



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2015년 2월
석사학위 논문

심장비대증에서 저밀도지단백수용체 연관 단백질-1의 역할 규명

조선대학교 대학원

의 과 학 과

박 슬 기

심장비대증에서 저밀도지단백수용체 연관 단백질-1의 역할 규명

Role of low density lipoprotein receptor-related protein 1
In cardiac hypertrophy

2015년 2월 25일

조선대학교 대학원

의 과 학 과

박 슬 기

심장비대증에서 저밀도지단백수용체 연관 단백질-1의 역할 규명

지도교수 송희상

이 논문을 이학 석사학위신청 논문으로 제출함

2014년 11월

조선대학교 대학원

의과학과

박슬기

박슬기의 석사학위논문을 인준함

위원장 조선대학교 부교수 방일수 (인)

위 원 조선대학교 조교수 이준식 (인)

위 원 조선대학교 조교수 송희상 (인)

2014년 11월

조선대학교 대학원

CONTENTS

List of Figures	1
Abstract	2
I. Introduction	4
II. Materials and Methods	7
II-1. 심근세포의 분리 및 배양	7
II-2. 심장비대증의 측정	8
II-3. Quantitative PCR (qPCR)	8
II-4. Western blot	9
II-5. 심근세포에 siRNA-LRP1 처리	10
II-6. Immunofluorescence 및 Immunocytochemistry (ICC)	10
II-7. 심장비대증 동물모델 (TAC 모델)	11
III. Results	12
III-1. 카테콜아민으로 유도된 심장비대증 확인	12
III-2. 심장비대증에서 LRP1의 발현량 변화	16
III-3. LRP1의 억제를 통한 심장비대증 억제	21
III-4. 심장비대증 동물모델 (TAC 모델)	25
III-5. 심장비대증 동물모델 (TAC 모델) 에서 LRP1의 변화	29
IV. Discussion	32
V. References	35
VI. 감사의 글	42

List of Table

Table 1. Primer sequences for qPCR

List of Figures

Figure 1. Cell area, Protein/DNA ratio and Immunofluorescence were increased in catecholamines such as phenylephrine (PE) and norepinephrine (NE)-treated neonatal rat cardiomyocytes (NRCM).....14

Figure 2. Low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) expression level is altered in PE, NE-stimulated NRCM.....18

Figure 3. Silencing LRP1 attenuates cardiac hypertrophy induced by PE, NE.....22

Figure 4. Transverse aortic constriction (TAC) model.....26

Figure 5. LRP1 expression level is altered in TAC model.....30

Abstract

Role of low density lipoprotein receptor-related protein 1 in cardiac hypertrophy

Seulki Park

Advisor: Assistant Prof. Heesang Song, Ph.D.

Department of medical science,
Graduate school of Chosun University

Cardiac hypertrophy is one of risk factors associated with heart failure which is the number one cause of death worldwide. Since it has been reported that α_2 -macroglobulin induces cardiomyocyte hypertrophy, we hypothesized that a reduction of low density lipoprotein receptor-related protein 1 (LRP1) would decrease cardiac hypertrophy induced by catecholamines such as, phenylephrine (PE) and norepinephrine (NE). We confirmed that cell size and protein/DNA ratio were increased in PE- or NE-treated neonatal rat cardiomyocytes (NRCM). First, we observed that the expression levels of LRP1 were significantly increased in PE- or NE-treated NRCM by ~ 3 or ~ 2 folds, respectively, higher than non-treated controls. The mRNA levels of hypertrophic markers such as, ANF, BNP, β -MHC, and HPRT were also significantly increased in PE- or NE-treated NRCM. In order to investigate the role of LRP1 in cardiac hypertrophy, we silenced LRP1 by

specific siRNA molecules. We could observe the ~ 70 % down-regulation of LRP1 expression and cell area were successfully rescued to normal levels in LRP1 siRNA transfected NRCM with PE or NE. The increased protein/DNA ratio by PE- or NE-treatment was also decreased to normal values in LRP1 siRNA co-treated NRCM. In addition, we observed that the LRP1 expression level was upregulated in the after 4 ~ 5 weeks of transverse aortic constriction surgery. Our results suggest that LRP1 has a critical role in catecholamine-induced cardiac hypertrophy, which might be a potential target for treatment of cardiac hypertrophy.

]

I. Introduction

3 대 성인병의 하나인 심장질환은 고혈압, 심근경색, 심장판막 질환 등에 의해 유발[1,2]되는데, 비대증은 이를 포함하여 어떤 원인으로부터 심장이 과부하 되는 반응이다[3]. 특히 심장비대증이 장기간 지속되면 결국 확장형 심근증과 심부전증을 일으켜 사망에 이르는 것으로 알려져 있다[2]. 단순한 심장비대증은 대부분의 경우 이뇨제를 사용하여 증상에 대한 조절[4]을 시도하지만, 그 원인 질환에 따라 치료법에 다소 차이가 있다[5]. 심부전 증상이 동반될 경우 이뇨제 이외에, 안지오텐신 전환 효소 억제제나 안지오텐신 수용체 차단제, 알도스테론 차단제, 베타 차단제 등의 약물 치료를 하기도 한다[6,7,8,9]. 고혈압이 주된 원인일 경우에는 고혈압 약제를 사용하는 것이 심장비대에 대한 치료가 되지만 혈압약은 결과적으로 혈압을 낮추는 과정에서 혈액순환이 약해지면 혈압을 올리려는 신체의 본능적인 항상성 반응은 더욱 강해지게 된다. 이런 반응에 의해 또다시 심장의 박동은 더욱 강하고 빨라지는 악순환을 낳을 것이다[10]. 이처럼 이 분야의 연구가 계속되어 왔지만 정확한 조절기전이나 치료법이 개발되지 않고 있다.

저밀도지단백수용체 연관 단백질-1 (LRP1) 은 저밀도지단백수용체 집단 (LDLR family) 에 속하는 매우 큰 세포막 수용체이다[11,12,13]. LRP1 은 구조적 및 기능적으로 서로 다른 ligand 와 결합하여 세포 내로 이입할 수 있는 능력을 가졌으며, 초기 배아의 발달과 각종 질병의 발병 시 중요한 역할을 하기 때문에 LDLR family 에서 아주 독특한 수용체이다[12,14,15]. LRP 의 세포 외 도메인은 각각 2, 8, 10, 11 가 반복된 네 개의 클러스터에 ligand 가 결합되는데[11,15],

대부분 두 번째와 네 번째 클러스터가 ligand 결합을 중재하는 것으로 밝혀졌다[16,17,18]. LRP1 은 ~ 600 kDa 의 단일 폴리펩타이드로 합성되어 있는데, 이는 furin 에 의해 절단 되어 서로 비공유결합으로 연관된 세포 외 도메인 (515 kDa) 과 막에 걸쳐진 짧은 조각 (85 kDa) 인 두 개의 subunit 로 존재한다[19,20].

LRP1 은 apolipoprotein, proteinases, α_2 -macroglobulin/protease complexes, 그리고 MMPs 와 urokinase-type plasminogen activator (uPA) 등과 같은 extracellular matrix proteins 를 포함한 약 40 개의 ligand 와 결합[12,21]하여 세포 내로 이입하고 신호를 매개한다. LRP1 은 약 40 개의 ligand 중의 하나인 α_2 -macroglobulin 을 수용하기 때문에 α_2 -macroglobulin receptor (A2MR) 로써 알려져 있다[11,22]. 기존에 보고된 바에 의하면 α_2 -macroglobulin 은 ERK 1, 2 와 PI3-kinase/Akt 통로를 통해 심장비대증을 유도한다고 밝혀졌다[23]. 현재까지 LRP1 이 뇌에서 알츠하이머 질병과의 관계가 밝혀졌고[24,25], 전뇌에서 LRP1 이 결핍된 쥐는 비만이 된다는 연구[26]뿐만 아니라, LRP1 이 Wnt 신호와 관련하여 콜레스테롤 저장과 지방산 합성을 조절하는 연구 결과[27] 등 활발한 연구가 진행되어 왔다. 이처럼 축적된 증거들에 의하면 LRP1 의 변화량은 알츠하이머 질병, 암, 동맥경화 등 다양한 질병에 밀접하게 관련되어 있지만 심장질환에서 LRP1 의 역할은 거의 알려진 바가 없다. 또한 심장비대증에서 LRP1 의 정확한 조절기전은 규명되지 않았다.

이전의 연구결과에서 α_2 -macroglobulin 의 cardiac isoform 은 생체 내에서 심장비대증을 유도한다고 입증하였고[28,29], 게다가 α_2 -macroglobulin 이 심장비대증을 유도한다고 밝혀졌으므로[23] 우리는 α_2 -macroglobulin receptor (A2MR) 인 LRP1 이 심장비대증을 유도할 것이라는 가설을 세웠다. 즉, 페닐에프린

(PE) 또는 노르에피네프린 (NE) 등과 같은 카테콜아민으로 유도된 심장비대증[30,31]에서 LRP1 이 억제되면 심장비대증도 억제되는지를 조사하였다. 따라서 본 연구의 목표는 심장비대증에서 LRP1 의 효과를 밝혀내고, 이러한 과정에서 LRP1 의 조절기전을 확인하는 것이다.

신생아 쥐의 심근세포에서 카테콜아민으로 유도된 심장비대증은 LRP1 의 단백질 발현량이 증가되었고, 더 나아가 LRP1 의 억제를 통해 심장비대증이 억제될 수 있음을 밝혀냈다. 추가적으로, 대동맥을 가로질러 수축시켜 만든 심장비대증 동물모델인 transverse aortic constriction (TAC) 모델에서 LRP1 이 과발현된 것을 확인했다. 그러므로 본 연구는 LRP1 이 심장비대증을 치료할 수 있는 잠재적인 타겟으로 중요한 역할이 될 수도 있을 것이라 생각된다. 이와 관련하여 심장비대증을 조절 할 수 있는 가능성이 있는 새로운 목표 물질로써 LRP1 의 기전이 반드시 규명 되어야 한다.

II. Materials and Methods

II-1. 심근세포의 분리 및 배양

신생아 쥐의 심근세포는 이미 입증된 실험 방법을 토대로 하여 세포를 분리 및 배양하였다[32]. 간략히 설명하면, 1 ~ 3 일 된 백서 (Sprague Dawley Rat) 의 심장을 분리하여 칼슘과 마그네슘이 빠진 phosphated buffer saline (PBS, pH7.4, Gibco) 에 넣은 다음, micro dissecting scissor를 사용해 심근세포가 1 mm³ 정도 될 때까지 절단하였다. 5 ml 의 collagenase II (0.8 mg/ml, 262 units/mg, Gibco BRL) 를 넣고 나서 37 °C, 5 % CO₂ 에 5 분간 배양한 후, collagenase II 부유액을 제거하였다. 5 ml 의 새로운 collagenase II 를 첨가하고 5 분간 더 배양한 다음, 새 튜브에 상등액을 옮기고 세포 배양 배지 (10 % FBS α-MEM, Gibco BRL) 을 첨가한 후, 4 분간 1200 rpm 에서 원심분리 하였다. 5 ml 의 배양 배지에 세포 침전물을 다시 부양한 다음, 심근세포가 거의 남지 않을 때까지 7 ~ 9 번 반복 실험하여, cell suspension을 하나의 튜브에 모았다. 심근세포들만을 모아 5 × 10⁵ cells/ml 의 농도로 100 mm 세포배양 플레이트에서 배양하였다. 4 ~ 6 시간이 경과한 후, 신선한 배지로 갈아준 다음, 0.1 mM 의 BrdU를 첨가하여 fibroblast의 성장을 억제시키면서 배양하였다.

11-2. 심장비대증의 측정

세포 면적은 Image J 를 사용하여 무작위로 고른 세포들로 디지털 현미경 이미지 (Olympus phase contrast microscope; Olympus, Tokyo, Japan) 에서 수동으로 세포 윤곽을 측정하였다.

단백질/DNA 비율은 각각의 샘플을 사용하여 측정하였다. 먼저 단백질은 세포배양 접시의 세포들을 PBS으로 씻어준 다음 PBS를 걷어냈다. 그런 다음 1 N NaOH를 넣고 60 °C 에서 30 분간 배양한다. 파이펫팅으로 세포들을 모아준 뒤 새 튜브로 옮기고 14,000 rpm 에서 3 분간 원심분리 하였다. 깨끗한 새 튜브에 상층액을 옮기고, 단백질은 Bradford 시약 (1:4) 을 사용하여 측정하였다. DNA는 PureHelix™ Genomic DNA Prep Kit (Nano Helix) 의 사용설명서를 따라 추출하였다. 각 샘플의 DNA 농도는 260 nm 에서 spectrophotometer (Eppendorf) 로 측정하였다. 모든 실험은 3 번 이상 반복하였다.

11-3. Quantitative PCR (qPCR)

RNA는 PureHelix™ Total RNA Purification Kit (Nano Helix) 의 사용설명서를 따라 추출하였다. 각 샘플의 RNA 농도는 260 nm 에서 spectrophotometer (Eppendorf) 로 측정하였다. 그런 다음 RNA는 PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 를 사용하여 reverse transcribe 되었고, qPCR은 RealHelix™ qPCR kit (Nano Helix) 를 사용하여 Rotor-Gene 3000™ 을 사용하여 실행했다. 프라이머의 서열은 Table 1 에 나열하였다.

11-4. Western blot

세포들을 PBS 로 세척해 준 다음 1 x RIPA buffer (1 mM PMSF) 로 suspension 시켜 4 °C 에서 10 분간 용해시켰다. 그런 다음 12,000 rpm, 4 °C 에서 15 분간 원심분리를 한 후 상등액을 분리하여 BSA protein assay reagent (Pierce) 로 정량한 뒤, 사용하는 항체의 datasheet 를 확인하여 샘플의 변성 여부를 결정하였다. 그 다음 동량의 단백질을 크기에 맞게 6 ~ 15 % SDS-PAGE (Sodiumdodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Qbiogene) 에 loading 후 전기영동 하였다. 원하는 크기의 gel 을 자른 후 polyvinylidene difluoride (PVDF; Millipore) transfer membrane 과 transfer buffer (20 mM Trizma®base; Sigma, 190 mM Glycine; Sigma, 20 % Methanol; Duksan) 를 사용하여 단백질을 이동, 고정시켰다. 단백질이 이동된 멤브레인은 5 ~ 10 % skim milk 와 TBS-t (1 x TBS, 0.1 % tween-20) 를 혼합한 blocking buffer 에서 1 시간 방치 시켰다. 원하는 일차 항체 β -actin (1:1,000)(sigma), LRP1의 α subunit (1 μ g/ml), LRP1의 β subunit (0.5 μ g/ml) 를 넣어 2 시간 ~ overnight 반응시켰다. TBS-t 로 5 번 세척하고 Horseradish peroxidase (HRP) 가 부착된 이차 항체를 넣어 1 시간 반응 하였다. 반응이 끝나면 TBS-t 로 5 번 세척하고 Enhanced chemiluminescence plus western blotting system (ECL; Amersham Biosciences) 을 이용하여 발광시킨 후 암실에서 HyperfilmTMECL (AmershamBiosciences) 로 밴드를 현상하였다.

11-5. 심근세포에 siRNA-LRP1 처리

심장비대증에서 LRP1의 역할을 조사하기 위해 우리는 특정 siRNA 분자를 이용하여 LRP1을 억제시켰다. 간략히 설명하면, siLentFect™ Lipid Reagent (Bio-Rad) 의 사용설명서를 따라 Opti-MEM (Gibco) 을 사용하여 심근세포에 siRNA-LRP1 (20 nM) 을 감염시켰다. siRNA-LRP1은 48 시간 동안 유지한 뒤 24 시간 동안 starvation medium으로 교체되었다. 그 이후에 페닐에프린 (PE) 또는 노르에피네프린 (NE) 을 첨가하여 24 시간 후 세포들을 철저하게 세척하고 LRP1 발현을 테스트하기 위해 수확하여 실험을 진행하였다.

11-6. Immunofluorescence 및 Immunocytochemistry (ICC)

Immunofluorescence 및 Immunocytochemistry (ICC) 은 심근세포를 coverslips 위에 plating 하고 조건에 맞게 처리 한 뒤 실험을 진행하기 위해 세포를 4 % 포르말데하이드에서 15 분 동안 고정 시켰다. PBS에서 5 분간 3 번 세척한 후, 0.2 % Triton X-100 으로 permeable 과정을 실행했다. 세포 골격을 보기 위해 액틴은 phalloidin-Texas Red (1:200) 로, 핵은 DAPI (1:5,000) 로 표지 했다. Immunocytochemistry은 LRP1로 표지 했다. PBS로 세척 한 후, 원하는 일차항체 LRP1의 α subunit, LRP1의 β subunit을 넣어 1 시간 동안 배양했다. 샘플을 세척하고 이차항체 (conjugated with Texas Red, Santa Cruz) 에 DAPI를 함께 섞어 30 분 동안 배양했다. PBS로 최종 세척 후, 염색된 샘플은 슬라이드에 fluoromount (Sigma) 으로 고정시켰다. 형광으로 표지된 샘플의 이미지는 Olympus FluoView FV1000 confocal system (Olympus) 를 사용하여 Zeiss Axiovert 200 M

microscope (Carl Zeiss MicroImaging) 에서 수행 하였다.

11-7. 심장비대증 동물모델 (TAC 모델)

백서에서 심장비대증은 Transverse Aortic Constriction (TAC) 방법을 통해 유도했다. 일반적인 마취 하에 8 주령의 Sprague-Dawley 수컷 쥐 (약 250 g) 의 기도에 관을 삽입하고, 양성 압력 순환 (180 ml/분) 은 Harvard ventilator 를 사용하여 산소 (2 L/분) 가 첨가된 실내 공기에 의해 유지되게 했다. 쥐 심장은 2 cm 로 좌측면 개흉술로 노출하며, 대동맥에 22 게이지를 올려두고 실로 묶었다. 근육층과 피부절개는 4-0 비단 봉합사로 묶고 사육실에서 정상적인 환경으로 키웠다.

III. Results

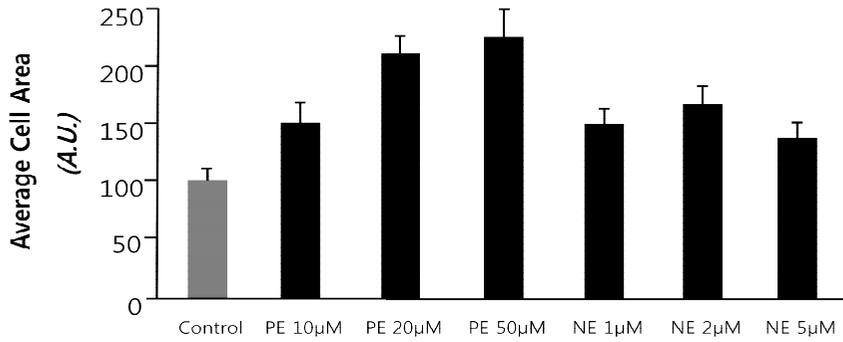
III-1. 카테콜아민으로 유도된 심장비대증 확인

심근세포에서 페닐에프린 (PE) 과 노르에피네프린 (NE) 등과 같은 카테콜아민은 심장비대증을 유도하는 물질로써 널리 사용되어왔다[33]. Figure 1 은 카테콜아민으로 유도된 심장비대증을 확인하고 실험에서 카테콜아민의 농도를 결정하기 위해 진행하였다.

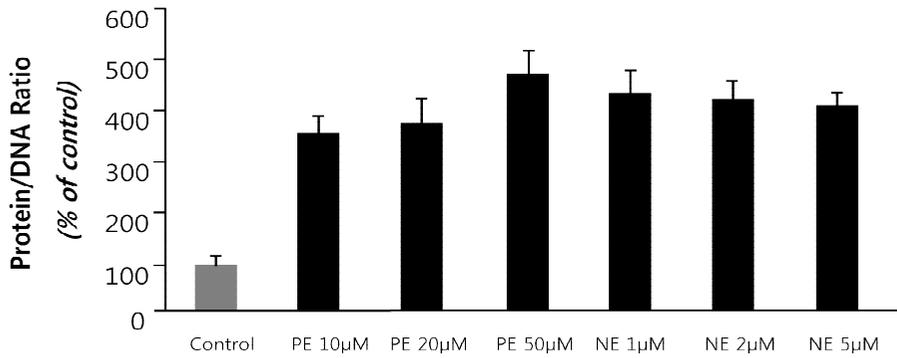
심장비대증이란 단백질 함량 증가[34]로 인해 세포의 크기가 증가하게 되고 결국 세포 기관도 증가하게 된다. 이것은 복제되는 것이 아니라 단순히 DNA는 변함없이 세포 크기만 커지는 것이다. 신생아 쥐의 심근세포에서 카테콜아민이 심장비대증을 유도하는지 확인하기 위해 심근세포에 PE (10, 20, 50 μ M) 또는 NE (1, 2, 5 μ M) 을 농도 별로 각각 48 시간 동안 처리한 뒤 세포 면적, 총 단백질/DNA 비율, 세포골격을 조사했다 (Figure 1). PE와 NE을 처리했을 때 세포 면적이 모두 증가되었는데, 아무런 처리를 하지 않은 컨트롤에 비해 NE이 1.5 배 정도 증가하였고 특히 PE는 1.5 ~ 2.3 배 정도 증가한 것을 확인할 수 있었다 (Figure 1A). 카테콜아민으로 유도된 심장비대증을 좀 더 확인하기 위해 추가적으로 단백질/DNA 비율과 Immunofluorescence을 사용하였다. 단백질/DNA 비율에서 단백질의 양이 약 4 배 정도 증가된 것으로 보아 카테콜아민이 심장비대증을 유도함을 확인하였다 (Figure 1B). 또한 액틴과 결합하는 팔로이딘을 통해 확인한 결과 마찬가지로 카테콜아민을 처리했을 때 세포골격이 상당히 증가되었음을 확인하였다 (Figure 1C). Figure 1 에서 데이터는 보여지지 않았지만, 똑같은 실험 조건에서 PE, NE 이외에

안지오텐신II (Angiotensin II) 를 처리했을 때 역시 심장비대증을 유도하는 것을 확인했다. 이러한 결과는 카테콜아민이 심장비대증을 유도한다는 것을 다시 한 번 확인하고, 심장비대증이 확실히 이루어진 상태에서 실험이 진행되었음을 보여준다.

A



B



C

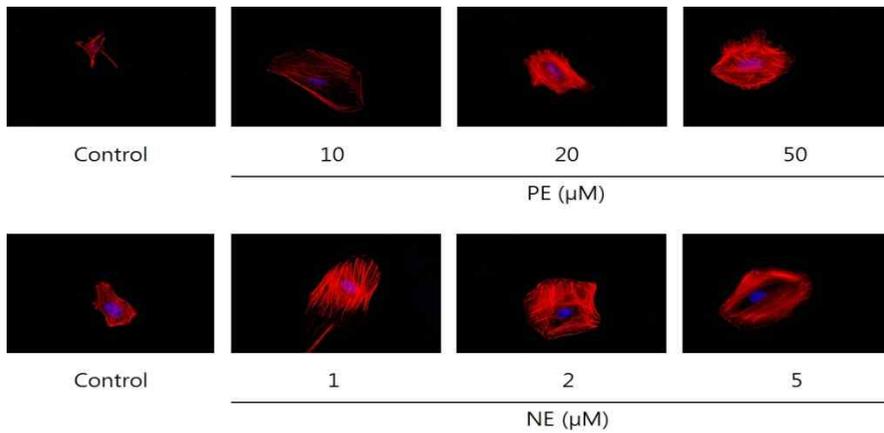


Figure 1. Cell area, Protein/DNA ratio and Immunofluorescence were increased in catecholamines such as phenylephrine (PE) and norepinephrine (NE)-treated neonatal rat cardiomyocytes (NRCM).

NRCM were incubated with serum starvation for 24 hours and then treated with increasing concentrations of PE (10, 20, 50 $\mu\text{mol/L}$) or NE (1, 2, 5 $\mu\text{mol/L}$) for 48 hours. (A) Cell area was quantified from manually outlined cells in digitized microscopic images of randomly chosen cell fields using Image J. (B) Protein/DNA ratio was quantified on the same individual samples. PE or NE-induced increase of protein synthesis in cardiomyocytes. (C) The actin cytoskeleton was visualized by staining with phalloidin and DAPI. Immunofluorescence images were obtained by confocal microscope after 48 hours treatment with PE (10, 20, 50 $\mu\text{mol/L}$) or NE (1, 2, 5 $\mu\text{mol/L}$).

III-2. 심장비대증에서 LRP1의 발현량 변화

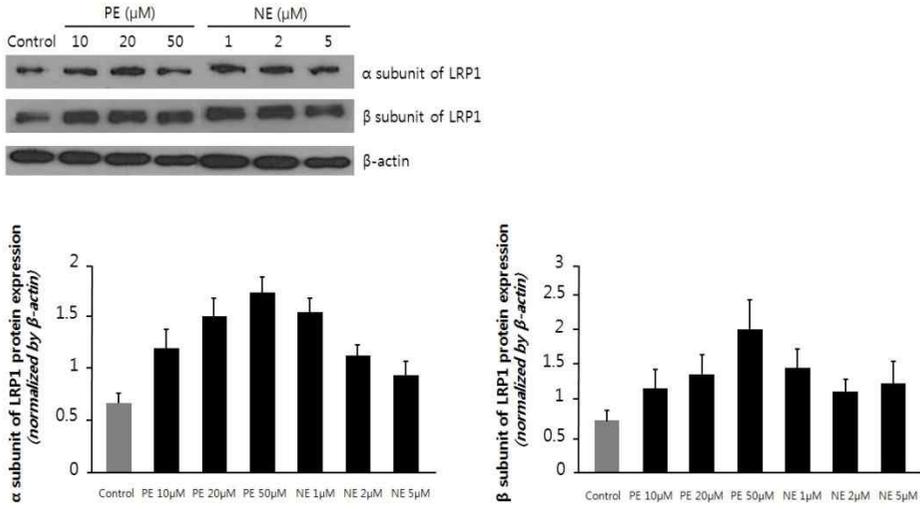
이미 α_2 -macroglobulin이 ERK 1, 2 와 PI3-kinase/Akt 통로를 통해 쥐의 심근비대증을 유도한다는 사실이 보고된 바 있다[23]. 그러나 α_2 -macroglobulin을 ligand로 도메인에 붙어 신호를 전달하는 LRP1과 심장비대증의 관계는 현재까지 어떠한 자료도 보고 된 바가 없다.

먼저 우리는 LRP1이 심장비대증을 유도하는지 알아보기 위해 신생아 쥐의 심근세포에 PE (10, 20, 50 μ M) 또는 NE (1, 2, 5 μ M) 을 48 시간 처리한 뒤 western blot을 통해 분석했다. Western blot은 α subunit (515 kDa) 과 β subunit (85 kDa) 의 LRP1 항체를 사용하였는데, 그 결과 단백질 발현량이 증가된 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 2A). 심장비대증에서 LRP1의 mRNA 발현량을 알아보기 위해서 아래 Table 1 에 제시된 프라이머를 사용하여 qPCR로 확인하였다. 신생아 쥐의 심근세포에 카테콜아민을 12 시간을 처리한 뒤 기존에 널리 사용되어왔던 비대성을 확인할 수 있는 표지물의 mRNA 발현량을 확인한 결과 ANF, BNP, Skeletal α -actin이 상당히 높게 발현된 것을 볼 수 있었다. 여기에서 흥미로운 사실은 심장비대증에서 LRP1의 mRNA 발현량은 감소했다 (Figure 2B). 이것은 LRP1의 단백질 발현량과는 반대의 결과를 나타내는데, 이 부분에 있어서는 고찰에서 자세히 언급할 것이다. Immunocytochemistry (ICC) 을 통해 카테콜아민으로 유도된 심근세포에서 LRP1의 발현량을 확인한 결과 아무런 처리를 하지 않은 컨트롤에 비해 심장비대를 유도한 심근세포에서 LRP1의 발현량이 상당히 많은 것을 확인할 수 있었다 (Figure 2C). 이러한 결과로 인해 LRP1을 억제하면 심장비대증을 억제할 수 있을 것이라 추측된다.

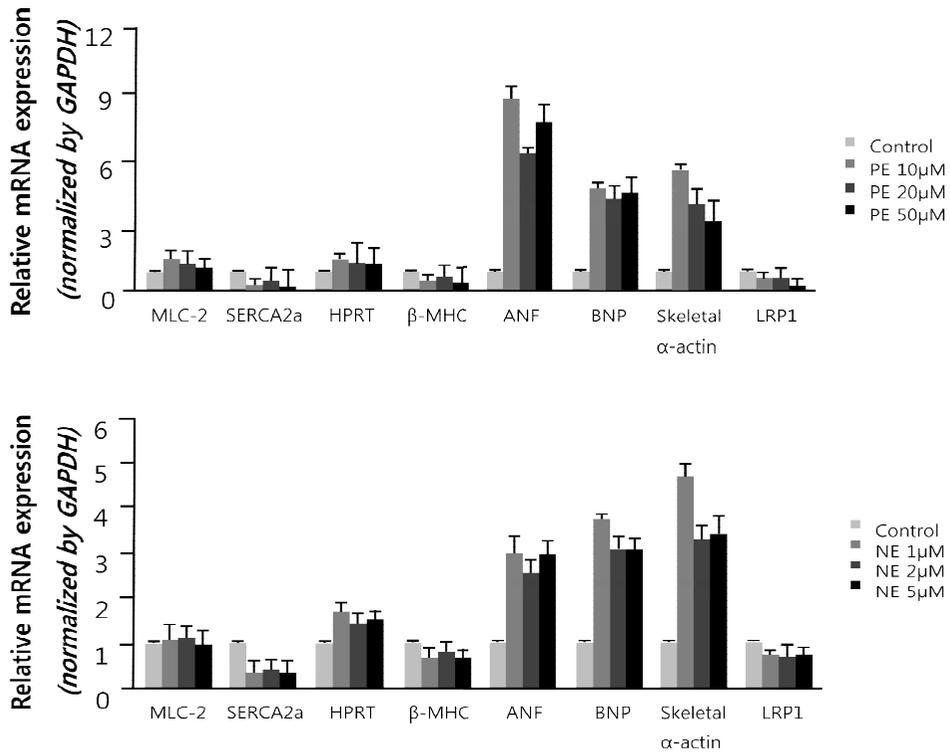
Table 1. Primer sequences for qPCR

Gene	Forward primer sequence (5' - 3')	Reverse primer sequence (5' - 3')
HPRT	CCAGCGTCGTGATTAGCGAT	CAAGTCTTTTCAGTCCTGTCC
ANF	ATGGGCTCCTTCTCCATCAC	TCTTCGGTACCGGAAGCTG
BNP	GGGCTGTGACGGGCTGAGGTT	AGTTTGTGCTGGAAGATAAGA
Skeletal α -actin	TCAGGCGGTGCTGTCTCTCT	TCCCCAGAATCCAACACGAT
β -MHC	GCAGCTTATCAGGAAGGAATAC	CTTGCGTACTCTGTCACTC
MLC-2	TCACAATCATGGACCAGAACAGA	TGATCATCTCATCGATCTCTTCGT
SERCA-2a	CGAGTTGAACCTTCCCACAA	AGGAGATGAGGTAGCCGATGAA
GAPDH	CAGTGCCAGCCTCGTCTCAT	TGGTAACCAGGCGTCCGATA

A



B



C

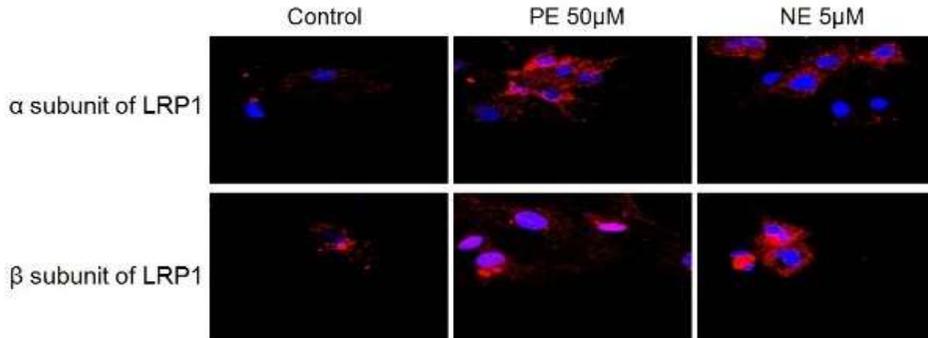


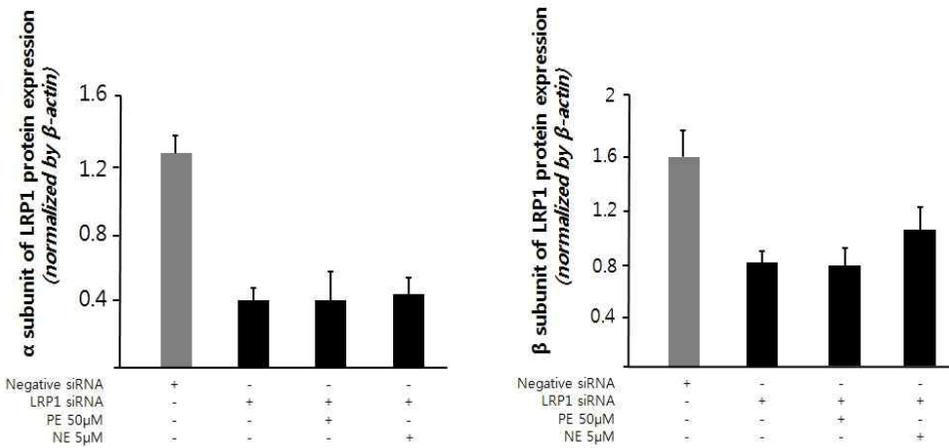
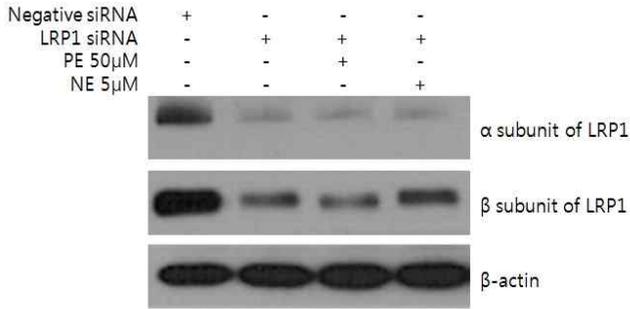
Figure 2. Low density lipoprotein receptor -related protein 1 (LRP1) expression level is altered in PE, NE -stimulated NRCM.

(A) Western blotting was performed with antibodies against the α subunit of LRP1 and β subunit of LRP1. LRP1 protein expression level was upregulated by PE, NE. Protein levels were normalized to β -actin. (B) Rat cardiomyocytes were treated for 12 hours with PE or NE, and mRNA level were investigated by quantitative PCR (qPCR). The mRNA levels of LRP1 were decreased in PE, NE-treated NRCM. (C) Immunocytochemistry were conducted for the evaluation of the altered amount of LRP1 expression.

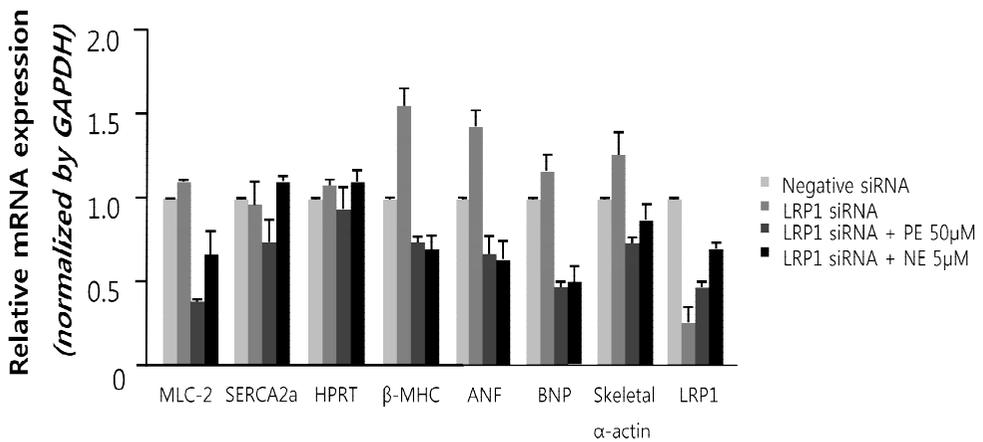
III-3. LRP1의 억제를 통한 심장비대증 억제

심장비대증에서 LRP1의 역할을 조사하기 위해 우리는 특정 siRNA 분자를 이용하여 LRP1을 억제시켰다. 심근세포는 실험 및 방법에 쓰여진 대로 LRP1 siRNA, control, scrambled siRNA를 통해 일시적으로 감염시켰고, 48 시간 후 세포는 50 μ M PE 또는 5 μ M NE으로 처리되었다. 심근세포에서 siRNA-LRP1 처리는 LRP1의 단백질 발현량을 최대 ~ 70 % 까지 줄였다 (Figure 3A). 카테콜아민으로 인해 증가되었던 ANF, BNP, Skeletal α -actin의 mRNA 발현량이 큰 폭으로 줄어든 반면에 감소되었던 SERCA2a는 정상 수치로 회복된 것을 확인하였고, LRP1 mRNA 발현량 역시 줄어든 것을 관찰하였다 (Figure 3B). 동일한 실험 조건에서 LRP1 siRNA로 감염된 신생아 쥐의 심근세포에 카테콜아민을 처리한 뒤 세포 면적을 측정된 결과 약 0.6 배 정도 줄어 들었다 (Figure 3C). 또한 카테콜아민으로 인해 증가되었던 단백질/DNA 비율은 LRP1 siRNA로 감염된 신생아 쥐의 심근세포에서 정상 수준으로 상당히 감소된 것을 확인하였다 (Figure 3D). Figure 3E 에서 보여진 것처럼 액틴과 결합하는 팔로이딘을 통해 확인한 결과 LRP1 siRNA를 처리한 심근세포는 PE 또는 NE을 처리했을 때 세포골격이 증가 되지 않음을 관찰했다. 이러한 결과는 LRP1을 억제하게 되면 카테콜아민을 처리해도 심장비대증을 억제할 수 있다는 것을 알 수 있다.

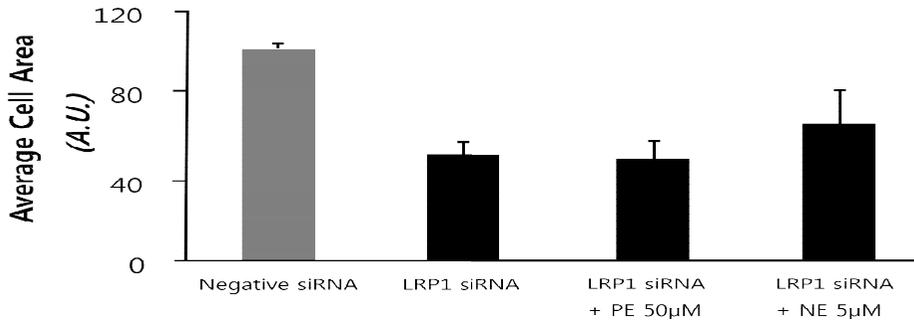
A



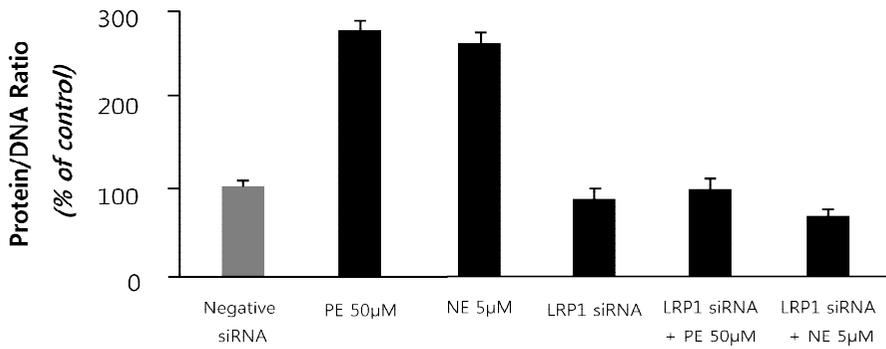
B



C



D



E

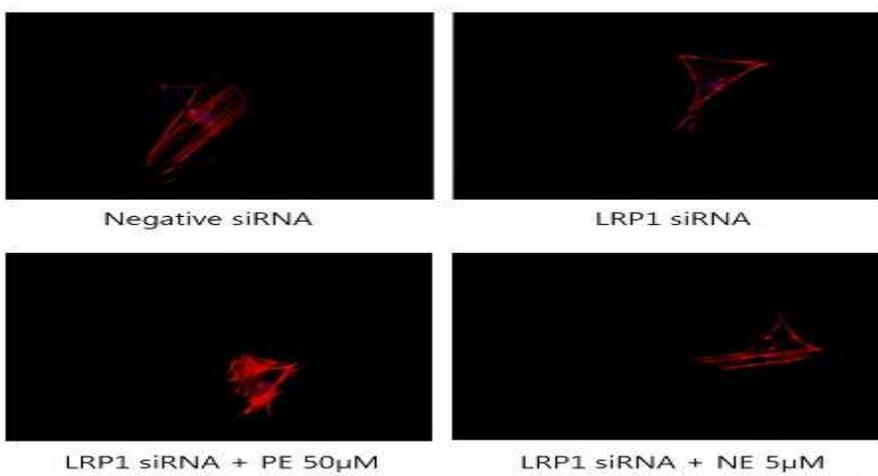


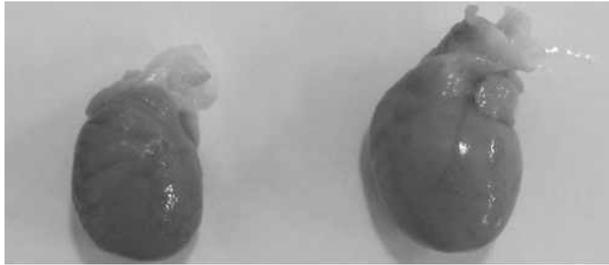
Figure 3. Silencing LRP1 attenuates cardiac hypertrophy induced by PE, NE

Cardiomyocytes were transiently transfected with LRP1 siRNA or with control. After 48 hours, cells were treated with 50 μ M PE or 5 μ M NE for 24 hours. (A) siRNA-LRP1 treatment reduced LRP1 protein expression in cardiomyocytes. (B) LRP1 mRNA expression levels was decreased in LRP1 siRNA transfected NRCM with PE or NE. (C) Cell area were successfully rescued to normal levels in LRP1 siRNA transfected NRCM with PE or NE. (D) The increased protein/DNA ratio by PE, NE-treatment was also significantly decreased to normal values in LRP1 siRNA co-treated NRCM. (E) The actin cytoskeleton was decreased in LRP1 siRNA transfected NRCM with PE or NE.

III-4. 심장비대증 동물모델 (TAC 모델)

in vitro 상에서는 카테콜아민으로 심장비대증을 유도했다면, *in vivo* 상에서는 대동맥을 가로질러 수축시켜 만든 심장비대증 동물모델인 transverse aortic constriction (TAC) 모델에서 실험을 진행하였다. TAC 모델은 실험 및 방법에 기재된 방법으로 만들었으며, WT-TAC-Sham 모델은 동일한 실험 조건에서 대동맥을 수축시키지 않은 모델이다. Figure 4 는 동물모델에서 심장비대증을 확인하는 실험이고, 모든 동물들은 4 ~ 5 주 후 심장을 떼어내어 실험을 진행하였다. 동일한 실험 조건에서 WT-TAC-Sham 모델에 비해 WT-TAC 모델이 훨씬 심장이 비대해 진 것을 확인 할 수 있다 (Figure 4A). 먼저 Hematoxylin & Eosin (H & E) 염색법을 이용하여 형태를 확인하였는데, hematoxylin은 핵을 염색 (파란색) 시키고 Eosin은 세포질을 염색 (분홍색) 시킨다. 두 마리의 TAC 모델 모두 WT-TAC-Sham에 비해 세포질이 커진 것을 확인할 수 있다 (Figure 4B). 세포에서 면적을 확인하였듯이 마찬가지로 동물모델에서도 면적을 측정하였고, 좌심실의 두께 또한 측정하였을 때 WT-TAC-Sham에 비해 커진 것을 확인하였다 (Figure 4C,D). 심장이 비대해지면 단백질 합성 및 fibroblast, 콜라겐 등이 증가하게 되는데 이 중 콜라겐 축적을 측정할 수 있는 Masson' s trichrome 염색법을 이용하여 심장비대증을 측정하였다. 콜라겐은 파란색으로 염색되고 핵은 검정색, 그리고 세포질, 근섬유, 적혈구는 분홍색으로 염색된다. 그 결과 TAC 모델에서 확연히 콜라겐이 축적 된 것을 확인할 수 있다 (Figure 4E).

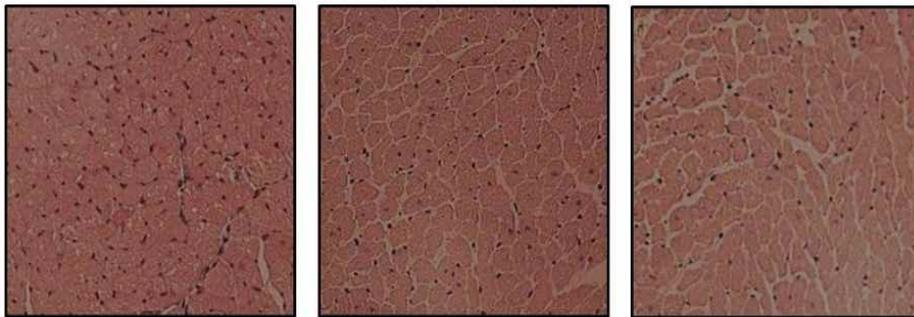
A



WT-TAC-Sham

WT-TAC

B

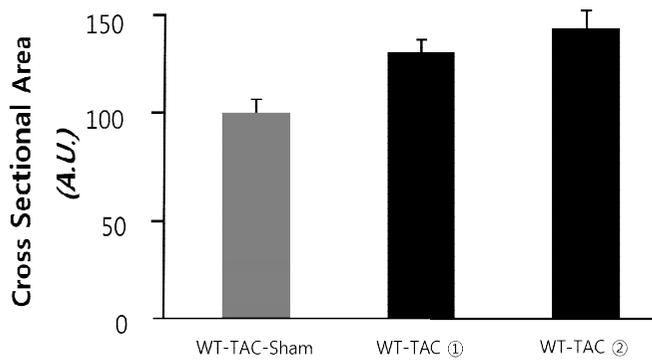


WT-TAC-Sham

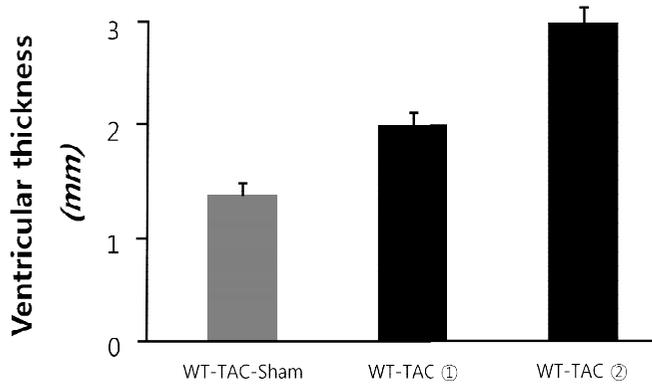
WT-TAC ①

WT-TAC ②

C



D



E

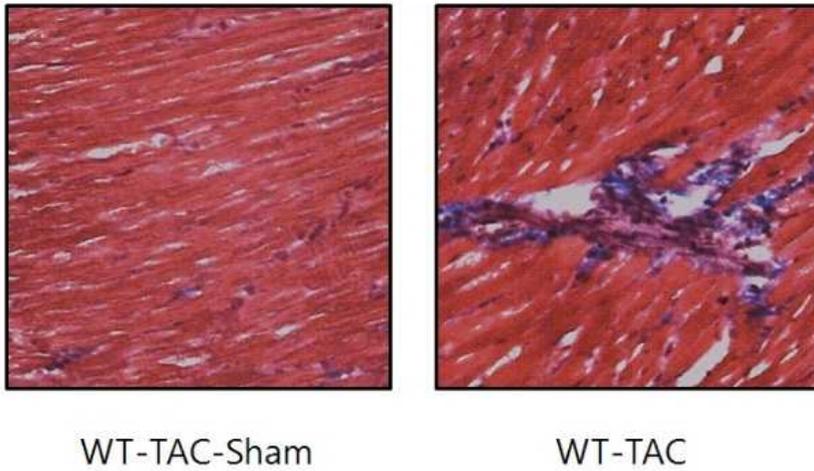


Figure 4. Transverse aortic constriction (TAC) model.

(A) Relative comparison of the rat heart. Left; WT-TAC-Sham, Right; WT-TAC.

(B) Heart tissues. Hematoxylin and eosin stain. (C) Cardiomyocyte cross

section area. (D) Ventricular thickness. (E) Masson' s trichrome stain. This

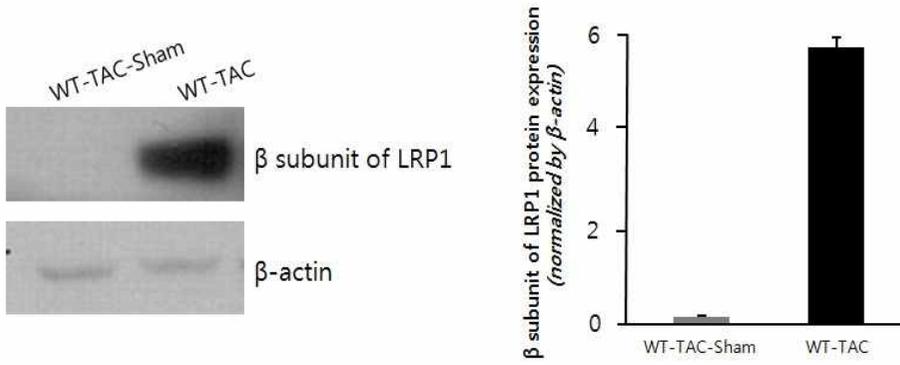
method is used for the detection of collagen fibers in tissues.

III-5. 심장비대증 동물모델 (TAC 모델) 에서 LRP1의 변화

앞서 심근세포에서 심장비대증을 유도하여 LRP1의 발현량을 보았다면, 더 나아가 심근세포뿐만 아니라 동물모델에서도 LRP1의 발현량을 관찰하였다. TAC 모델은 4 ~ 5 주 후 떼어낸 심장으로 균질화를 통해 작게 잘라준 뒤 실험을 진행하였다. TAC 모델에서 LRP1의 발현량을 보기 위해 β subunit (85 kDa) 의 LRP1 항체를 사용하여 western blot을 하였다. 그 결과 LRP1의 단백질 발현량은 상당히 증가된 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 4A). 또한 TAC 모델에서 LRP1의 mRNA 발현량을 qPCR로 확인한 결과 세포 실험과 동일하게 ANF, BNP, Skeletal α -actin이 상당히 높게 발현된 반면 SERCA2a 와 LRP1의 mRNA 발현량은 감소 된 것을 확인 하였다 (Figure 4B).

우리는 실험을 통해 카테콜아민으로 유도된 신생아 쥐의 심근세포뿐만 아니라 TAC 모델에서 LRP1의 발현량이 높게 발현되는 것을 확인했고, 게다가 특정 siRNA 분자를 이용하여 LRP1을 억제시켰을 때 신생아 쥐의 심근세포의 심장비대증은 억제가 되는 것을 관찰했다. 그러므로 이 논문을 통해 심장비대증에서 LRP1이 중요한 역할을 한다는 것을 밝혀냈다.

A



B

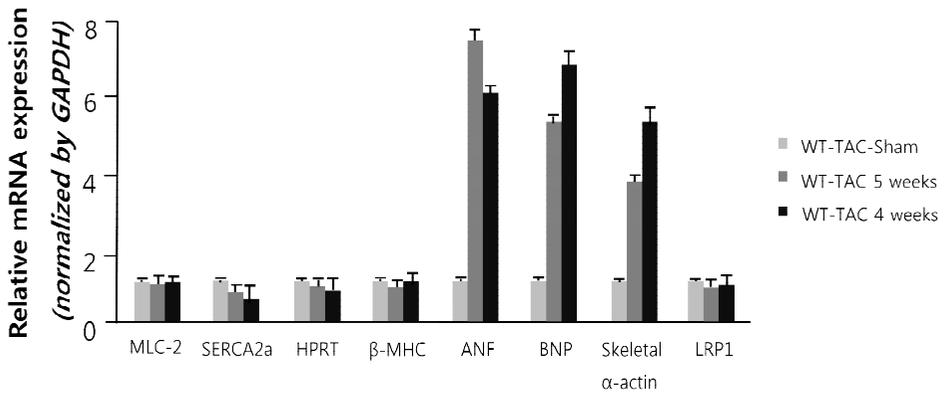


Figure 5. LRP1 expression level is altered in transverse aortic constriction (TAC) model.

(A) LRP1 protein expression level was upregulated in the after 4 weeks of transverse aortic constriction surgery. Protein levels were normalized to β -actin. (B) LRP1 mRNA level were investigated by qPCR. The mRNA levels of LRP1 were decreased in the after 4, 5 weeks of transverse aortic constriction surgery.

IV. Discussion

심장비대증은 고혈압, 심근경색, 일부 유전적인 심장 질병 등과 같은 조건에서 발생하여 진행되는 과정이다[35]. 현재까지 심장비대증은 꾸준히 연구되어왔지만 심장비대증과 LRP1의 관계는 알려진 바가 거의 없다.

LRP1은 여러 측면에서 LDLR family의 독특한 수용체로 떠오르고 있다. 첫째, LRP1은 > 30개의 ligand와 결합할 수 있는 능력을 가진 다기능 수용체이다[12,21]. 둘째, 세포 내 이입이 LDLR family의 다른 구성원보다 훨씬 빠르다[36,37]. 셋째, 세포 내 이입 및 신호 전달 모두 수용체 매개에 의해서 생리적인 기능이 수행된다[38]. 넷째, 뇌와 간에서 LRP1의 높은 발현량뿐만 아니라 multiligand 성질은 정상 배아의 성장 및 발달을 위해 필요하다[39,40]. 또한, 질병의 발병 기전(예, 알츠하이머 질병)에서 LRP1의 중요한 역할은 최근에 밝혀졌다[41,42]. 그러나 다양한 질병과 밀접한 관계를 포함하여 LRP1의 생합성을 이해하는 발전에도 불구하고, 심장비대증에서 LRP1의 조절기전이 규명되지 않았으므로 명확하게 정의되어야 할 부분으로 남아있다.

본 연구에서는 신생아 쥐의 심근세포에 PE 또는 NE 등과 같은 카테콜아민으로 심장비대증을 유도했을 때, LRP1이 억제되면 심장비대증도 억제된다는 사실을 입증했다. 추가적으로 TAC 모델에서 LRP1이 과발현된 것을 확인할 수 있었다. 기존에 PE 또는 NE 등과 같은 카테콜아민이 심장비대증을 유도한다는 사실이 밝혀졌었고[30,31], 실험을 통해 한번 더 확인하였다 (Figure 1). Figure 1에서 데이터는 보여지지 않았지만, 똑같은 실험 조건에서 PE, NE 이외에 Angiotensin II도 심장비대증을 유도하는 것을 확인했다. 이처럼 본

연구는 심장비대증이 확실히 이루어진 상태에서 실험이 진행되었음을 보여준다. 다음으로 LRP1이 심장비대증을 유도하는지 확인하기 위해서 LRP1의 발현량을 측정하였는데 Figure 2 에서 보이는 것과 같이 LRP1의 단백질 발현량과 mRNA 발현량이 반대의 결과가 나왔음을 확인하였다. 이와 같은 결과로 인해 추가적으로 카테콜아민이 LRP1의 proteasomal degradation을 막아준다는 가설을 세웠다. LRP1의 proteasomal degradation을 카테콜아민이 막게 되면, LRP1의 단백질 발현량은 계속해서 증가하게 되고 LRP1은 recycling 되면서[43] mRNA 발현량은 감소하게 될 것이다. 그래서 단백질 합성의 억제자인 Cycloheximide를 신생아 쥐의 심근세포에 PE 또는 NE 와 함께 처리 했을 때 Cycloheximide만 처리한 컨트롤에 비해 LRP1의 발현량이 크게 감소되지 않게 되면 가설이 증명되게 될 것이라 생각된다. 따라서 본 연구는 이 부분에 대해 추가적인 실험을 진행하고 있다.

심장비대증에서 LRP1의 역할을 조사하기 위해 siRNA 분자를 이용하여 LRP1을 억제시켰다. 카테콜아민으로 유도된 심장비대증에서 LRP1의 높은 발현량은 LRP1 siRNA 처리를 통해 상당히 큰 폭으로 심장비대증을 억제하였음을 확인하였다 (Figure 3). 이러한 결과는 LRP1을 억제하게 되면 카테콜아민을 처리해도 심장비대증을 억제할 수 있다는 것을 확인 할 수 있다.

이미 수많은 연구에서 심장비대를 유도할 수 있는 약물을 처리 시 심근세포에서 extracellular regulated kinase 1, 2 (ERK 1, 2) 가 활성화 되고[44], 심장비대증에서 ca^{2+} 의 변화량은 입증되었다[45]. 추가적으로 데이터에는 보여지지 않았지만, ERK 1, 2 뿐만 아니라 Akt 신호와 ca^{2+} 의 변화를 조사한 결과 심장비대증에서 모두 높게 발현되었고 LRP1 siRNA를 처리 했을 때 모두 감소하였다. 이

는 심장비대증에서 LRP1의 조절기전을 규명하는데 도움을 줄 것이다.

더 나아가 카테콜아민으로 유도된 신생아 쥐의 심근세포뿐만 아니라 TAC 모델에서도 LRP1의 발현량이 높게 발현되는 것을 확인하였다. 실험은 진행하지 않았지만 TAC 모델에서 LRP1의 과발현 또는 억제를 통해 심장비대증 억제 가능성을 분석한다면 연구를 통해 얻어지는 결과는 심장비대증 예방과 치료에 새로운 정보를 제공할 수 있을 것이다.

본 연구 결과는 LRP1이 심장비대증을 조절하는 결정적 조절자 역할을 한다고 보고 이 같은 LRP1이 억제되면 심장비대증을 억제할 수 있다고 본다. 그러므로 LRP1이 심장비대증을 치료할 수 있는 잠재적인 타겟으로 중요한 역할하며 LRP1의 조절기전에 대한 추가적인 연구를 통해 심장비대증 질환 이외에도 심부전 등과 같은 기타 여러 질환연구에서 발생하는 부정맥기전을 막을 수 있는 약물이 개발 될 수 있을 것으로 기대 된다.

V. References

- [1] Mark H. et al. (2011) The Progression of Hypertensive Heart Disease. *Circulation*. 123, 327-334.
- [2] Lwin Lwin Tin. et al. (2002) Hypertension, left ventricular hypertrophy, and sudden death. *Curr Cardiol Rep*. 4, 449-57.
- [3] P.E. Glennon. et al. (1995) Cellular mechanisms of cardiac hypertrophy. *Br Heart J*. 73, 496-499.
- [4] Papademetriou V. et al. (1994) Effect of diuretics on cardiac arrhythmias and left ventricular hypertrophy in hypertension. *Cardiology*. 2, 43-47.
- [5] Katholi RE. et al. (2011) Left ventricular hypertrophy: major risk factor in patients with hypertension: update and practical clinical applications. *Int J Hypertens*. 2011, 495349.
- [6] Sato A. et al. (1999) Effects of spironolactone and angiotensin-converting enzyme inhibitor on left ventricular hypertrophy in patients with essential hypertension. *Hypertens Res*. 22, 17-22.
- [7] Yasunari K. et al. (2005) Left ventricular hypertrophy and angiotensin II receptor blocking agents. *Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Agents*. 3, 61-67.
- [8] Matsumura K. et al. (2006) Role of aldosterone in left ventricular hypertrophy in hypertension. *Am J Hypertens*. 19, 13-18.

- [9] Trimarco B. et al. (1987) Beta blockers and left ventricular hypertrophy in hypertension. *Am Heart J.* 114, 975-983.
- [10] Devereux RB, Pickering TG. et. al. (1983) Left ventricular hypertrophy in patients with hypertension: importance of blood pressure response to regularly recurring stress. *Circulation.* 68, 470-476.
- [11] Herz J. et al. (1998) Surface location and high affinity for calcium of a 500-kd liver membrane protein closely related to the LDL-receptor suggest a physiological role as lipoprotein receptor. *EMBO J.* 7, 4119-4127.
- [12] Herz J, Strickland DK. et al. (2001) LRP1: a multifunctional scavenger and signaling receptor. *J Clin Invest.* 108, 779-784.
- [13] Heesang Song. et al. (2009) Low-Density Lipoprotein Receptor-related Protein 1 Promotes Cancer Cell Migration and Invasion by Inducing the Expression of Matrix Metalloproteinase 2 and 9. *Cancer Res.* 69, 897-886.
- [14] Hussain MM. et al. (1999) The mammalian low-density lipoprotein receptor family. *Annu Rev Nutr.* 19, 141-172.
- [15] Krieger M, Herz J. et al. (1994) Structures and functions of multiligand lipoprotein receptors: macrophage scavenger receptors and LDL receptor-related protein (LRP). *Annu Rev Biochem.* 63, 601-637.

- [16] Pannekoek H. et al. (1999) The second and fourth cluster of class A cysteine-rich repeats of the low density lipoprotein receptor-related protein share ligand-binding properties [In Process Citation]. *J Biol Chem.* 274, 31305-31311.
- [17] Obermoeller-McCormick L. et al. (2001) Dissection of receptor folding and ligand-binding property with functional minireceptors of LDL receptor-related protein. *J Cell Sci.* 114, 899-908.
- [18] Willnow TE. et al. (1994) Molecular dissection of ligand binding sites on the low density lipoprotein receptor-related protein. *J Biol Chem.* 269, 15827-15832.
- [19] Herz j. et al. (1990) Proteolytic processing of the 600 kd low density lipoprotein receptor-related protein (LRP) occurs in a trans-Golgi compartment. *EMBO J.* 9, 1769-1776.
- [20] Willnow TE. et al. (1996) The low-density-lipoprotein receptor-related protein (LRP) is processed by furin in vivo and in vitro. *Biochem J.* 313, 71-76.
- [21] Herz J, Bock HH. et al. (2002) Lipoprotein receptors in the nervous system. *Annu Rev Biochem.* 71, 405-434.
- [22] Ola Myklebost. et al. (1989) The gene for the human putative apoE receptor is on chromosome 12 in the segment q13-14. *Genomics.* 5, 65-69.
- [23] Manju Padmasekar. et al. (2007) The acute phase protein α_2 -

- macroglobulin induces rat ventricular cardiomyocyte hypertrophy via ERK1,2 and PI3-kinase/Akt pathways. *Cardiovascular research*. 75, 118-128.
- [24] Donahue JE. et al. (2006) RAGE, LRP-1, and amyloid-beta protein in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathol*. 112, 405-415.
- [25] Martiskainen H. et al. (2013) Targeting ApoE4/ApoE receptor LRP1 in Alzheimer's disease. *Expert Opin Ther Targets*. 17, 781-794.
- [26] Qiang Liu. et al. (2011) Lipoprotein Receptor LRP1 Regulates Leptin Signaling and Energy Homeostasis in the Adult Central Nervous System. *PLoS biology*. 9, 1.
- [27] Jérôme Terrand. et al. (2009) LRP1 Controls Intracellular Cholesterol Storage and Fatty Acid Synthesis through Modulation of Wnt Signaling. *J Biol Chem*. 284, 381-388.
- [28] Rajamanickam C. et al. (2001) Cardiac isoform of alpha-2 macroglobulin, a novel serum protein, may induce cardiac hypertrophy in rats. *Basic Res Cardiol*. 96, 23-33.
- [29] Mariappan M. et al. (1990) Purification and characterization of a high-molecular-weight protein induced in rat serum during the development of cardiac hypertrophy. *Arch Biochem Biophys*. 281, 287-297.
- [30] Scheuer J. et al. (1999) Catecholamines in cardiac hypertrophy. *Am J Cardiol*. 83, 70H-74H.

- [31] HG Zimmer. et al. (1997) Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: Significance of proto-oncogene expression. *J Mol Med.* 75, 849-859.
- [32] KH Lee. et al. (2003) Calreticulin inhibitors the MEK1,2-ERK1,2 pathway in α 1-adrenergic receptor/Gh-stimulated hypertrophy of neonatal rat cardiomyocytes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 84, 101.
- [33] Zimmer HG. et al. (1997) Catecholamine-induced cardiac hypertrophy: significance of proto-oncogene expression. *J Mol Med (Berl).* 75, 849-859.
- [34] Pinson A. et al. (1993) Alpha- and beta-adrenergic stimulation of protein synthesis in cultured adult ventricular cardiomyocytes. *J Mol Cell Cardiol.* 25, 477-490.
- [35] K Li. et al. (1997) Myocardial α_1 -adrenoceptor: inotropic effect and physiologic and pathologic implications. *Life Sci.* 60, 1305-1318.
- [36] Li Y. et al. (2001) Differential functions of members of the low density lipoprotein receptor family suggested by their distinct endocytosis rates. *J Biol Chem.* 276, 18000-18006.
- [37] Li Y. et al. (2001) Identification of a major cyclic AMP-dependent protein kinase A phosphorylation site within the cytoplasmic tail of the low-density lipoprotein receptor-related protein: implication for receptor-mediated endocytosis. *Mol Cell Biol.* 21, 1185-1195.
- [38] Herz J. et al. (2001) The LDL receptor gene family: (un)expected signal transducers in the brain. *Neuron.* 29, 571-581.

- [39] Herz J. et al. (1992) LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*. 71, 411-421.
- [40] Herz J. et al. (1993) Correction: LDL receptor-related protein internalizes and degrades uPA-PAI-1 complexes and is essential for embryo implantation. *Cell*. 73, 428.
- [41] Hyman BT. et al. (2000) Role of the low-density lipoprotein receptor-related protein in beta-amyloid metabolism and Alzheimer disease. *Arch Neurol*. 57, 646-650.
- [42] Kang DE. et al. (2000) Modulation of amyloid beta-protein clearance and Alzheimer's disease susceptibility by the LDL receptor-related protein pathway. *J Clin Invest*. 106, 1159-1166.
- [43] Anna P. Lillis. et al. (2008) LDL Receptor-Related Protein 1: Unique Tissue-Specific Functions Revealed by Selective Gene Knockout Studies. *American physiological society*. 88, 887-918.
- [44] Proud CG. (2004) Ras, PI3-kinase and mTOR signaling in cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res*. 63, 403-413.
- [45] C.William Balke. et al. (1998) Alterations in calcium handling in cardiac hypertrophy and heart failure. *Cardiovascular research*. 290-299.

VI. 감사의 글

설렘과 부푼 꿈을 안고 연구실에 들어온 제가 엇그제 같은데 벌써 졸업을 준비하게 되었습니다. 제게 대학원 생활은 소중한 감사한 마음을 품을 수밖에 없도록 만들어 주었던 시간들이었고, 이제 그 결과가 이렇게 결실을 맺어 석사학위 논문으로 재탄생 되니 정말 뜻 깊습니다. 그래서 지금까지 논문을 쓰면서 격려해주시고 도움을 베풀어주신 많은 분들께 감사의 인사를 드리고자 합니다.

먼저, 배움의 길을 열어주시고 부족한 저에게 따뜻한 조언과 격려를 아끼지 않으셨던 송희상 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 교수님의 지도를 통해 연구가 무엇인지, 제게 부족한 점이 무엇이고 어떤 방향으로 나아가야 할지에 대해 알 수 있었던 것 같아 교수님께 머리 숙여 깊은 감사의 인사를 드립니다. 또한 바쁘신 중에도 끊임없는 조언으로 실험에 대한 부족한 부분을 채워주신 방일수 교수님께 감사 드립니다. 그리고 학부 때부터 생물학이라는 학문에 재미를 느끼게 해주셨고 과학 하는 자세를 일깨워 주신 생물학과 이준식, 조광원, 전택중 교수님께 감사 드립니다. 아울러 대학원 생활 동안 저를 지도해 주신 의과학과 모든 교수님들께 감사 드립니다.

같은 길을 걷고 있는 사람이 있다는 것이 제게 얼마나 큰 힘이 되는지 모릅니다. 연구실 생활 속에서 친언니처럼 따뜻하게 대해주시며 무엇보다도 삶의 지혜를 일깨워주신 리진 언니, 동기지만 언제나 어른스럽고 힘들 때마다 격려해주던 주영이, 모르는 것은 서로 물어보며 함께 해답을 찾았던 수진이에게 감사합니다. 서로 힘이 되었기에 우리 랩이 연구에 전념할 수 있는 환경이 되었던 것 같습니다.

그리고 대학원에 같이 진학하여 서로 격려해주며 친하게 지낸 진아, 지예에

게 고맙습니다. 늘 애정 어린 관심과 용기를 줬던 나의 소꿉친구 아름이, 하림이
외에 저를 격려해 주신 모든 분들께 감사 인사 드립니다.

항상 저를 믿어주시고 묵묵히 응원해 주시는 사랑하는 부모님께 감사 드립니다.
아빠, 엄마, 오빠 가족 덕분에 제가 여기까지 할 수 있었고, 한 발짝 더 나
아가겠다는 결심도 할 수 있었습니다. 열심히 잘 해서 부모님께서 해주신 은혜에
항상 보답할 수 있는 자랑스러운 딸이 되도록 하겠습니다.

지나온 시간들을 돌아보면 ‘왜 그렇게 하지 못했나’ 후회를 하곤 합니다.
졸업을 하게 되니 이런 후회가 바로 깨달음으로 보였습니다. 앞으로 발전된 나의
모습을 위해 ‘지나온 과거를 돌아보되, 자신이 후회하지 않는 삶을 살자’ 이 깨
달음을 간직하고 계속 정진하면서 나아가도록 하겠습니다.