creative commons

COMMONS DEED

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

dCollection

이학석사학위논문

미토콘드리아 단백질 수송력 측정을 위한 준비 실험과 미토콘드리아 지향 신호 길이에 따른 단백질 수송효율 분석

Preparation of mitochondrial protein import force measurement and analysis of protein import efficiency depending on lengths of mitochondrial targeting sequence

2017년 2월

서울대학교 대학원

생명과학부

김효민

Preparation of mitochondrial protein import force measurement and analysis of protein import efficiency depending on lengths of mitochondrial targeting sequence

by

Hyomin Kim

Under the supervision of

Professor Hyun Ah Kim, Ph.D.

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment

of the Requirements for the Degree of

Master of Science

February 2017

School of Biological Sciences

Graduate School

Seoul National University

목차

I. 초록..... 1

II. 서론..... 2-7

III. 연구재료 및 방법..... 8-11

IV. 연구결과..... 12-33

1. 광학집게 실험 설계

A) 미토콘드리아 고정: *in vivo* biotinylation

B) 모델 단백질 Cox5a_ybbR 정제

C) Biotinylation된 미토콘드리아와 *in vitro* protein import assay

2. 미토콘드리아 지향신호 길이에 따른 Yta10 단백질 수송효율 분석

V. 결론 및 논의..... 34-35

1. 광학집게 실험을 위한 샘플 준비

2. 미토콘드리아 지향신호 길이에 따른 Yta10 단백질 수송효율

VI. 참고문헌..... 36-39

VII. Abstract 40

List of Abbreviations

GFP – Green Fluorescent Protein

Hsp – Heat Shock Protein

IM – Inner Membrane

IMS – Intermembrane Space

MPP – Mitochondrial Processing Peptidase

MTS – Mitochondrial Targeting Sequence

OM – Outer Membrane

PAM – Presequence Translocase–Associated Motor

PK – Proteinase K

SA – Streptavidin

SAM – Sorting and Assembly Machinery

TOM – Translocase of the Outer Membrane

TIM – Translocase of the Inner Membrane

yEGFP – yeast Enhanced Green Fluorescent Protein

List of Table

Table 1. Constructs for experiments

Model Protein	Vector
Cox5a	pGEM 4z
Cox5a_ybbR	pET 43.1a
BirA	pET 43.1a
BirA	p426GPD
Mcr1_Avi	p424GPD HA
Yta10 FL−yEGFP	pRS314
Yta10 (1−11)−yEGFP	pRS314
Yta10 (1−31)−yEGFP	pRS314
Yta10 (1−63)−yEGFP	pRS314
Yta10 (1−72)−yEGFP	pRS314

I. 초록

미토콘드리아는 에너지 생산, 단백질 합성, 세포 사멸에 관여하는 중요한 세포 소기관으로서 미토콘드리아 단백질 수송 경로에 대한 연구는 생물학적으로 큰 의미를 가진다. 지금까지 알려진 미토콘드리아의 주요한 단백질 전달 통로 복합체는 미토콘드리아 외막의 TOM(Translocase of the Outer Membrane)과 내막의 TIM(Translocase of the Inner Membrane)이다. 대부분의 미토콘드리아 단백질은 세포질에서 합성되어 주요한 단백질 전달 통로 복합체를 통해 미토콘드리아 내부로 수송된다. 본 연구는 미토콘드리아 단백질의 역동적인 수송을 이해하기 위해 두 방향에서 미토콘드리아 단백질 수송 실험을 계획하였다. 첫째는, 생물물리학적인 도구인 광학집게(Optical tweezer) 기술을 이용하여 미토콘드리아 단백질의 수송력을 측정하는 것으로, 먼저 준비 실험 (biotinylation of mitochondria 와 *in vitro* import competent한 단백질 정제)을 수행하였다. 두번째는, 미토콘드리아 단백질 Yta10 아미노기 말단 부분의 미토콘드리아 지향신호(Mitochondrial Targeting Sequence, MTS) 길이에 변화를 주어 미토콘드리아 지향신호 길이와 단백질 수송효율의 관계를 이해하려 했다. 생물물리학적인 광학집게 기술을 적용하여 미토콘드리아 단백질의 수송력을 측정하고 수치화함으로서 미토콘드리아 단백질의 역동성을 연구할 수 있는 가능성이 있다는데 큰 의미가 있다. 또한 단백질 수송효율과 미토콘드리아 지향신호의 길이에 대한 상관관계를 밝힘으로써, 미토콘드리아 지향신호의 길이가 단백질 수송에 미치는 영향에 대한 이해를 높일 수 있을 것으로 기대한다.

중심어: 미토콘드리아, 단백질 전달 통로 복합체, 광학집게, Biotinylation, Yta10, 미토콘드리아 지향신호(MTS), 단백질 수송효율

II. 서론

미토콘드리아는 세포내에서 호흡을 통해 ATP를 생산하는 에너지 공장이다. 미토콘드리아의 구조는 네 개의 세부 영역인 외막(outer membrane), 막간공간(intermembrane space), 내막(inner membrane), 기질(matrix)로 이루어져 있다 (1). 진핵세포에서 대부분의 미토콘드리아 단백질은 세포질(cytoplasm)에서 합성된다 (2). 세포질에서 합성된 미토콘드리아 단백질은 TOM(Translocase of the Outer Membrane)과 TIM(Translocase of the Inner Membrane) 단백질 전달 통로 복합체를 통해서 외막 또는 내막으로 삽입되거나 막간공간 또는 기질로 수송된다. 미토콘드리아 단백질 수송경로는 크게 네가지: presequence pathway, carrier protein pathway, redox-regulated pathway, β-barrel pathway이다 (2).

본 연구에서 심도 있게 연구해 보려는 수송경로는 presequence pathway이다. 이 수송 경로에서 미토콘드리아 단백질은 세포질에서 합성되어 TOM과 TIM23를 통하여 미토콘드리아 내부로 수송된다. 미토콘드리아 지향신호(Mitochondrial Targeting Sequence, MTS)는 미토콘드리아 단백질 수송에 필요한 신호이다. 대부분의 MTS는 아미노기 말단(N-terminus)에 위치해 있고, 길이는 보통 15에서 150개의 아미노산 이다 (3). 세포질에 존재하는 Hsp70(Heat Shock Protein 70)가 미토콘드리아 단백질 수송을 증진시킨다고 알려져 있다 (4). 그 후 미토콘드리아 막간공간을 거쳐 TIM23로 들어가게 되고 PAM(Presequence translocase Associated Motor)에 의한 ATP hydrolysis를 통해 최종

목적지인 기질로 수송된다 (5). 최종적으로 기질로 수송된 미토콘드리아 단백질은 MPP(Mitochondrial Processing Peptidase)에 의해 미토콘드리아 지향신호가 잘린다 (6). 세포질에서 합성된 미토콘드리아 단백질이 이와 같은 수송경로를 거쳐 미토콘드리아 내부로 수송된다.

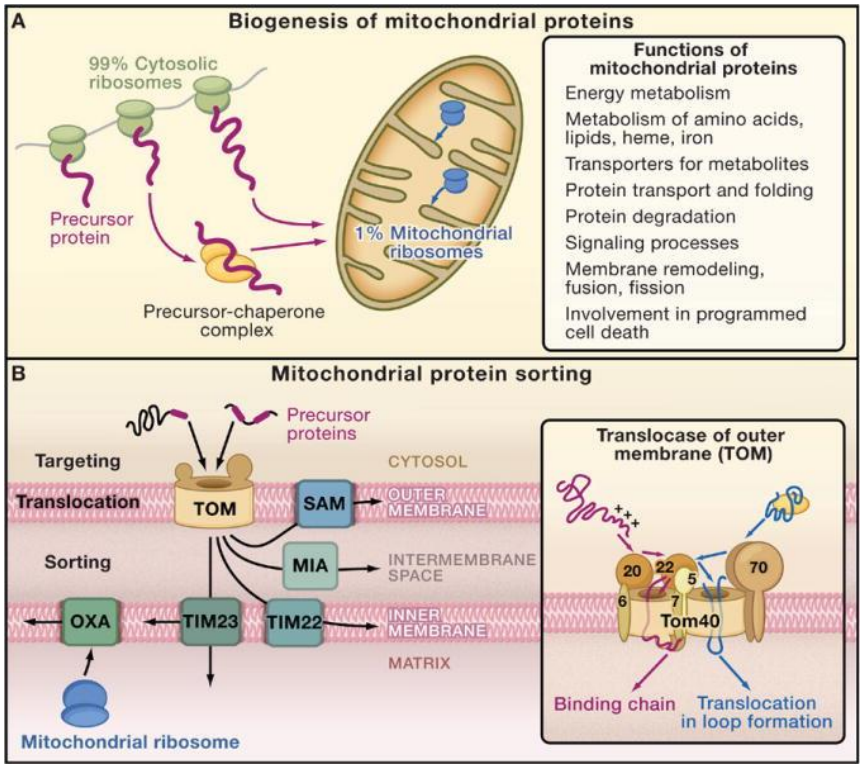
미토콘드리아는 세포내에서 호흡, 세포 사멸등 매우 중요한 기능을 담당하는 세포 소기관으로써, 미토콘드리아의 정상적인 기능 수행은 세포 전체의 생존과 밀접한 관련이 있다 (2). 최근 연구에 따르면 미토콘드리아의 기능과 미토콘드리아 단백질 수송효율이 직접적인 관계가 있음이 밝혀졌는데, 미토콘드리아 단백질 수송효율이 감소할수록 미토콘드리아 기능에 문제가 있음을 보여주었다 (7). 한 가지 예를 들면, ATFS-1(Activating Transcription Factor associated with Stress-1)단백질은 정상적인 미토콘드리아 내로 수송이 되고 가수분해가 일어난다. 하지만 비정상적인 미토콘드리아는 ATFS-1의 수송효율이 감소하고 가수분해가 일어나지 않고 이로 인해 미토콘드리아 내에 불필요한 단백질이 축적되어 손상을 초래한다고 알려져 있다 (8).

기존의 연구들에서는 비정상적인 미토콘드리아에서 단백질 수송 효율이 감소함을 보여 주었다. 그러나 이전의 연구들은 실험적 한계로 인해, 단백질 수송 효율에 대한 정량적인 변화를 제시하지는 못하였다. 본 연구에서는 기존 연구의 한계를 극복하고자 생물물리학적 접근 방법인 광학집게 기술(9)을 이용하여 미토콘드리아 단백질의 수송력을 수치화 하고자 한다. 이를 위해 광학집게 기술에 적합한 샘플인 biotinylation된 미토콘드리아는 streptavidin으로 코팅된 cover slip에 고정 시키고 모델 단백질은 레이저로 광 포획한 비드에 연결해 고정시킨다. 단일 미토콘드

리아의 단백질 통로 복합체를 통해 단일 단백질이 수송될 때 단백질과 미토콘드리아 상호간에 가해지는 pN(피코 뉴턴)단위의 미세한 힘을 측정한다. 광학집게는 단일분자 단위로 측정이 가능하기 때문에 정확한 메커니즘 분석에 용이하다. 비록 이를 위한 샘플 준비와 최적의 측정 조건을 찾아내는데 어려움이 있겠지만 위의 시스템이 구축 되면 미토콘드리아뿐만 아니라 소포체등 다른 세포 소기관에도 접목시킬 수 있을 것이다.

미토콘드리아의 지향신호는 단백질의 수송을 결정하는 중요한 요소이다 (10). 이 지향신호의 물리적인 특징 중에 하나인 길이에 변화를 주어 단백질 수송효율을 비교 하였다. 미토콘드리아 지향신호의 길이와 단백질 수송효율간의 관계를 연구 함으로서 직접적인 둘의 연관성을 밝히려 한다. 기존에 미토콘드리아 지향신호에 대한 연구는 있어 왔지만 특정 미토콘드리아 단백질인 Yta10의 지향신호 길이와 단백질 수송효율과의 관계는 알려져 있지 않다 (11, 12). 미토콘드리아 m-AAA protease complex인 Yta10 protein은, 예측 프로그램에 따라 N-말단 60개 혹은 71개의 residue가 MTS로 예측되나 MPP에의해 절단된 부분은 30번째 residue로 보고되었다 (13). 본 연구에서는 미토콘드리아 내막 단백질인 Yta10과 녹색형광 단백질인 yEGFP를 재조합 시켜 Yta10의 지향신호길이에 따른 수송효율을 세포분획법과 형광 현미경을 통해 관찰하였다. 먼저 세포분획법을 통해 세포질에 남아있는 단백질의 양과 미토콘드리아 내부로 수송된 단백질의 양을 비교하면서 각각의 다른 길이의 지향신호에서의 수송효율을 비교 할 수 있었다. Proteinase K protection assay를 통해 미토콘드리아 내로 수송된 단백질과 세포질에 남아 있는 단백질의 양을 비교 할 수 있었다. Proteinase K는 미토콘드리아 내부로 수송되지 못하고 세포질에

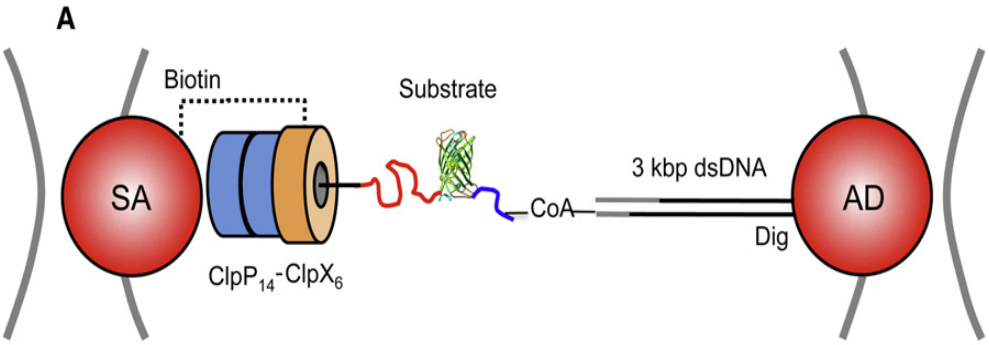
남아있는 단백질을 분해한다. Proteinase K에 의해 분해되지 않은 단백질은 미토콘드리아 내부로 수송된 단백질이고, 분해 되어버린 단백질은 미토콘드리아 내로 수송되지 못한 단백질이다. 각각의 다른 길이의 지향신호를 발현하는 효모세포를 배양해 세포질 부분과 미토콘드리아 부분을 분리하여 정량화 할 수 있었다. 더 간단한 방법으로는 형광 현미경에서 각각의 다른 길이의 지향신호를 발현하는 효모세포를 관찰 함으로서 세포질과 미토콘드리아에서 나타나는 형광 신호를 비교하여 수송경향을 알 수 있었다 (14).



(Chacinska et al., 2009)

Introduction Figure 1. 미토콘드리아 단백질 수송 원리와 경로

(A) 대부분의 미토콘드리아 단백질은 세포질에서 만들어진 후 미토콘드리아 내부로 수송된다. 대략 1%정도의 단백질이 미토콘드리아 내에서 합성된다. (B) 미토콘드리아 단백질의 분류 경로. TOM, the translocase of the outer membrane; SAM, sorting and assembly machinery; MIA, mitochondrial intermembrane space assembly; TIM22 complex, carrier translocase of the inner membrane; TIM23 complex, presequence translocase of the inner membrane; OXA, insertase/ export machinery of the inner membrane (2).



(Maillard et al., 2011)

Introduction Figure 2. ClipX(P) 복합체와 GFP의 광학집게 실험 세팅

양쪽 두개의 트랩에 비드가 포획되어 있는 단일 분자수준의 광학집게 실험 세팅. ClpX(P) 복합체는 streptavidin으로 코팅된 비드에 biotinylation으로 고정되어 있다. 그 반대편은 GFP titin fusion 단백질과 3kbp dsDNA이 공유결합 되어있는 복합체를 antibody로 코팅된 polystyrene비드가 Dig tag에 의해 붙잡고 있다. 여기서 GFP에 ybbR tag가 달려있고 CoA가 GFP_ybbR tag와 3kbp dsDNA를 연결시켜준다. 이 실험에서의 광학집게 실험 세팅은 본 연구의 샘플 준비과정에서 참고한 부분이다 (15).

III. 연구재료 및 방법

효모 균주

W303-1α 균주 (*MATα, ade2, can1, his3, leu2, trp1, ura3*)

yta10Δ 균주 (*MATα, ade2-1, his3-11,15, yta10Δ::HIS3MX6, trp1-1, leu2,112, ura3-52*)

플라스미드 제조

특정 유전자 부분에 앉는 5' 프라이머와 3' 프라이머를 이용하여 유전체 DNA 나 *E.coli* 의 콜로니의 유전자를 PCR 로 증폭시킨다. 증폭된 PCR 결과물을 제한효소인 *SmaI* 으로 자른 p424GPDHA 벡터 또는 p426GPD 벡터에 상동재조합을 이용해 넣어 준다. 각각의 construct 의 카르복시기 말단에 HA tag 또는 ybbR tag 또는 Avi tag 를 site directed mutagenesis 를 이용해 달아준다 (Toyobo, Japan).

Stitch PCR을 통하여 Yta10과 yEGFP를 재조합 시킨다. PCR로 증폭된 결과물은 제한효소인 *SmaI*으로 자른 pRS314 벡터에 상동재조합을 이용해 넣어 준다. 다른 길이의 MTS를 가진 Yta10-yEGFP 단백질 construct은 site directed mutagenesis를 이용해 만들어 준다 (Toyobo, Japan).

*In vitro*에서의 전사 및 번역

플라스미드(*in vitro* 전사 및 번역 pGEM4z 벡터)에 S^{35}와 rabbit reticulolysate (Promega)을 넣어주고 30℃에서 1시간 30분동안 배양시킨다.

*E.coli*에서 과발현시킨 단백질 정제

플라스미드(pET43.1a 벡터)를 Rosetta competent cell에 transformation시켜 37℃에서 배양시킨다. Transformation된 박테리아 세포를 37℃ LB/Amp/Chloramphenicol에서 하루 밤 동안 키운다. 그 다음날 세포를 OD_{600} 0.2로 희석시켜 log phase인 OD_{600} 0.8까지 키운다. 세포배양 미디어에 IPTG(1mM)를 넣고 최적화된 온도와 시간에 따라 키운다. 세포는 3600rpm에서 10분동안 원심분리기를 통해 얻을 수 있다. 얻어진 세포에 binding buffer (5mM imidazole)와 PIC, PMSF를 넣어 준다. French Press를 이용하여 세포를 부순다. 그 후 원심분리기를 통해 18,000rpm에서 40분간 돌려주어 세포의 debris를 제거해 준다. 컬럼의 HisBind resin은 wash하고 charge한 후 equilibrate 시켜준다. 세포용해물은 니켈로 charge된 칼럼에 넣어주고 1시간 30분동안 4℃에서 binding 시켜준다. Binding이 끝난 후, 컬럼은 binding버퍼(5mM imidazole)와 washing버퍼(1M imidazole)로 씻어낸다. 마지막으로 컬럼의 비드에 붙은 단백질을 elution버퍼(1M imidazole)로 elution 한다.

*In vivo*에서의 biotinylation

Mcr1_Avi와 BirA를 동시에 발현하는 세포를 -W 미디어에 30℃에서 하루 밤 동안 키운다. 다음날 biotin (250nM)과 함께 세포를 OD_{600} 0.2로 희석시켜 log phase인 OD_{600} 0.8까지 키운다. 그 후 샘플은 TCA precipitation과 membrane fractionation을 통해 준비하고 SDS-PAGE와 Western blotting을 통해 Streptavidin-HRP(SA-HRP)로 biotinylation을 확인 할 수 있다.

*In vitro*에서의 biotinylation

Mcr1_Avi를 발현하는 세포에서 Herrmann의 protocol을 따라서 미토콘드리아 분리를 수행한다 (16). Biotin과 BirA를 분리된 Mcr1_Avi 미

토콘드리아에 넣어주고 40분간 30℃에서 배양한다. 그 후 샘플은 SDS-PAGE와 Avi tag항체로 Western blotting 수행하여 biotinylation을 확인 할 수 있다.

Streptavidin bead를 이용한 binding assay

Biotinylation된 미토콘드리아는 SEM (250mM sucrose, 1mM EDTA, 10mM MOPS-KOH pH 7.2)버퍼에 넣어 준 뒤 streptavidin sepharose 비드(Sigma, S1638)와 binding 시킨다. 하루 밤 동안 4℃에서 칼럼에서 binding시킨뒤 PBS로 컬럼을 5번 씻어준다. 그 후 6M guanidine이 들어간 PBS (pH 1.5)를 넣고 90℃에서 끓여주어 elution한다. Bound fraction과 free fraction 각각의 샘플을 준비하여 SDS-PAGE와 Avi tag항체로 Western blotting 수행하여 biotinylation을 확인 할 수 있다.

미토콘드리아 분리와 Proteinase K protection assay

효모세포를 glucose또는 semi-synthetic 미디어에서 OD_{600}가 2.0에 도달할 때까지 30℃에서 키운다. 그 후 세포는 3,000g에서 5분 동안 원심분리기에서 돌려 얻은 후 100 mM Tris-H_2SO_4, pH 9.4, and 10 mM dithiothreitol (DTT)을 처리해 30℃에서 20분간 배양한다. 다시 세포를 원심분리기에 넣고 3,000g로 5분간 돌린다. 그리고 Zymolyase 20T (3mg/g of cells) 가 들어간 1.2 M sorbitol과 20mM potassium phosphate, pH 7.4에서 30분간 30℃에서 배양한다. 다시 세포를 원심분리기에 넣고 3,000g로 5분간 돌린다. 세포에 차가운 homogenization 버퍼(10 mM Tri-HCl, pH 7.4, 1 mM EDTA, 1 mM PMSF, 0.6 M sorbitol, 0.2% BSA)를 넣고 homogenizer를 이용해 15번정도 세포를 부순다. Homogenizatin이 다 끝나면 homogenization 버퍼로 2분의 1로 희석시켜 준다. 세포의 lysate은 1500g에서 5분간 원심분리기를 이용해 세포 debris를 제거한다. 미토콘드리아 fraction은 원심분리기에서

12,000g로 15분간 돌려준다. 그 후 미토콘드리아는 SEM (250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2) 버퍼에 녹여 −80℃에서 보관한다. Proteinase K protection assay는 미토콘드리아 분리 후 proteinase K (1mg/ml)를 넣어 준 뒤 30분간 얼음에 방치한다. Proteolytic한 activity를 없애 주기 위해 0.2M PMSF를 넣어준 뒤 25,000g에서 10분간 원심분리기로 돌려준다. 그 후 샘플은 SDS-PAGE와 Western blotting을 통해 확인 할 수 있다.

Sucrose의 gradient를 이용한 정제

Crude하게 분리된 미토콘드리아는 sucrose gradient 원심분리법을 통해 미토콘드리아를 더 깨끗하게 정제할 수 있다. Sucrose의 gradient는 60%, 32%, 23%, 그리고 15%의 sucrose가 EM(10 mM MOPS/KOH, pH 7.2, 1 mM EDTA) 버퍼에 들어있다. Crude하게 분리한 미토콘드리아는 SEM (250 mM Sucrose, 1 mM EDTA, 10 mM MOPS/KOH pH 7.2) 버퍼에 녹여주고 맨 위의 층인 15% sucrose위에 넣어준다. 그 후 SW32Ti swinging bucket rotor를 이용하여 32,000rpm 으로 1시간 동안 원심분리기에 돌려준다. Gradient는 60%와 23%사이에서 얻어지고 다시 SEM 버퍼를 넣고 원심분리기에서 32,000rpm으로 30분간 돌린다. 그 후 최종적으로 분리된 미토콘드리아 pellet은 SEM 버퍼를 넣고 녹여주어 −80℃에 얼린다.

형광 현미경

효모세포를 YPD 미디어에 30℃에 하루 밤 키운다. 세포를 OD_{600} 0.2로 희석시켜 log phase인 OD_{600} 0.8까지 SC(Synthetic Complete)미디어에 키운다. 키운 세포를 96 wells microplate에 넣고 적절한 필터를 맞추어 형광현미경을 통해 관찰한다.

IV. 연구결과

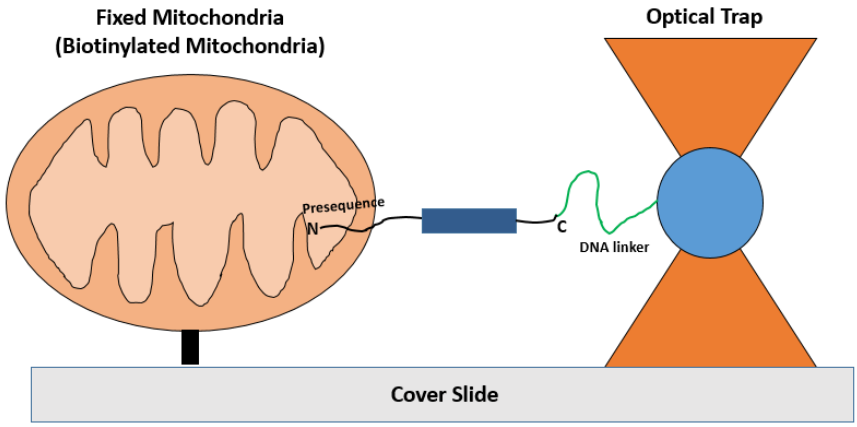
1. 광학집게 실험 설계

간단히 광학집게(9) 실험 설계에 대해 설명하면 광포획(optical trap)에 모델 단백질인 Cox5a가 연결된 비드를 배치하고, 주변에 고정 되어있는 미토콘드리아에 단백질이 수송되는 순간 비드가 당겨지며 이동하는 거리를 통해 수송력을 측정할 수 있다 (15). 광학집게 실험을 하기위해서는 streptavidin으로 코팅된 cover slip에 고정할 biotinylation된 미토콘드리아가 필요하다 (Figure 1A). 또한 *E.coli*에서 과발현 시킨 모델 단백질인 Cox5a_ybbR을 정제하여 DNA linker와 함께 비드에 연결 시켜야 한다 (Figure 1A). 본 연구에서는 미토콘드리아 단백질의 수송력을 측정하기 위한 샘플을 준비하였고 실질적으로 단백질 수송력을 측정해 값을 도출해 내는 일은 앞으로의 연구에서 진행될 것이다.

먼저 효모세포에서 분리된 미토콘드리아가 단백질 수송실험에 적합함을 확인하기 위해서는 *in vitro*에서 S^{35}로 labeling된 단백질 Cox5a와 W303-1α 효모세포에서 분리한 미토콘드리아로 *in vitro* protein import assay를 수행하였다 (16). 그 결과 두가지 형태의 Cox5a인 Cox5a Pre(Precursor)와 Cox5a M(Mature)을 볼 수 있었다 (Figure 1B). Cox5a M은 아미노기 말단에 위치한 Cox5a의 미토콘드리아 지향신호가 MPP(Mitochondrial Processing Peptidase)에 의해 잘린 형태의 단백질이고 Cox5a Pre는 잘리기 이전 형태의 단백질이다. 즉, Cox5a가 미토콘드리아의 기질로 수송되어 기질 내부에 존재 하는 MPP가 미토콘드리아 지향신호 부분이 잘린 형태의 Cox5a M은 기질 내부로 수송이 되었고 Cox5a Pre는 수송되지 못하고 세포질에 존재하는 형태의 단백

질이다. Control 실험으로는 valinomycin을 처리한 미토콘드리아에 *in vitro*에서 단백질 수송실험을 수행하였다. 단백질이 미토콘드리아 내막을 통과하려면 막전위가 존재해야 하기 때문에 막전위를 없애는 ionophore인 valinomycin을 처리해 준 뒤 Cox5a를 넣어주면 미토콘드리아 내막을 더 이상 통과하지 못해 Cox5a Pre만 관찰된다 (Figure 1B). *In vitro*에서 Cox5a 단백질 수송실험을 통해 W303-1α 효모세포에서 분리된 미토콘드리아가 단백질을 수송에 적합하다는 결론을 내릴 수 있었다.

A



B

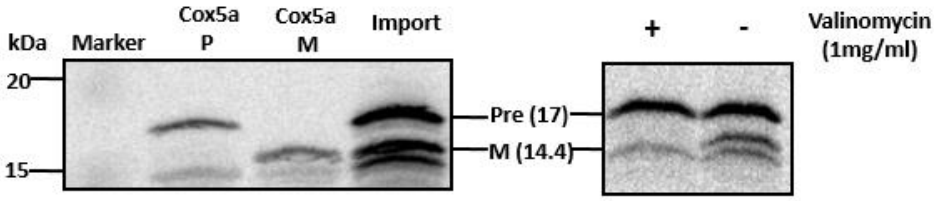


Figure 1. 광학집게 실험 설계와 미토콘드리아 단백질 수송실험

(A) 광학집게 실험을 하기 위해서 cover slip에 고정된 미토콘드리아와 광포획된 비드와 연결된 Cox5a 준비가 필요하고, 단백질이 미토콘드리아 내부로 수송될 때 비드의 움직인 거리를 측정하여 수송력을 계산한다. (B) *In vitro*에서 S^{35}로 labeling된 Coxa단백질과 W303-1α 효모세포에서 분리된 미토콘드리아로 단백질 수송실험. 미토콘드리아 내로 수송되어 MPP에 의해 MTS가 잘린 형태의 Cox5a mature (M) form과 수송되지 않아 MTS가 잘리지 않은 Precursor (Pre) form 으로 존재.

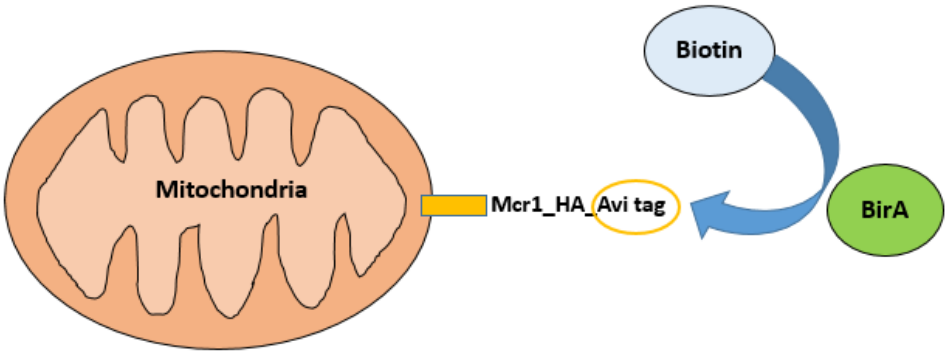
A) 미토콘드리아 고정

in vivo biotinylation

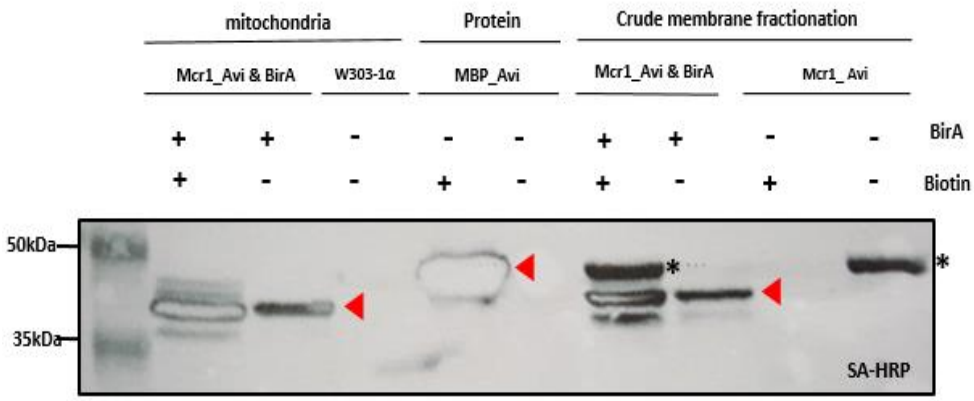
광학집게 실험을 하기 위해서는 미토콘드리아를 streptavidin 으로 코팅된 cover slip 에 고정시켜야 한다. Streptavidin 과 biotin 은 서로 강한 상호작용을 하기 때문에 streptavidin 으로 코팅된 바닥에 미토콘드리아를 고정 시키기 위해서는 미토콘드리아의 biotinylation(17)이 필요하다 (Figure 2A). Mcr1 은 미토콘드리아 외막 단백질로 카르복시기 말단 부분이 세포질에 노출 되어있다 (18). 미토콘드리아 외막에 다량으로 존재하는 Mcr1 에 biotinylation site 인 Avi tag 를 달아준 Mcr1_Avi 와 Avi tag specific biotinylation enzyme gene 인 BirA plasmid 를 효모세포에 transform 하고 biotin(250nM)을 넣은 미디어에서 배양하였다 (19). *In vivo* biotinylation 의 여부는 두가지 방법으로 확인 하였다. 첫번째 방법은 biotinylation 된 미토콘드리아 또는 단백질 샘플을 Western blot 에서 SA(Streptavidin)에 HRP(Horse Radish Peroxidase)가 결합된 SA-HRP 로 확인할 수 있었다 (Figure 2B). SA 는 biotin 과 강한 결합을 하여 만일 미토콘드리아가 biotinlylation 이 되었다면 SA 과 강하게 붙기 때문에 SA-HRP 의 HRP 가 ECL 시약의 luminol 를 산화시켜 방출되는 빛을 감지하여 biotinylation 의 여부를 확인할 수 있었다. 여기서 biotin 을 넣어주지 않았음에도 불구하고 biotinylation 된 밴드가 보이는 이유는 기존의 미디어에도 이미 biotinylation 을 시킬 수 있을 만큼의 biotin 이 존재하기 때문이다. 또 다른 확인 방법으로는 streptavidin 이 코팅된 비드에 biotinylation 된 미토콘드리아를 넣어 준 뒤 streptavidin 비드에 붙은 bound fraction 을 Avi tag 항체로 인식해 Western

blot 에서 확인 할 수 있었다 (Figure 2C). 위의 두 방법을 통해서 Mcr1_Avi 를 발현하는 효모세포에서 분리된 미토콘드리아의 *in vivo* biotinylation 을 확인할 수 있었다.

A


Biotin
Mitochondria
Mcr1_HA_Avi tag
BirA

B


mitochondria
Protein
Crude membrane fractionation
Mcr1_Avi & BirA
W303-1α
MBP_Avi
Mcr1_Avi & BirA
Mcr1_ Avi
BirA
Biotin
50kDa
35kDa
SA-HRP

C

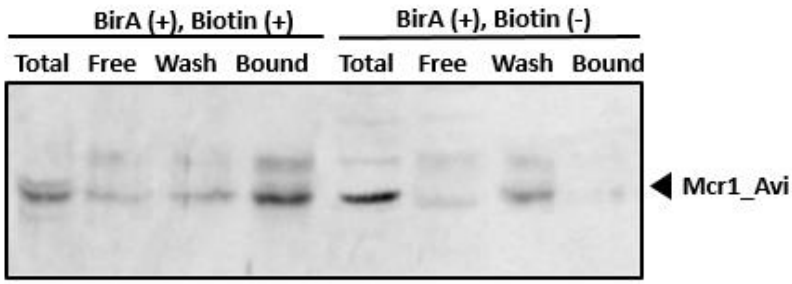

BirA (+), Biotin (+)
BirA (+), Biotin (-)
Total
Free
Wash
Bound
Total
Free
Wash
Bound
Mcr1_Avi

Figure 2. *in vivo* biotinylation과 biotinylation의 여부 확인

(A) *in vivo* biotinylation을 도식화 하여 나타냈다. 미토콘드리아 외막 단백질인 Mcr1에 biotinylation site인 Avi tag를 붙여 biotin과 결합하여 biotinylation된다. (B) Mcr1_HA_Avi를 발현하는 W303-1α 효모 세포를 biotin(250nM)을 넣고 *in vivo* biotinylation시킨 후 분리한 미토콘드리아 또는 단백질은 SA-HRP와의 결합 여부에 따라 biotinylation이 되었는지 확인할 수 있다. *은 불분명한 밴드이고 ◀은 biotinylation된 Mcr1_HA_Avi가 SA-HRP와 결합하여 나타나는 밴드이다. (C) SEM (250mM Sucrose, 1mM EDTA10mM, MOPS-KOH pH 7.2)버퍼에 *in vivo* biotinylation된 미토콘드리아를 녹여 streptavidin으로 코팅된 비드인 sepharose와 함께 칼럼에 넣은 후 4℃에서 하룻밤 동안 binding 시켰다. 그 후 PBS버퍼로 컬럼을 다섯번 정도 씻어주고 6M guanidine이 들어있는 PBS버퍼에 90℃에서 5분간 끓여 elution했다. 그 결과 *in vivo* biotinylation된 Mcr1_HA_Avi가 BirA(+), Biotin(+) bound fraction에 나타나는 것을 Western blot에서 Avi tag 항체로 확인 할 수 있었다.

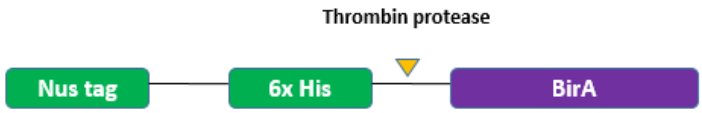
In vitro biotinylation 에 필요한 BirA 정제

혹시 *in vivo* biotinylation이 되지 않을 경우를 대비하여 *in vitro* biotinylation에 필요한 BirA(biotin ligase)를 *E.coli*에서 IPTG induction 시스템으로 과발현 후 정제 하였다 (Figure 3A, 3B). BirA 앞에 Nus tag를 달아준 이유는 정제 과정 중 단백질의 응집현상을 막기 위한 용도이다 (20). Nus tag는 향후 thrombin protease에 의해 Nus tag_6x His tag 부분이 잘려 HisTrap column에 있는 Ni-NTA와의 결합에 의해 BirA만 정제 되었다 (Figure 3C). 정제된 BirA의 activity를 확인하기 위해서 *in vitro* biotinylation assay를 수행하였다 (Figure 3D). Biotinylation이 되지 않은 MBP_Avi 와 함께 biotin과 정제한 BirA를 함께 섞어 준 뒤 Western blot에서 biotin 항체로 biotinylation여부를 확인 하였다. 이 실험을 통해 정제된 BirA 가 biotinylation에서 제 기능을 할 수 있는지 확인 할 수 있었다. *In vivo* biotinylation이 되지 않을 경우는 *in vitro* biotinylation으로 대체 할 수 있다.

A

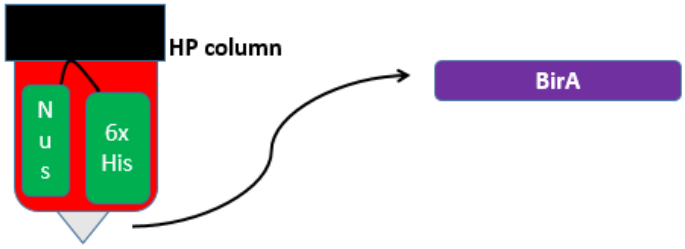
Nus_6xHis BirA pET43.1a purification scheme

- Size Exclusion Chromatography to get high purity BirA protein
- Thrombin protease digestion to remove Nus tag

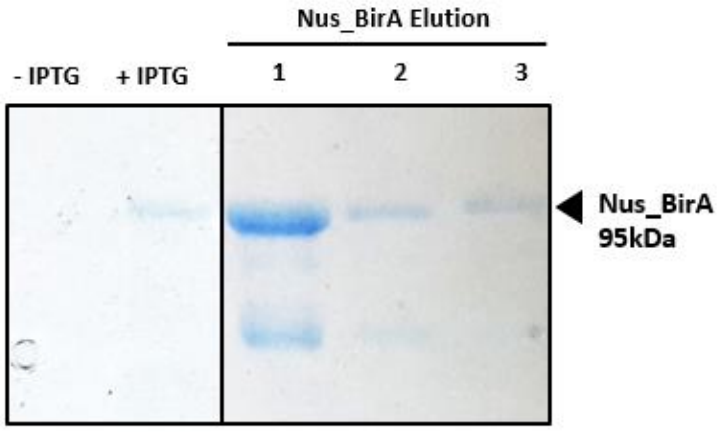


- After Thrombin protease digestion, the reaction mixture can be eluted with HisTrap HP column.

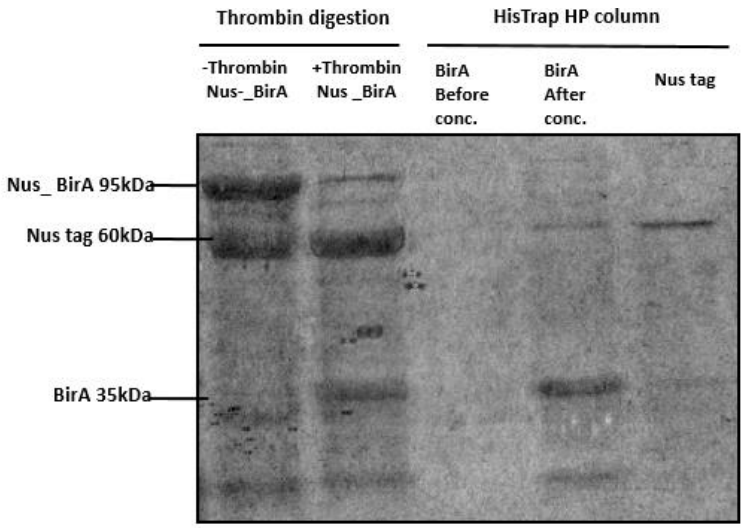
- Eluted fraction is BirA, and the rest part (Nus tag and 6x His) will remain in the column.



B



C



D

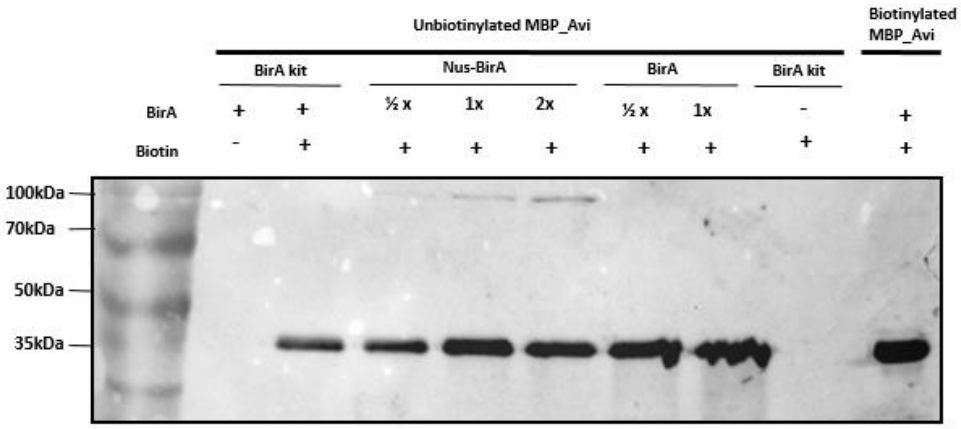


Figure 3. BirA(biotin ligase) 정제 및 BirA 활성 확인

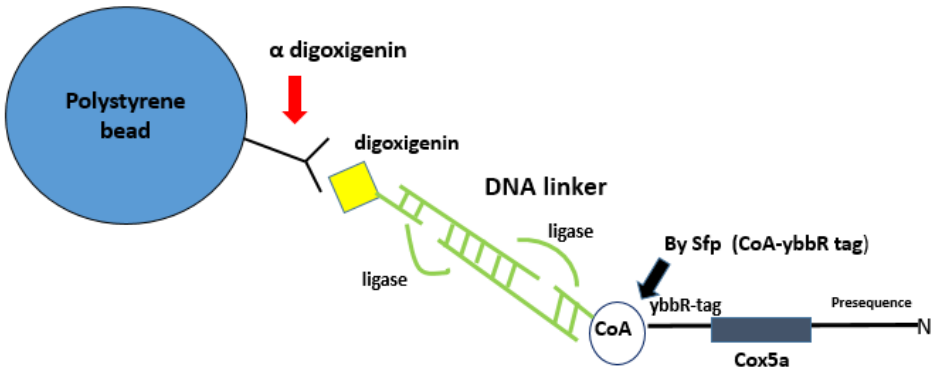
(A) Nus tag가 달린 BirA 정제를 도식화하여 나타냈다. 먼저 Nus tag와 6x His tag가 달린 BirA를 IPTG induction 시스템을 통해 *E.coli*에서 과발현 시킨 후 Nus tag와 6x His tag뒤에 있는 thrombin protease site

부분을 thrombin protease로 Nus tag_6x His tag 부분과 BirA 부분으로 잘린 fraction을 HisTrap column에 넣어줘 binding 시켜주었다. 그 후 elution에서는 BirA만 얻을 수 있었다. (B) BirA를 1mM IPTG 넣고 18℃에서 22시간동안 induction을 통해 과발현 시킨후 Ni-NTA affinity chromatography로 Nus tag_6x His tag_BirA를 얻을 수 있었다 (20). (C) Thrombin protease로 23℃에서 16시간동안 digestion시킨뒤 Nus tag_6x His tag 부분이 잘린 것을 확인 할 수 있었다. Nus tag를 자른 후 HisTrap column을 통해 elution해서 BirA만 정제 되었음을 확인 할 수 있었다. HisTrap column에서 나온 BirA가 희석되어 centrifugal filter 로 농축해 높은 농도의 BirA를 얻을 수 있었다. (D) 위의 과정을 통해 정제된 BirA의 활성을 확인하기 위해 unbiotinylated MBP_Avi로 *in vitro* biotinylation assay를 수행하였다. *In vitro* biotinylation assay는 unbiotinylated MBP_Avi를 biotin과 정제한 BirA를 함께 섞어 준 후 Western blot을 통해 biotin 항체로 biotinylation의 여부를 확인 하였다.

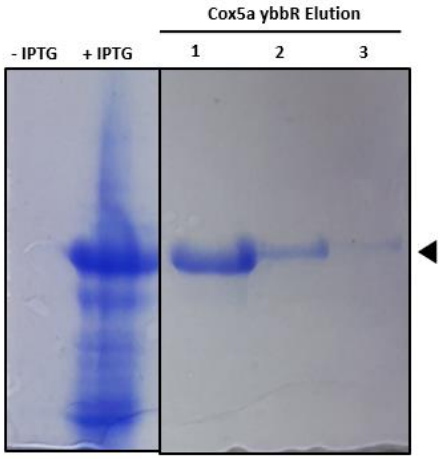
B) 모델 단백질 Cox5a_ybbR 정제

광학집게 실험을 수행하기 위해서는 biotinylation으로 고정된 미토콘드리아 내부로 수송되는 단백질의 정제가 필요하다. 여기서 모델 단백질인 미토콘드리아 내막 단백질 Cox5a는 *E.coli*에서 IPTG induction 시스템을 통해 과발현된 후 Ni-NTA affinity chromatography을 이용해 정제하였다 (Figure 4B). 정제된 Cox5a는 카르복시기 말단에 ybbR tag를 가지며 이 tag는 CoA acceptor이다. CoA_DNA는 Cox5a_ybbR과 Sfp에 의해 붙는다 (21). 50kb 길이의 DNA linker 5' digoxigenin은 CoA_DNA에 접합되고, 접합된 부산물인 DNA linker_Cox5a는 anti-digoxigenin으로 코팅된 polysterene 비드에 붙는다 (Figure 4A). Cox5a와 연결된 비드는 레이저 빛에 포획되고, 단백질 수송이 일어날 만큼 미토콘드리아에 가까운 거리에 위치시킨다. Cox5a가 붙은 비드의 움직임으로 단백질 수송역학을 측정할 수 있다. 본 연구는 모델 단백질인 Cox5a_ybbR의 정제와 이 단백질로 *in vitro* protein import assay를 수행하였다 (Figure 4C). Cox5a_ybbR의 CoA modification은 앞으로의 연구에서 진행 될 예정이다.

A


Polystyrene bead
α digoxigenin
digoxigenin
DNA linker
ligase
ligase
By Sfp (CoA-ybbR tag)
ybbR-tag
Presequence
CoA
N
Cox5a

B


Cox5a ybbR Elution
- IPTG
+ IPTG
1
2
3

C

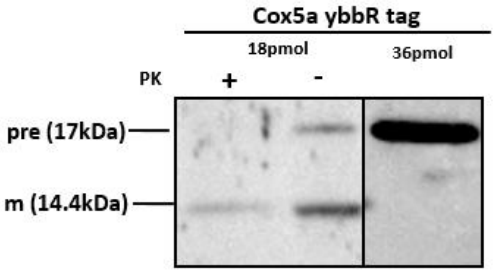

Cox5a ybbR tag
18pmol
36pmol
PK
+
-
pre (17kDa)
m (14.4kDa)

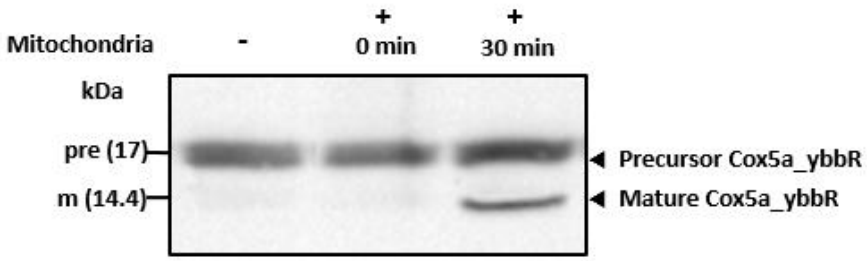
Figure 4. Cox5a ybbR 단백질 정제 및 *in vitro*에서의 Cox5a ybbR 단백질 수송실험

(A) 광학집게 실험의 Cox5a_ybbR modification을 도식화 하여 나타냈다. Cox5a의 카르복시기 말단에 있는 ybbR tag는 CoA의 acceptor이며 Sfp를 함께 넣어주면 Cox5a_ybbR과 CoA가 접합된다. 그후 50kb 길이의 DNA linker 5' digoxigenin은 CoA_DNA에 접합되어 Cox5a_DNA linker가 완성된다. 그리고 Cox5a_DNA linker는 digoxigenin 항체로 코팅된 polystyrene비드에 붙어 고정된다. (B) Cox5a_ybbR은 1mM IPTG 넣고 37℃에서 3시간 동안의 induction을 통해 과발현 시킨 후 Ni-NTA affinity chromatography로 정제하였다. (C) 정제된 Cox5a_ybbR로 *in vitro* protein import assay를 수행해 수송가능 여부를 확인 할 수 있었다. PK(Proteinase K) protection assay를 통해서 미토콘드리아 기질 내부로 수송되지 못한 Cox5a Pre는 PK를 넣어주었을 때 digestion되어 없어진 것을 확인할 수 있었다.

C) Biotinlyation 된 미토콘드리아와 *in vitro* protein import assay

미토콘드리아를 고정시키기 위해서는 *in vivo* 또는 *in vitro* biotinylation 을 수행해야 한다. 이때 *in vitro* protein import assay 를 통해 biotinylation 된 미토콘드리아로 단백질 수송이 가능한지 확인된다면 광학집게 실험에서의 단백질 수송력 측정이 가능 할 것이다. 먼저 *in vivo* biotinylation 된 미토콘드리아에 *E.coli* 에서 과발현 시켜 정제한 Cox5a_ybbR 를 수송시키는 실험을 진행한 결과 미토콘드리아 내부로 수송된 후 MPP 에 의해 MTS 가 잘린 형태의 Cox5a_ybbR M 을 관찰 할 수 있었다. 결론적으로 *in vivo* biotinylation 된 미토콘드리아가 *in vitro* 단백질 수송 실험에 적합하다는 결론을 내릴 수 있었다 (Figure 5A). 또한 *in vitro* biotinylation 된 미토콘드리아에 S^{35} 로 labeling 된 Cox5a 로 수송실험을 진행해 수송가능 여부를 판단했다. 그 결과 미토콘드리아 내부로 들어가지 못한 형태의 단백질인 Cox5a Pre 와 MTS 가 잘린 형태의 단백질인 Cox5a M 이 관찰되어 *in vitro* biotinylation 된 미토콘드리아가 단백질 수송실험에 적합하다는 결론을 도출해 낼 수 있었다 (Figure 5B).

A



B

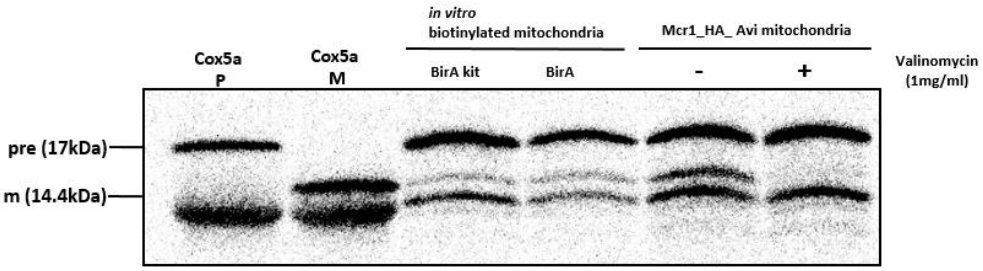


Figure 5. *In vivo* 또는 *in vitro* bioinylation된 미토콘드리아의 단백질 수송가능 여부 확인

(A) *In vivo* biotinylation된 미토콘드리아와 IPTG induction 시스템에 의해 *E.coli*에서 과발현 시켜 정제한 Cox5a_ybbR로 *in vitro* protein import assay를 수행하여 광학집게 실험에 적합성을 판단하였다. 그 결과 미토콘드리아 내부로 수송된 형태의 Cox5a_ybbR M을 관찰 할 수 있었다. 결론적으로 *in vivo* biotinylation된 미토콘드리아는 단백질 수송 실험에 적합하다는 결론을 낼 수 있다. (B) *In vitro* biotinylation된 미토콘드리아와 S^{35}로 labeling한 Cox5a로 수송실험을 진행한 결과 미토콘드리아 내부로 수송된 형태의 단백질인 Cox5a M을 관찰 할 수 있었다. *In vitro* biotinylation된 미토콘드리아가 단백질 수송실험에 적합하다는 결론을 내릴 수 있었다.

2. 미토콘드리아 지향신호 길이에 따른 Yta10 단백질 수송효율 분석

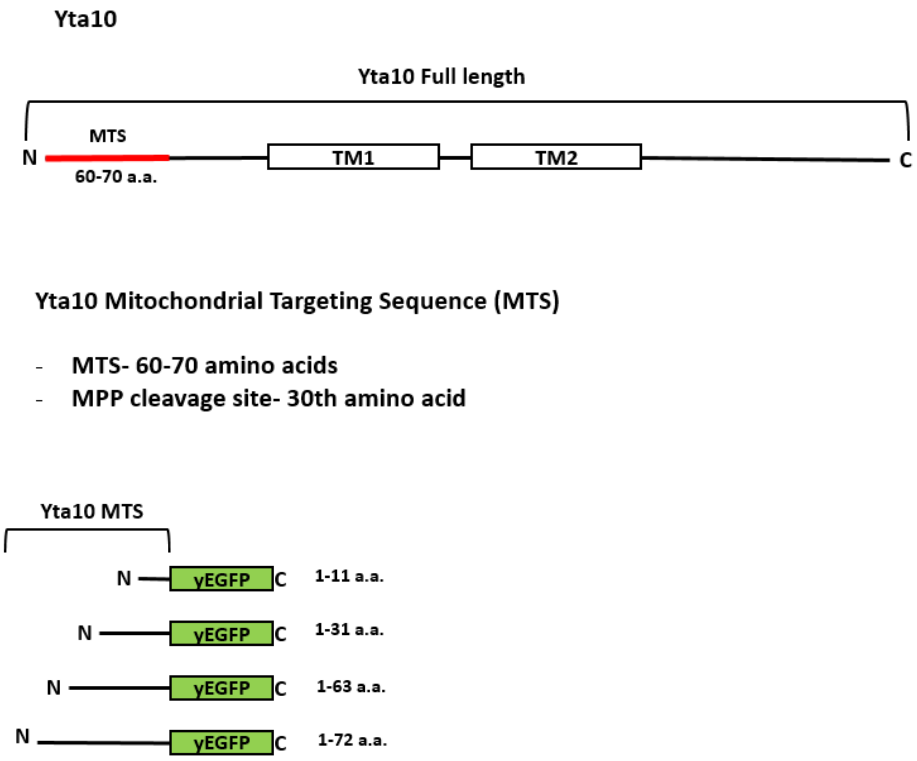
기존의 연구에서는 *in vitro*에서 단백질 수송 실험을 통해 미토콘드리아에 내로 수송되어 미토콘드리아 지향신호가 잘린 단백질의 양과 세포질에 남아서 지향신호가 잘리지 않은 단백질의 양을 시간에 따라 비교함으로서 단백질 수송효율을 알 수 있었다 (22, 23). Lim의 연구에서는 세포내에 있는 미토콘드리아와 단백질을 분리해 각각을 시험관에 섞어 주어 *in vitro*에서 단백질 수송효율을 관찰하였다. 본 연구에서는 *in vivo*에서 미토콘드리아 지향신호의 길이에 따라서 수송효율이 세포내에서 어떻게 달라지는 지에 대해 연구하고자 한다.

미토콘드리아 단백질은 특별한 신호인 미토콘드리아 지향신호를 가지고 있으며 이 신호에 의해 미토콘드리아 내부로 수송된다. 본 연구에서는 미토콘드리아 내막 단백질인 Yta10의 지향신호 길이에 따라 단백질 수송효율이 어떤 양상으로 변화하는지 알아 볼 것이다 (Figure 6A). 이 양상을 좀 더 쉽고 빠르게 관찰하기 위해 Yta10의 지향신호에 효모 녹색 형광 단백질(yeast Enhanced Green Fluorescent Protein, yEGFP)을 재조합 시켰다. 형광현미경에서 관찰된 미토콘드리아 내부의 yEGFP 신호만으로 대략적인 미토콘드리아 지향신호 길이에 따른 수송효율을 비교할 수 있었다. 그 결과 미토콘드리아 지향신호의 길이가 짧을수록 세포질에 많은 양의 단백질이 남아있어 세포 전체에 녹색형광 신호가 퍼져있는 경향이 보였다 (Figure 7A, B). 반면 미토콘드리아 지향신호가 길어질수록 세포내에서 실과 같은 형태의 미토콘드리아 신호가 증가하는 것을 볼 수 있었다 (Figure 7C, D, E). 정확한 정량적 분석을 위해서는 Yta10(1-11)-yEGFP, Yta10(1-31)-yEGFP, Yta10(1-63)-

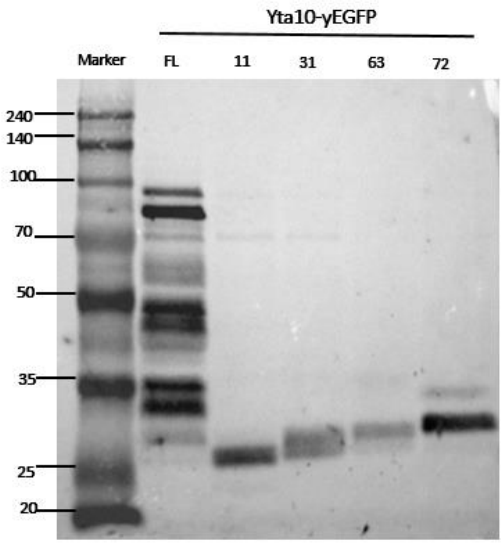
yEGFP, Yta10(1-72)-yEGFP, Yta10 FL-yEGFP 각각을 발현하는 효모세포를 배양한 후 세포분획법을 통하여 세포질에 남아있는 단백질의 양과 미토콘드리아 내로 수송된 단백질의 양을 정량화 할 수 있다. 일단 세포분획법을 시행하기 이전에 효모세포에서 각각의 단백질 발현을 확인하였다 (Figure 6B).

Yta10과 같은 m-AAA protease에 의해 MrpL32 processing이 되는 것은 미토콘드리아 내부에 있는 리보솜의 결합과 필수적인 respiratory chain의 소단위들의 합성에 요구된다 (24). 만약 Yta10이 세포내에서 결실 된다면 미토콘드리아의 respiratory complex와 ATPase complex가 더 이상 합성되지 않아 비발효성 탄소원에서 살지 못한다. 본 연구에서는 Yta10FL-yEGFP가 미토콘드리아내로 제대로 수송되어 제 기능을 수행할 수 있는지 알아보기 위해 complementation assay를 수행하였다. Yta10이 결실된 세포에 Yta10FL-yEGFP를 transformation을 시행한 결과 비발효성 탄소원인 글리세롤에서 자라는 것을 관찰 할 수 있었다 (Figure 6C). 이 결과는 Yta10FL-yEGFP가 미토콘드리아로 수송되어 기능적인 m-AAA protease complex를 이루었다는 것임을 알려준다.

A


Yta10
Yta10 Full length
MTS
N
60-70 a.a.
TM1
TM2
C
Yta10 Mitochondrial Targeting Sequence (MTS)
- MTS- 60-70 amino acids
- MPP cleavage site- 30th amino acid
Yta10 MTS
N
yEGFP
C
1-11 a.a.
N
yEGFP
C
1-31 a.a.
N
yEGFP
C
1-63 a.a.
N
yEGFP
C
1-72 a.a.

B


Yta10-yEGFP
Marker
FL
11
31
63
72
240
140
100
70
50
35
25
20

C

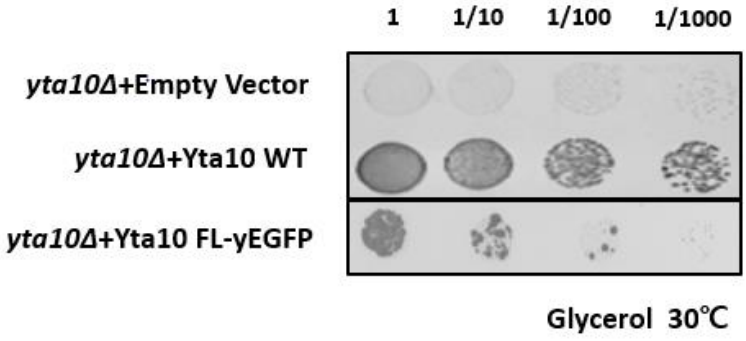
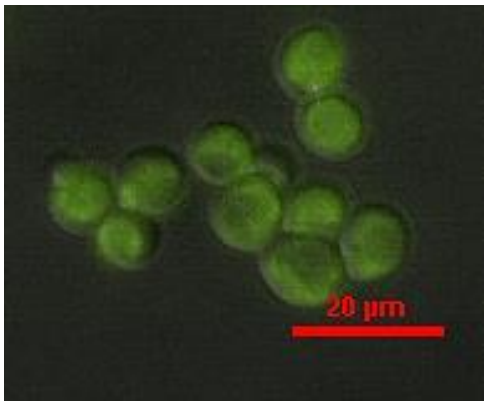


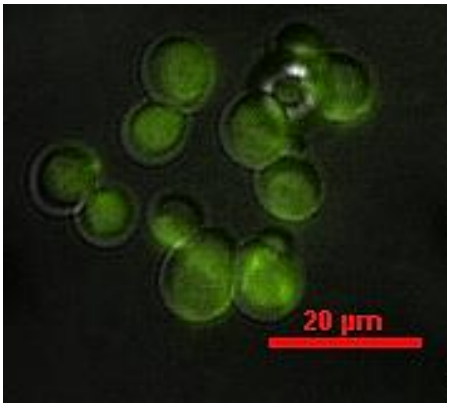
Figure 6. 미토콘드리아 지향신호의 길이에 따른 Yta10-yEGFP 재조합 단백질의 수송효율

(A) Yta10-yEGFP의 4가지의 미토콘드리아 지향신호를 가진 모델 단백질의 그림이다. (B) 효모세포에서의 Yta10(1-11)-yEGFP, Yta10(1-31)-yEGFP, Yta10(1-63)-yEGFP, Yta10(1-72)-yEGFP의 발현 정도를 확인 하였다. (C) Yta10이 결실된 세포에 Empty Vector pRS314, Yta10 WT, Yta10 FL-yEGFP의 complementation assay. Yta10이 결실된 세포에 Empty Vector pRS314, Yta10 WT, Yta10 FL-yEGFP transformant를 비발효성 탄소원을 포함한 YPG 30℃에서 3일 동안 키웠다.

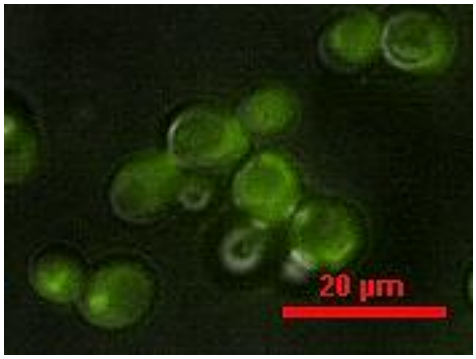
A



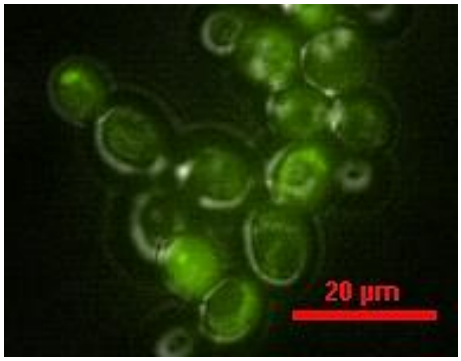
B



C



D



E

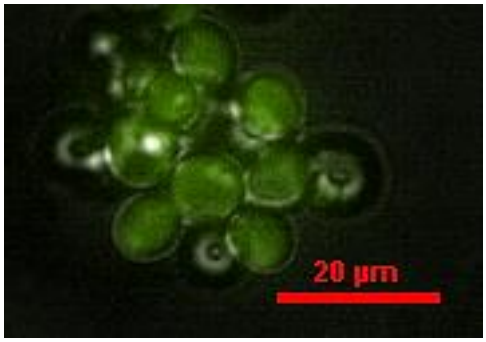


Figure 7. 형광 현미경으로 본 효모 세포내의 Yta10(1-11)-yEGFP, Yta10(1-31)-yEGFP, Yta10(1-63)-yEGFP, Yta10(1-72)-yEGFP, Yta10 FL-yEGFP 녹색형광 신호.

(A) Yta10(1-11)-yEGFP. 녹색형광 단백질이 대부분 세포질에 남아있어 녹색형광 신호가 퍼져 보인다. (B) Yta10(1-31)-yEGFP. 녹색형광 단백질이 Yta10(1-11)-yEGFP 에 비해서 세포질에서의 녹색형광 신호가 줄어들고 미토콘드리아내에서 실같이 생긴 녹색형광 신호가 나타나기 시작한다. (C) Yta10(1-63)-yEGFP. 미토콘드리아내로 들어간 Yta10(1-63)-yEGFP 의 실같이 생긴 녹색형광 신호가 점점 많아지기 시작하고 세포질의 녹색형광 신호가 더 줄어즐었다. (D) Yta10(1-72)-yEGFP. 확연히 미토콘드리아내의 녹색형광 신호가 선명하게 보이는 것을 관찰할 수 있다. (E) Yta10 FL-yEGFP. Control 로 전반적으로 미토콘드리아 내부와 세포질에 녹색형광 신호가 나타나는 것을 관찰 할 수 있었다.

V. 결론 및 논의

1. 광학집게 실험을 위한 샘플 준비

본 연구에서는 생물물리학적인 도구인 광확집게를 이용한 단백질 수송력 측정을 위한 샘플준비까지 진행되었기에 최종적인 결론에는 도달하지 못하였지만 앞으로 진행될 연구의 기반을 마련한 것에 큰 의미를 부여할 수 있다. 일단 미토콘드리아를 streptavidin 으로 코팅된 cover slip 에 고정하기 위해서 *in vivo* 또는 *in vitro* biotinylation 을 시행하여 streptavidin bead binding assay 와 Western blot 에서 SA-HRP 를 통해 biotinylation 이 되었음을 확인 하였다. 또한 모델 단백질을 준비하는 과정에서는 Cox5a_ybbR 이 *E.coli* IPTG induction 시스템을 통하여 정제되고 미토콘드리아 내부로 수송이 가능하다는 것을 *in vitro* protein import assay 를 통해 확인 할 수 있었다. 앞으로 남아있는 과제는 *in vivo* biotinylation 된 미토콘드리아를 streptavidin 으로 코팅된 cover slip 에 고정시키는 일과 모델 단백질인 Cox5a_ybbR 을 50kb DNA linker 와 함께 연결해 광포획 할 수 있는 비드에 연결 시키는 일이 남아 있다.

위의 광학집게 실험으로 미토콘드리아로 단백질이 수송될 때 힘을 측정하는 기법이 구축된다면 미토콘드리아 단백질이 단백질 전달 통로 복합체로 수송 될 때 얼마만큼의 힘이 필요하고 단백질 수송이 시작될 때까지 어느 정도의 시간이 필요한 지를 파악할 수 있게 될 것이다. 나아가 여태껏 우리가 알지 못했던 단백질 수송경로의 미세한 부분을 하나씩 알아 볼 수 있을 것이다. 우리는 지금까지 미토콘드리아

단백질이 단백질 전달 통로 복합체를 통해서 수송된다고 알고 있지만 그 상세한 과정을 알 수 없었다. 하지만 이 생물학적인 한계를 극복하고자 물리적인 도구인 광학집게로 생물학적 현상인 미토콘드리아 단백질 수송에 대해 면밀히 분석해 보려 한다.

2. 미토콘드리아 지향신호 길이에 따른 단백질 수송효율

미토콘드리아 내로 단백질이 수송될 때 미토콘드리아 지향신호를 통해서 수송된다. 미토콘드리아 지향신호의 길이에 따른 Yta10 단백질 수송 효율과의 관계를 알아 보고자 다양한 길이의 미토콘드리아 지향신호와 녹색형광 단백질을 결합시킨 재조합 단백질을 만들었다. 녹색형광 단백질을 각각의 다른 길이의 Yta10 지향신호 뒤에 결합시킨 이유는 형광 현미경으로 단백질이 미토콘드리아 내로 수송되었는지 여부를 쉽게 판단 할 수 있기 때문이다. 형광 현미경에서 녹색형광 신호가 흐리게 퍼져 보이는 것은 대부분의 단백질이 세포질에 남아있기 때문이었고 실과 같은 형태의 강한 녹색형광 신호가 보일 때는 단백질이 미토콘드리아 내부로 수송되었음을 확인 할 수 있었다. 형광 현미경의 사진에서 미토콘드리아 지향신호가 점점 길어 질수록 미토콘드리아 내에 보이는 실과 같은 녹색형광 신호의 강도가 강해지고 많아지는 경향을 관찰할 수 있었다. 결론적으로는 미토콘드리아 지향신호의 길이가 길어질수록 미토콘드리아 내부로의 단백질 수송효율이 증가하는 경향을 관찰하였다. 앞으로, 각각의 길이의 Yta10 단백질을 효모세포에서 발현시켜 세포분획법을 통해 세포질에 남아있는 단백질의 양과 미토콘드리아 내로 수송된 단백질의 양을 정량화하여 구분할 것이다.

VI. 참고문헌

1. Mossmann, D., Meisinger, C., and Vogtle, F. N. (2012). Processing of mitochondrial presequence. Biochimica et Biophysica Acta *1819*, 1098-1106.

2. Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T., and Pfanner, N. (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. Cell 138, 628-644.

3. Dudek, J., Rehling, P., and Laan, M. van der. (2013). Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks. Biochimica et Biophysica Acta *1833*, 274-285.

4. Neupert, W. (1997). Protein import into mitochondria. Annual Review Biochemistry *66*, 863-917.

5. Wiedemann, N., Frazier, A. E., and Pfanner, N. (2004). The protein import machinery of mitochondria. The Journal of Biological Chemistry *279*, 14473-14476.

6. Laan, M. van der., Hutu, D. P., and Rehling, P. (2010). On the mechanism of preprotein import by the mitochondrial presequence translocase. Biochimica et Biophysica Acta *1803*, 732-739.

7. Haynes, C. M., Fiorese, C. J., and Lin, Y.F. (2013) Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond. Trends in Cell Biology 23, 311-318

8. Nargund, A. M., Pellegrino, M. W., Fiorese, C.J., Baker, B. M., and Haynes, C. M. (2012). Mitochondrial import efficiency of ATFS-1 regulates mitochondrial UPR activation. Science *337*, 587-590.

9. Moffitt, J.R., Chemla, Y.r., Smith, S.B., and Bustamante, C. (2008). Recent advances in optical tweezers. Anuual Review Biochemistry *77*, 205-228.

10. Roise, D. and Schatz, G. (1988). Mitochondrial presequences. The Journal of Biological Chemistry *263*, 4509-4511.

11. Tauer, R., Mannhaupta, G., Schnall, R., Pajic, A., Langer, T., and Feldmann, H. (1994). Yta10p, a member of a novel ATPase family in yeast, is essential for mitochondrial function. FEBS Letters *353*, 197-200.

12. Baumann, F., Neupert, W., and Herrmann, J. M. (2002). Insertion of bitopic membrane proteins into the inner membrane of mitochondria involves an export step from the matrix. The Journal of Biological Chemistry *277*, 21405-21413.

13. Vogtle, F. N., Wortelkamp, S., Zahedi, R. P., Becker, D., Leidhold, C., Gevaert, K., Kellermann, J., Voos, W., Sickmann, A., Pfanner, N., and Meisinger, C. (2009). Global analysis of the mitochondrial N-Proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability. Cell *139*, 428-439.

14. Westermann, B. and Neupert, W. (2000). Mitochondria-targeted green fluorescent proteins: convenient tools for the study of organelle biogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast *16*, 1421-1427.

15. Maillard, R. A., Chistol, G., Sen, M., Righini, M., Tan, J., Kaiser, C. M., Hodges, C., Martin, A., and Bustamante, C. (2011). ClpX(P) generates mechanical force to unfold and translocate its protein substrates. Cell *145, 459-469.*

16. Weckbecker, D., and Herrmann, J.M. (2013). Methods to study the biogenesis of membrane proteins in yeast mitochondria. Methods in molecular biology *1033*, 307-322.

17. Beckett, D., Kovaleva, E., and Schatz, P.J. (1999). A minimal peptide substrate in biotin holoenzyme synthetase-catalyzed biotinylation. Protein science: a publication of the Protein Society *8*, 921-929.

18. Meineke, B., Engl, G., Kemper, C., Vasiljev-Neumeyer, A., Paulitschke, H., and Rapaport, D. (2008). The outer membrane form of the mitochondrial protein Mcr1 follows a TOM-independent membrane insertion pathway. FEBS letters *582*, 855-860.

19. van Werven, F.J., and Timmers, H.T. (2006). The use of biotin tagging in *Saccharomyces cerevisiae* improves the sensitivity of chromatin immunoprecipitation. Nucleic acids research *34*, e33.

20. Li, Y., and Sousa, R. (2012). Expression and purification of *E.coli* BirA biotin ligase for *in vitro* biotinylation. Protein Expression and Purification 82, 162-167.

21. Yin, J., Straight, P.D., McLoughlin, S.M., Zhou, Z., Lin, A.J., Golan, D.E., Kelleher, N.L., Kolter, R., and Walsh, C.T. (2005). Genetically encoded short peptide tag for versatile protein labeling by Sfp phosphopantetheinyl transferase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America *102*, 15815-15820.

22. Lim, J.H., Martin, F., Guiard, B., Pfanner, N., and Voos, W. (2001). The mitochondrial Hsp70-dependent import system actively unfolds preproteins and shortens the lag phase of translocation. The EMBO Journal *20, 941-950.*

23. Voos, W., Gambill, B. D., Guiard, B., Pfanner, N., and Craig, E. A. (1993). Presequence and mature part of preproteins strongly influence the dependence of mitochondrial protein import on heat shock protein 70 in the matrix. The Journal of Cell Biology *123*, 119-126.

24. Tatsuta, T., Augustin, S., Nolden, M., Friedrichs, B., and Langer, T. (2007). m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria. The EMBO journal *26*, 325-335.

VII. Abstract

Mitochondria are crucial organelles which are involved in energy production, protein synthesis, and apoptosis. Mitochondrial main translocases are known as TOM (Translocase of Outer Membrane) and TIM (Translocase of Inner Membrane). Most mitochondrial proteins are synthesized within the cytoplasm and translocated into the matrix. This research uses two experiment methods to measure protein import efficiency and advance our understanding towards the dynamics of mitochondrial protein imports. First, biophysical tool optical tweezer was used to quantify mitochondrial protein import force. Biotinylation of mitochondria and *in vitro* import competent protein purification were performed prior to main experiment. Second, various lengths of Yta10 mitochondrial targeting sequence (MTS) at N-terminus were tested to determine the relationship between the length of MTS to mitochondrial protein import efficiency. The quantified values of mitochondrial protein import force makes it possible to observe the dynamics of mitochondrial protein imports. Furthermore, we can understand the effect of length of a mitochondrial targeting sequence on protein import efficiency by differing the lengths of mitochondrial targeting sequences.

Keywords: Mitochondria, Optical tweezer, Translocon, Biotinylation, Yta10, Mitochondrial Targeting Sequence (MTS), Protein import efficiency,