPSS version 12.0; SPSS Inc, Chicago, IL)을 사용하여 비모수적 Student's *t*-test 방법으로 처리되었으며, *P* 값이 0.05 미만일 때 통계학적으로 유의한 것으로 간주하였다.

결 과

1. Confocal 현미경을 이용한 β -catenin의 분포 관찰

항 β -catenin 항체를 처리하였을 때, 외곽세포질에 분포하는 β -catenin이 PAN의 농도가 올라갈수록 흐려지는 것을 볼 수 있다(Fig. 1A). 배양세포를 뿔뿔하게 자라게 한 후 같은 방법으로 관찰하였을 때

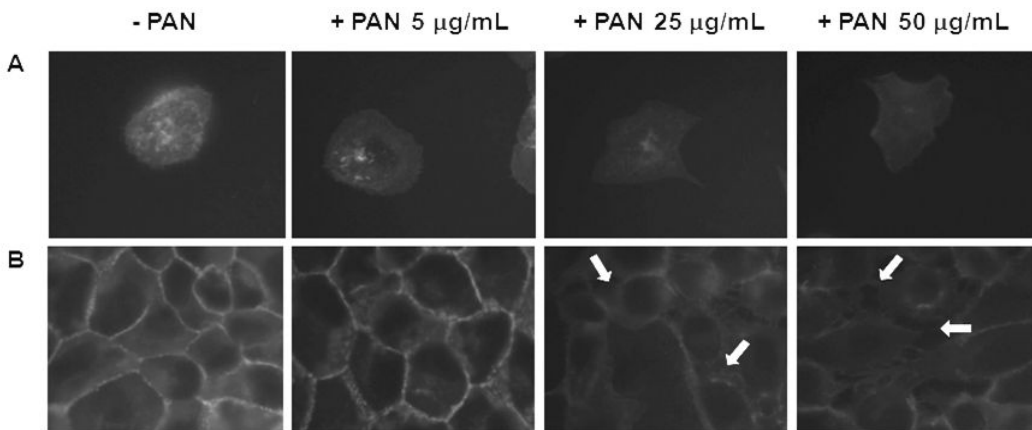


Fig. 1. Confocal microscopy of glomerular epithelial cells with β -catenin. Merged views show β -catenin becoming faint and relocalizing inward in single (A) and confluent cells (B, arrows) by PAN. Magnification, \times 1,000. PAN, puromycin aminonucleoside.

도, 세포사이의 β -catenin이 PAN의 농도가 올라갈수록 흐려지면서 간극이 생기는 것을 확인할 수 있었으며(화살표, Fig. 1B).

2. Western 분석을 이용한 β -catenin 단백질 측정

β -Catenin 단백질의 밴드는 90 kD 부위에서 관찰할 수 있었으며, β -catenin 단백질밴드의 두께는 β -tubulin 단백질결과로 보정하였다. 여러 농도의 PAN에 노출시킨 후 β -catenin 단백질을 관찰한 결과, 농도에 따라 감소하는 소견을 보였으나, 통계학적으로는 고농도인 50 μ g/mL에서 24시간과 48시간이 노출 조건에서 각각 34.9%와 34.3%의 의미 있는 감소소견을 보였다($P < 0.05$, Fig. 2).

3. RT-PCR을 통한 β -catenin의 expression 측정

GEpC에서 β -catenin에 대한 PCR 생성물을 300

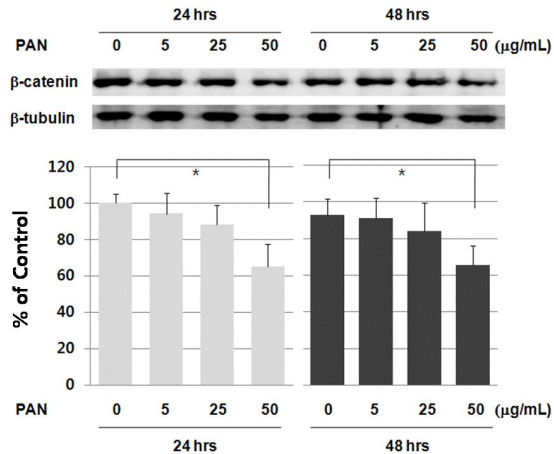


Fig. 2. Effects of PAN on cellular β -catenin protein levels in cultured cells assayed by Western blotting. β -Catenin levels decreased significantly at 24 hrs and 48 hrs by 50 μ g/mL of PAN ($P < 0.05$). Data are presented as mean \pm SD; n=3 per group. Control (100%); the value of PAN (-) at 24 hrs. * $P < 0.05$ versus control. PAN, puromycin aminonucleoside.

base pairs에서 확인할 수 있었으며, β -catenin mRNA의 표현양을 GAPDH mRNA의 표현양으로 보정한 후 PAN을 투여하지 않은 군의 결과에 대한 각 군의 결과를 비교하였다. RT-PCR에 의한 GEpC에서 β -catenin의 밴드 두께는 24시간에서는 고농도인 50 mg/mL PAN을 첨가한 조건에서 25.4%의 의미 있는 감소를 보였으며, 48시간에서는 25 mg/mL와 50 mg/mL PAN을 첨가한 조건에서 각각 46.6%와 51.8%의 의미 있는 감소를 보였다 (all $P < 0.05$, Fig. 3). 즉, 고농도의 PAN은 유전자 수준에서 족세포의 β -catenin의 생성을 억제시키며 이는 단백질의 감소소견으로 나타났다.

고찰

사구체 족세포에서 초기연구에서는 사구체에서 β -catenin이 발현이 안 되고 PAN 신증에서도 나타나지 않았다고 하였으나[21], 이는 사용한 항체 (pan-catenin)에 차이가 있었음이 후속 연구로 밝

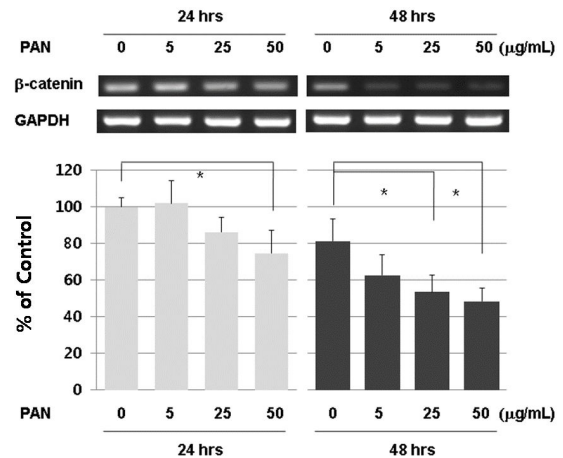


Fig. 3. Effects of PAN on cellular β -catenin mRNA levels in cultured cells assayed by RT-PCR. β -Catenin levels decreased significantly at 24 hrs by 50 μ g/mL of PAN ($P < 0.05$) and at 48 hrs by 25 and 50 μ g/mL of PAN ($P < 0.05$). Data are presented as mean \pm SD; n=3 per group. Control (100%); the value of PAN (-) at 24 hrs. * $P < 0.05$ versus control. PAN, puromycin aminonucleoside; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase.

혀지게 되었으며, 이후 후속 연구에서는 양성 결과를 보이면서 PAN 신증 등의 연구 결과들이 발표되기 시작하였다. Luimula 등[22]은 PAN 신증 동물모델의 사구체에서 단백뇨가 증가하기 시작하는 제3일째에 β -catenin 단백질이 이미 감소하며, 단백뇨가 제일 많은 제10병일째에도 약간의 회복만 보인다. 이들은 BD Transduction Laboratories 사의 항체를 이용하였다.

PAN 신증과 유사하게 단백뇨와 족세포 손상을 초래하는 adriamycin (-유발성) 신증에서, Liu 등[23, 24]의 그룹에서는 단백뇨발생과 더불어 분리한 사구체와 조직에서 신손상 소견인 섬유화와 함께 β -catenin 단백질의 증가를 발표하였다. 이들도 BD Transduction Laboratories 사의 항체를 이용하였다. 이와 함께 족세포 세극막의 주요성분인 nephrin과 podocin의 발현은 감소하여, adriamycin 신증에서 β -catenin 발현 증가와 함께 nephrin과 podocin의 발현감소에 의한 족세포 손상이 이 모델에서 단백뇨발생의 기전으로 추론하였다. 그러나 Heikkila 등[25]은 같은 adriamycin 신증모델에서 β -catenin을 유전적으로 결손시켰을 때 단백뇨와 족세포 손상소견이 나타나므로 이 모델에서 β -catenin의 결손이 단백뇨발생의 기전이라고 위 결과와는 상반된 추론을 하였다. 이들은 본 연구와 같은 Santa Cruz Biotechnology Inc. 사의 항체를 이용하였다.

최근 본 연구그룹에서 족세포 손상소견을 보이는 당뇨병성 신병증의 배양모델에서, advanced glycation endproducts (AGE)와 고농도의 당에 의하여 족세포의 β -catenin 단백질의 세포질 내로의 분포변화와 양의 감소를 관찰하여, 장기간 당뇨환경에서 족세포의 β -catenin 단백질의 감소변화를 알 수 있었다(unpublished data). 이와 유사한 모델로 세뇨관 상피세포 배양모델에서도 AGE가 GSK3 β 를 활성화시키면서, 이를 통하여 β -catenin 단백질을 감소시키고 제4형 collagen을 증가시켜서 당뇨환경에서 세뇨관 간질의 병적변화기전을 추론하였다[26]. 이상의 결과에서 β -catenin 단백질의 양적변화는 실험적

단백뇨모델에서 모델에 따라, 연구자에 따라, 사용한 실험재료에 차이를 보이는데, PAN 신증에서는 β -catenin 단백질은 본 연구와 같이 감소하는 소견을 보인다. 인간의 신증후군 질환에서 β -catenin 단백질의 변화에 대한 보고로서 Naves 등[27]은 국소분절성 사구체경화증 환자의 조직에서 β -catenin 단백질이 족세포 핵으로 재배치하며, 이와 함께 PAN에 의한 국소분절성 사구체경화증 동물모델에서 유전자발현이 감소하여 단백뇨의 발생에 Wnt/ β -catenin 경로가 관여할 것으로 추론하였다.

배양한 족세포의 β -catenin 단백질의 분포변화는 Heikkila 등[28]이 보고한 바 있다. 이들은 immortalized mouse podocytes를 배양하여, 본 연구보다 2배 많은 100 μ g/mL의 PAN에 24시간 노출시켜 β -catenin이 densin과 함께 세포 사이 세포막으로부터 세포질 내로 재분포함을 관찰하였다. 이는 본 연구의 결과와 매우 유사하다. 또한, 전술한대로 국소분절성 사구체경화증 환자와 동물모델에서 β -catenin 단백질이 족세포 핵으로 재분포하였다[27]. 이상의 보고를 종합하면, PAN은 족세포의 β -catenin 단백질의 양적, 질적 변화를 초래하여 족세포손상 소견, 즉, 단백뇨 등의 발생을 유발하는 것으로 사료된다. 향후 인간의 신증후군 질환과 함께 다른 동물모델연구를 통하여 이의 기전에 대한 연구가 필요하다.

결론적으로, PAN은 족세포에서 본래의 세포막 부위에서 내부로의 분포변화와 함께, Western blot 및 RT-PCR 분석에서 β -catenin mRNA의 발현 감소와 함께 단백질수준에서 양의 감소소견을 보였다. 이는 PAN에 의한 족세포 변화에 유전자 억제에 의한 β -catenin 단백질의 감소와 분포변화가 단백뇨의 발생에 기여할 것이라 사료된다.

요 약

목적: 단백뇨 질환의 실험모델인 puromycin aminonucleoside (PAN)에서 관찰할 수 있는 족세포

포의 병리학적 이상에 있어서 β -catenin의 변화를 생체 외 족세포 배양실험을 통하여 알아보하고자 하였다.

방법: PAN에 의한 족세포의 β -catenin의 변화를 생체 외 배양실험을 통해 알아보하고자 백서 사구체 상피세포를 배양하여 다양한 농도의 PAN을 투여하여 confocal 현미경을 통하여 β -catenin의 분포를 관찰하였고, Western blotting과 RT-PCR을 사용하여 β -catenin 발현의 변화를 관찰하였다.

결과: 외곽세포질에 분포하는 β -catenin이 단 일세포 혹은 응집환경에서 PAN의 농도가 올라갈수록 흐려지면서 세포간에 간극이 생기는 것을 볼 수 있었다. Western 분석에서, β -catenin 단백질은 PAN의 농도가 증가할수록, 특히, 고농도인 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 24시간과 48시간이 노출 조건에서 각각 34.9%와 34.3%의 의미 있는 감소소견을 보였다 ($P < 0.05$). 이러한 소견은 RT-PCR에서도 유사하게 보였으며, 24시간에서는 고농도인 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PAN을 첨가한 조건에서 25.4%의 의미 있는 감소를 보였으며, 48시간에서는 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PAN을 첨가한 조건에서 각각 46.6%와 51.8%의 의미 있는 감소를 보였다.

결론: PAN은 족세포에서 β -catenin을 세포막으로부터 내부로의 분포변화를 유발하고, β -catenin mRNA의 발현 감소와 단백질수준에서 양의 감소를 초래함으로써, PAN에 의한 족세포 내 분포변화에 유전자 억제에 의한 β -catenin 단백질의 감소로 단백질의 발생에 기여할 것이라 사료된다.

References

- 1) Churg J, Habib R, White RH. Pathology of the nephrotic syndrome in children: a report for the International Study of Kidney Disease in Children. *Lancet* 1970;760:1299-302.
- 2) Eddy AA, Symons JM. Nephrotic syndrome in childhood. *Lancet* 2003;362:629-39.
- 3) Ryan GB, Karnovsky MJ. An ultrastructural study of the mechanisms of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Kidney Int* 1975; 8:219-32.
- 4) Caulfield JP, Reid JJ, Farquhar MG. Alterations of the glomerular epithelium in acute aminonucleoside nephrosis: Evidence of formation of occluding junctions and epithelial cell detachment. *Lab Invest* 1976;34:43-59.
- 5) Messina A, Davies DJ, Dillane PC, Ryan GB. Glomerular epithelial abnormalities associated with the onset of proteinuria in aminonucleoside nephrosis. *Am J Pathol* 1987;126: 220-9.
- 6) Caulfield JP, Farquhar MG. Loss of anionic sites from the glomerular basement membrane in aminonucleoside nephrosis. *Lab Invest* 1978;39:505-12.
- 7) Fishman JA, Karnovsky MJ. Effects of aminonucleoside of puromycin on glomerular epithelial cells in vitro. *Am J Pathol* 1985; 118:398-407.
- 8) Ricardo SD, Bertram JF, Ryan GB. Reactive oxygen species in aminonucleoside nephrosis: In vitro studies. *Kidney Int* 1994;45: 1057-69.
- 9) Marshall CB, Pippin JW, Krofft RD, Shankland SJ. Puromycin aminonucleoside induces oxidant-dependent DNA damage in podocytes in vitro and in vivo. *Kidney Int* 2006;70: 1962-73.
- 10) Karnovsky MJ, Ainsworth SK. The structural basis of glomerular filtration. *Adv Nephrol Necker Hosp* 1972;2:35-60.
- 11) Remuzzi A, Remuzzi G. Glomerular permselective function. *Kidney Int* 1994;45:398-402.
- 12) Rodewald R, Karnovsky MJ. Porous substructure of the glomerular silt diaphragm in the rat and mouse. *J Cell Biol* 1974;60:423-33.
- 13) Reiser J, Kriz W, Kretzler M, Mundel P. The glomerular silt diaphragm is a modified adherens junction. *J Am Soc Nephrol* 2000;11: 1-8.
- 14) Mundel P, Shankland SJ. Podocyte biology

- and response to injury. *J Am Soc Nephrol* 2002;13:3005-15.
- 15) Haraldsson B, Nyström J, Deen WM. Properties of the glomerular barrier and mechanisms of proteinuria. *Physiol Rev* 2008;88:451-87.
 - 16) Fodde R, Brabletz T. Wnt/b-catenin signaling in cancer stemness and malignant behavior. *Curr Opin Cell Biol* 2007;19:150-8.
 - 17) Arce L, Yokoyama NN, Waterman ML. Diversity of LEF/TCF action in development and disease. *Oncogene* 2006;25:7492-504.
 - 18) Khoshnoodi J, Tryggvason K. Unraveling the molecular make-Up of the glomerular podocyte slit diaphragm. *Exp Nephrol* 2001;9:355-9.
 - 19) Kreisberg JJ, Hoover RL, Karnovsky MJ. Isolation and characterization of rat glomerular epithelial cells in vitro. *Kidney Int* 1978;14:21-30.
 - 20) Ha TS, Song CJ, Lee JH. Effects of advanced glycosylation endproducts on perlecan core protein of glomerular epithelium. *Pediatr Nephrol* 2004;19:1219-24.
 - 21) Yaoita E, Sato N, Yoshida Y, Nameta M, Yamamoto T. Cadherin and catenin staining in podocytes in development and puromycin aminonucleoside nephrosis. *Nephrol Dial Transplant* 2002;17:16-9.
 - 22) Luimula P, Sandström N, Novikov D, Holthöfer H. Podocyte-associated molecules in puromycin aminonucleoside nephrosis of the rat. *Lab Invest* 2002;82:713-8.
 - 23) Dai C, Stolz DB, Kiss LP, Monga SP, Holzman LB, Liu Y. Wnt/ β -catenin signaling promotes podocyte dysfunction and albuminuria. *J Am Soc Nephrol* 2009;20:1997-2008.
 - 24) He W, Kang YS, Dai C, Liu Y. Blockade of Wnt/ β -catenin signaling by paricalcitol ameliorates proteinuria and kidney injury. *J Am Soc Nephrol* 2011;22:90-103.
 - 25) Heikkilä E, Juhila J, Lassila M, Messing M, Perälä N, Lehtonen E, et al. β -Catenin mediates adriamycin-induced albuminuria and podocyte injury in the adult mouse kidneys. *Nephrol Dial Transplant* 2010;25:2437-46.
 - 26) Lin KH, Guh JY, Mo JF, Chiou SJ, Hwang CC, Chuang LY. Advanced glycation end-product-inhibited cell proliferation and protein expression of β -catenin and cyclin D1 are dependent on glycogen synthase kinase 3 β in LLC-PK1 cells. *Arch Biochem Biophys* 2008;477:27-32.
 - 27) Naves MA, Requião-Moura LR, Soares MF, Silva-Júnior JA, Mastroianni-Kirsztajn G, Teixeira VP. Podocyte Wnt/ β -catenin pathway is activated by integrin-linked kinase in clinical and experimental focal segmental glomerulosclerosis. *J Nephrol*. 2011 doi:10.5301/jn.5000017.
 - 28) Heikkilä E, Ristola M, Endlich K, Lehtonen S, Lassila M, Havana M, et al. Densin and beta-catenin form a complex and co-localize in cultured podocyte cell junctions. *Mol Cell Biochem* 2007;305:9-18.