

- Note -

## Single-Cell-Imaging-Based Analysis of Focal Adhesion Kinase Activity in Plasma Membrane Microdomains Under a Diverse Composition of Extracellular Matrix Proteins

Gyu-Ho Choi<sup>1</sup>, Yoon-Kwan Jang<sup>1</sup>, Jung-Soo Suh<sup>1</sup>, Heon-Su Kim<sup>1,2</sup>, Sang-Hyun Ahn<sup>1</sup>, Ki-Seok Han<sup>3</sup>, Eunhye Kim<sup>1</sup> and Tae-Jin Kim<sup>1,2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Integrated Biological Science, Pusan National University, Busan 46241, Korea

<sup>2</sup>Institute of Systems Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea

<sup>3</sup>Department of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received December 10, 2021 / Revised December 15, 2021 / Accepted December 16, 2021

Focal adhesion kinase (FAK) is known to regulate cell adhesion, migration, and mechanotransduction in focal adhesions (FAs). However, studies on how FAK activity is regulated in the plasma membrane microdomains according to the composition of extracellular matrix (ECM) proteins are still lacking. A genetically encoded fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based biosensor can provide useful information on the activity of intracellular signals with high spatiotemporal resolution. In this study, we analyzed the FAK activities in lipid raft (detergent-resistant membrane) and non-lipid raft (non-detergent-resistant membrane) microdomains using FRET-based membrane targeting FAK biosensors (FAK-Lyn and FAK-KRas biosensors) under four different ECM protein compositions: glass, type 1 collagen, fibronectin, and laminin. Interestingly, FAK activity in response to laminin in a lipid raft microdomain was lower than that in other ECM conditions. Cells subjected to fibronectin showed higher FAK activity in a lipid raft microdomain than that in a non-lipid raft microdomain. Therefore, this study demonstrates that the FAK activity can be distinctively regulated according to the ECM type and the environment of the plasma membrane microdomains.

**Key words :** Biosensor, extracellular matrix, focal adhesion kinase, FRET, single cell imaging

### 서 론

국소접착인산화효소(Focal adhesion kinase, FAK)는 국소접착부(Focal adhesions, FAs)에 존재하는 인산화 효소로써 세포부착, 세포이동, 세포역학적 신호전달(mechanotransduction) 등을 조절한다고 알려져 있다[2, 7-9, 16].

특히 FAK은 국소접착부 부분에서 중요한 역할을 하는 인테그린(integrin)과 같이 위치하여 인테그린 매개 신호전달에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다[6, 18, 27]. 인테그린은 세포외 기질(extracellular matrix, ECM)과 상호작용하는 막단백질로써  $\alpha$ -아단위(subunit)와  $\beta$ -아단위의 조합으로 구성이 되어 있는데 두 인테그린 아단위의 조합에 따라 다양한 아형(subtype)이 존재하고 각 아형은 특이적으로 상호작용하는 ECM 종류를 가지고 있는 것으로 알려져 있다[1, 4, 5]. 인테그린과 ECM 단백질의 결합은 인테그린 군집화와 어댑터 단백질, 세포골격

복합체, 이차 전달자 등의 후속 신호에 영향을 미친다고 알려져 있다[11, 12, 19].

또한 인테그린은 활성제 불용성 막(detergent-resistant membrane, DRM)과 같이 존재하는 지질유동섬(Lipid raft)에 위치한다고 알려져 있다[14]. 지질유동섬이란 세포막에 존재하는 세포막 미세영역(membrane microdomain)의 일종으로 세포내 방면으로는 스피ング로당지질(sphingolipid)과 콜레스테롤(cholesterol)이 풍부하고 세포 외 방면으로는 긴 사슬 지방산(long chain fatty acid)을 포함한 glycophospho-sphatidylinositol(GPI) anchor를 가진 막 단백질들을 통해 ECM과 상호작용 할 수 있는 영역으로 ECM에 의한 물리적 자극이 세포 내로 전달이 될 수 있는 부위라고 알려져 있다[2, 26]. 반면에 비-지질유동섬의 경우엔 위와 같은 특징을 가지고 있지 않는다[15]. 따라서 FAK의 활성은 ECM의 종류와 인테그린이 존재하는 지질유동섬 부분과 비-지질유동섬 부분에 따라 활성이 다양하게 나타날 것으로 기대할 수 있다. 하지만 전통적인 실험 방법으로는 활성제 불용성 막의 추출 과정 중 단백질의 용해성이 활성제 처리 시 변하여 활성제 불용성 막과 지질유동섬 간의 위치가 일치하지 않게 되고[13, 21] 세포와 살아있는 상태에서 ECM이 상호작용할 때 순간적으로 나타나는 FAK의 활성을 관측하기 어렵다는 문제점이 있었다. 따라서 본 연구에서는 FRET을 기반 바이오센서를 정확하게 원하는 세포막 미세영역

\*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2261, Fax : +82-51-581-2962

E-mail : [tjkim77@pusan.ac.kr](mailto:tjkim77@pusan.ac.kr)

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

에 위치시키고 실시간 생 세포 이미징(live cell imaging)을 통해 세포 전체에서 나오는 신호가 아닌 세포부착부, 특히 ECM와 상호작용을 많이 하는 층상위족(lamellipodia)과 사상위족(filopodium) 부분의 FRET 신호 만을 정확하게 측정하여 FAK 활성을 시공간적 분석을 진행하였다. 이를 통해 생 세포의 세포가장자리 부분에서 다양한 종류의 ECM과 상호작용을 할 때 각각 다른 세포막 미세영역에서 나타나는 FAK 활성의 차이를 알 수 있었다.

## 재료 및 방법

### DNA 플라스미드

본 연구에서 사용된 FAK-Lyn, FAK-KRas 바이오센서는 캘리포니아 대학교 샌디에고 캠퍼스 생명공학과 Yingxiao Wang 교수로부터 기증 받았다. 센서는 ECFP와 YPet 형광색과 사이에 SH2 도메인과 링커 그리고 FAK의 기질부를 포함하는 형태로 구성되어 있다. FAK-Lyn 바이오센서의 N말단에는 지질유동섬(Lipid raft)을 표적하는 Lyn tag로 MGC1KSKRKDN-LNDDE 모티프(motif)가 FAK-KRas 바이오센서의 C말단에는 비-지질유동섬(non-Lipid raft)을 표적하는 Kras tag로 KKKKKKSCKTCVIM 모티프가 사용되었다. 센서의 구성 및 작동원리는 Fig. 1에 서술하였으나 더 자세한 내용은 선행연구에 잘 나타나 있다[20].

### HeLa 세포 배양

HeLa 세포주는 한국과학기술연구원 성지혜 박사 연구팀

(Korea Institute of Science and Technology, Republic of Korea)으로부터 제공받았다. HeLa 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GenDepot, Katy, TX, USA)에서 배양되었고, 배지는 10% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, UT, USA), 1 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin (P/S, GenDepot, Katy, TX, USA)를 포함하고 있다. 세포는 인큐베이터(BB 150 CO<sub>2</sub> Incubator, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 37°C의 가습 환경에서 5% CO<sub>2</sub>로 유지되었다. 세포는 세포 외 기질이 처리가 되었거나 되지 않은 유리 바닥 공초점 접시(Glass bottom confocal dish, SPL, Pocheon, Republic of Korea)에서 배양되었다. 세포 외 기질 처리시 제1형 коллаген(Type1 collagen, Corning, Corning, NY, USA), 피브로넥틴(Fibronectin, Gibco, Waltham, MA, USA), 라민(Laminin, Gibco, Waltham, MA, USA)을 Molecular water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 각각 200 µg/ml, 10 µg/ml, 10 µg/ml로 회석하여 유리 바닥 공초점 접시에 각각 200 µl씩 분주하고 37°C에서 2시간 처리 후 Phosphate buffered saline (PBS, Welgene, Seoul, Republic of Korea)로 씻은 뒤 세포를 배양하였다. DNA 플라스미드 transfection시 Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 제조업체의 지침에 따라 사용하였다. Transfection을 한 세포는 약 60시간 정도 배양 후 이미징을 진행하였다.

### 현미경과 이미지 산출

이미징 전에 세포를 PBS로 씻은 후 CO<sub>2</sub>-독립배지(CO<sub>2</sub>-independent media, Gibco, Waltham, MA, USA)로 배지를 교

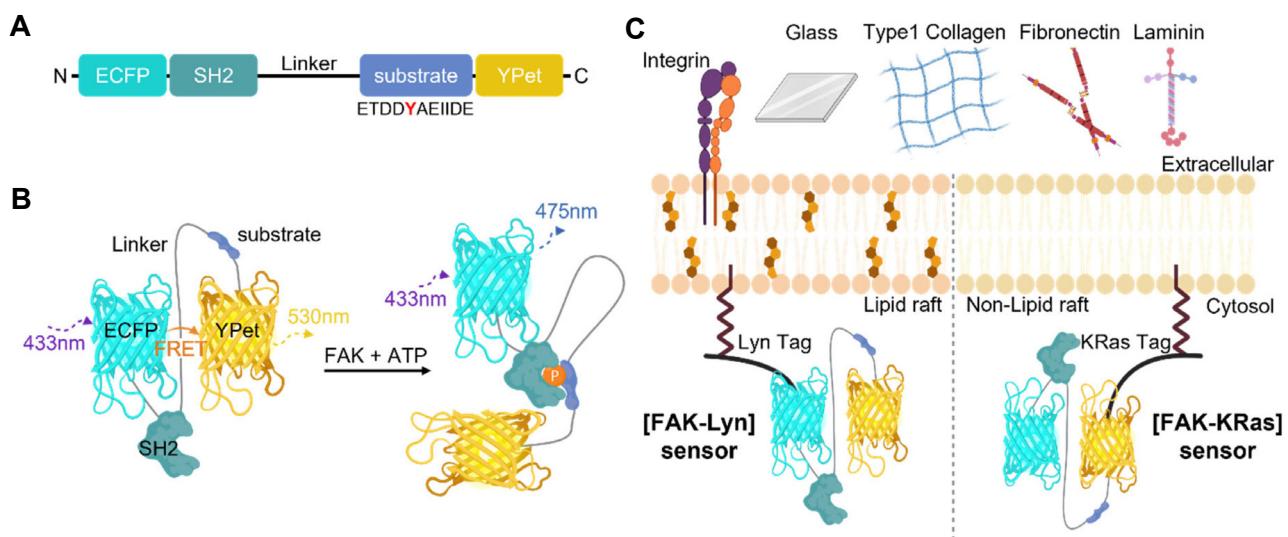


Fig. 1. The design, characterization, and localization of the FRET-based FAK biosensor. A) Schematic diagram of the FAK biosensor. The FAK biosensor comprises an ECFP donor, SH2 domain, substrate, YPet acceptor. The substrate peptide is derived from FAK containing Tyr397 (indicated as red Y). B) The FAK biosensor shows the conformational change by phosphorylation at Tyr397 in the substrate domain, leading to a decrease in the FRET emission intensity. C) Localization of FAK-Lyn and FAK-KRas biosensor. Integrin will be expected to interact with four different ECM conditions. These diagrams were illustrated using Biorender (<http://biorender.com/>).

체하였다. CO<sub>2</sub>-독립배지는 0.5% fetal bovine serum (FBS, HyClone, Logan, UT, USA), 1 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin (P/S, GenDepot, Katy, TX, USA), 4 mM L-glutamine (Welgene, Seoul, Republic of Korea)을 포함하고 있다. 이미지를 진행하는 동안 세포는 37°C 항온상자와 CO<sub>2</sub>-독립배지에서 유지되었다. 이미지는 charge-coupled device (CCD) camera (DFC450C, Leica, Wetzlar, Germany)와 100X HG PL FLUOTAR objective/NA 1.32 oil immersion이 장착된 Leica Dmi8 현미경을 이용하여 산출되었다. ECFP 측정을 위한 필터 구성은 436/20 여기 필터, 455 dichroic mirror, 480/40 방출 필터로 구성되었고 FRET 측정을 위한 필터 구성은 436/20 여기 필터, 455 dichroic mirrors, and 535/30 방출 필터로 구성되었다. 이미지는 LAS X 소프트웨어(LAS X, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하여 계산하고 분석하였다. FRET 바이오센서 이미지의 ECFP, FRET의 방출 강도를 계산할 땐 이미지의 배경을 차감하였다.

### FRET 이미지 분석

배경영역의 형광 강도를 선택하여 정량 한 뒤 FRET 및 ECFP 채널의 관심영역(Region Of Interest, ROI)에서 차감하였다. ECFP/FRET의 픽셀-대비-픽셀(pixel-by-pixel) 이미지는 FRET와 ECFP의 배경(bg)을 제거한 형광 강도 이미지를 기반으로 다음과 같이 계산되었다.

$$I (ECFP_{ROI}) - I (ECFP_{bg}) / I (FRET_{ROI}) - I (FRET_{bg}),$$

여기서 'I'는 각 채널의 각 영역의 강도를 나타낸다. 픽셀-대비-픽셀 비율 이미지는 픽셀의 색상과 밝기가 ECFP/FRET 비율에 의해 결정되는 LAS X 소프트웨어의 intensity modified display 모드로 표시되어 이미지로 산출되었다. 각 채널의 형광강도를 측정 시 하나의 세포당 3군데의 ROI를 선택해 평균을 내어 계산에 사용하였다.

### 통계처리

모든 통계학적 데이터는 평균 ± 평균의 표준편차(SD) 또는 표준 오차(SEM)로 표현되었다. GraphPad Prism 7.0 (Graph Pad Software, San Diego, CA, USA) 소프트웨어를 사용하여 통계 평가가 실시되었고, student t-test와 one-way ANOVA test를 수행하여 실험군 간의 통계적 차이를 확인하였다. 유의한 차이는 P값(\*<0.05, \*\*<0.01, \*\*\*<0.001, \*\*\*\*<0.0001)에 의해 결정되었다.

### 결 과

#### FRET 기반 FAK 바이오센서를 통한 FAK 활성의 시각화

FAK의 신호를 시각화하기 위해 본 연구자는 형광공명에너지전이(FRET)을 이용한 바이오센서를 사용하였다. FRET이란 두 개의 형광 분자가 10 nm 이하로 거리가 가까워지면 파장대

가 낮은 한쪽 형광분자(공급자)의 방출 파장대의 에너지가 다른 쪽 형광분자(수급자)로 이동하여 수급자의 방출 파장대의 형광을 발생하는 현상을 말한다[10]. 이 현상을 이용하여 분자간의 상호작용을 측정하는 바이오센서들이 많이 개발이 되어 있다[22]. 특히 FRET 기반 FAK 바이오센서는 여러가지가 개발되어 있지만[3, 17] 본 연구에선 그 중 가장 특이성이 높은 FRET 기반 바이오센서를 사용하였다[20].

Fig. 1A에서는 FRET 기반 FAK 센서의 구성에 대한 그림이다. 센서의 양 말단에는 형광 단백질인 ECFP와 YPet이 위치하고 그 사이에는 인산화 된 Tyr397과 결합할 도메인(domain)인 SH2 도메인과 FAK에 의해 인산화가 될 Tyr397을 포함하는 기질 부분 그리고 그 사이를 유연하게 이어줄 링커(linker)로 구성이 되어 있다.

Fig. 1B에서는 FAK 센서의 작동원리를 나타내고 있다. FAK의 활성도가 낮을 때는 ECFP와 YPet이 병렬로 정렬되어 있어 두 형광 단백질 간의 거리가 가까워져 YPet의 방출 파장(emission wavelength)인 530 nm 파장이 방출되어 높은 FRET 신호를 가지는 반면 FAK이 활성화되면 기질 부분의 Tyr397을 인산화 시켜 SH2 도메인과 인산화 된 Tyr397 간의 친화도가 ECFP와 YPet 간의 친화도보다 더 높아져 SH2 도메인과 Tyr397이 결합하게 된다. 이로 인해 센서 구조가 변하게 되면서 두 형광 단백질 간의 거리가 멀어져 ECFP의 방출 파장인 475 nm의 파장이 방출되어 FRET 신호가 감소하도록 센서가 개발되어 되어있다[20]. FAK 센서는 c-Src 센서[24]를 개조한 버전으로 센서 비활성시 두 형광단백질이 병렬로 정렬되는 것과 링커의 적절한 길이가 구조적으로 겸중되어 있다[23].

이와 더불어 본 연구에선 세포막 미세영역 중 ECM과 상호작용하는 인테그린이 위치하는 지질유동섬과 그렇지 않은 비지질유동섬 부분에서의 FAK 활성 차이를 보기 위해서 Fig. 1C에서 볼 수 있듯이 센서의 N 말단과 C 말단에 각각 지질유동섬 부분에 위치시키는 Lyn tag (MGCIKSKRKDNLNDDE motif)와 비-지질유동섬 부분에 위치시키는 KRas tag (KKKKKSRTKCVIM motif) [20, 25]를 붙인 FAK-Lyn 센서와 FAK-KRas 센서를 사용하여 유리, 제1형 콜라겐(200 µg/ml), 피브로네틴(10 µg/ml), 라미닌(10 µg/ml)의 ECM 조건에서 이미징을 각각 진행하였다. 본 연구에서는 인테그린이 보편적으로 많이 상호작용한다고 알려진 ECM인 제1형 콜라겐, 피브로네틴, 라미닌을 ECM 조건으로 선택하였고[4] 각 ECM의 농도를 위와 같이 설정한 이유는 세포와 인테그린 간의 상호작용을 충분히 유발할 수 있는 포화 농도이면서 각 ECM 구입처에서 세포가 바닥에 접착하기 가장 권장하는 농도이기 때문이다.

실제로 FAK 센서의 FRET 신호 세기가 ECM의 종류와 세포막 미세영역에 따른 FAK 활성의 차이에 따라 차이가 나는지 알아보기 위해, HeLa 세포에 FAK 센서를 Transfection하고, 각기 다른 ECM이 코팅된 유리 바닥 공초점 접시에서 배양하

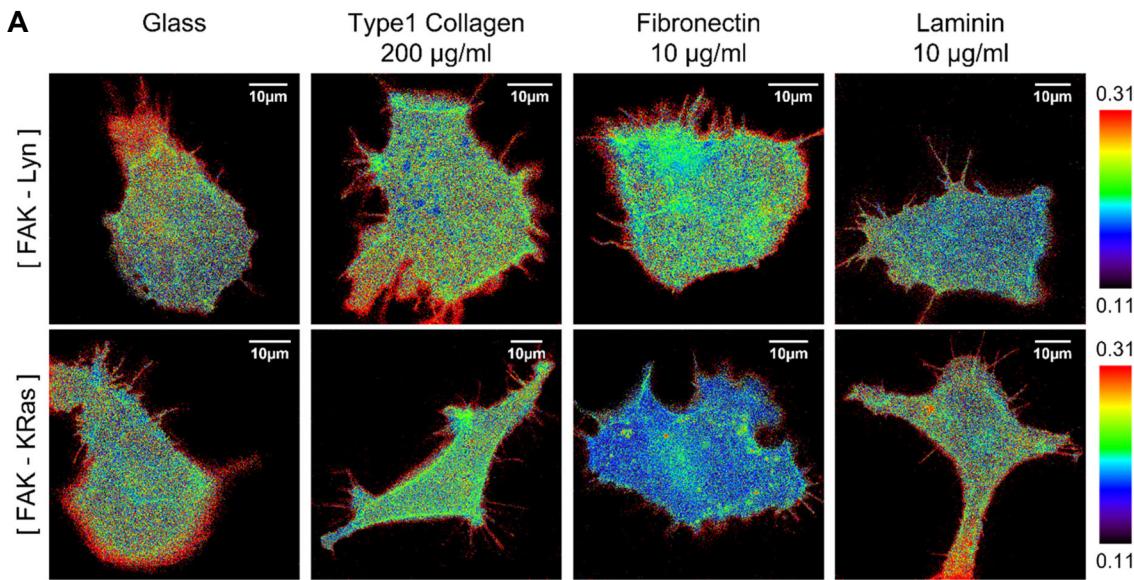


Fig. 2. The FRET ratio images of the FAK-Lyn and FAK-KRas in HeLa cells respond to different ECM proteins. A) FRET ratio images of the FAK-Lyn and FAK-KRas in HeLa cells. The color scale bars represent the range of the ECFP/FRET emission ratio detected by the biosensor. Hot and cold colors indicate a high and low ECFP/FRET ratio, respectively.

여 FRET 비율값을 시각화 하였다(Fig. 2A). 각 이미지의 색지표(color index)는 낮은 FAK 활성을 의미하는 낮은 FRET 비율값은 파란색 계열로 반면에, 높은 FRET 비율값은 붉은색 계열로 점점 변하는 스펙트럼으로 설정하여 표시하였다.

그 결과, FAK-Lyn 센서를 넣은 세포를 다양한 ECM에서 비교한 이미지에선 라미닌 조건에서 청록색(blue-green)이 검출되고 나머지 조건에선 녹적색(green-red)이 검출되는 모습을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 이러한 결과는 라미닌 조건일 때 지질유동섬에 존재하는 인테그린 주변 부분에서의 FAK의 활성이 다른 조건과 비교하였을 때 상대적으로 낮은 활성을 보이는 것을 알 수 있다.

FAK-KRas 센서를 넣은 세포를 다양한 ECM에서 비교한 이미지에서는 피브로네틴 조건에서 청색(blue)이 검출되고 나머지 조건에서는 녹적색(green-red)이 검출되는 모습을 볼 수 있었다(Fig. 2A). 이러한 결과는 피브로네틴 조건일 때 비-지질유동섬 부분에서의 FAK의 활성이 다른 조건과 비교하였을 때 상대적으로 낮은 활성을 보이는 것을 알 수 있다.

같은 ECM 조건일 때 세포막 미세영역에 따른 FAK의 활성 차이를 비교해보면 유리, 유형1 콜라겐, 라미닌 조건에선 모두 녹적색(green-red)으로 차이가 크지 않았다(Fig. 2A의 왼쪽 첫 번째, 두 번째, 네 번째 열). 반면에 피브로네틴 조건에서는 FAK-Lyn 센서를 Transfection 한 경우에 녹적색(green-red)을 보이고 FAK-KRas의 경우에는 청색(blue)이 검출되어 지질유동섬 부분보다 비-지질유동섬 부분에서 FAK의 활성이 낮음을 알 수 있다(Fig. 2A의 왼쪽 세 번째 열).

#### FRET Ratio 이미지의 정량적 분석

정량적인 분석을 위해 one-way ANOVA test와 student t test 통해 유의성을 살펴보았고 점 도표(Dot Graph)로 표현하였다. 이때 한 세포당 세포 가장자리 부위에 3개의 관심영역(ROI)를 설정한 뒤 그 평균을 계산하여 그래프에 사용하였다(Fig. 3).

그 결과, 지질유동섬에 위치하는 FAK의 ECM 유형에 따른 활성도는 라미닌 조건을 유리, 유형1 콜라겐, 피브로네틴 조건과 각각 비교했을 때 라미닌 조건에서 낮은 활성도를 나타냈지만 나머지 ECM 조건끼리는 상호 간에 유의미한 차이가 없었다(Fig. 3A).

비-지질유동섬에 위치하는 FAK의 ECM 유형에 따른 활성도는 피브로네틴 조건을 유리, 제1형 콜라겐 조건과 각각 비교했을 때 피브로네틴 조건에서 낮은 활성도를 보였지만 라미닌 조건과는 차이가 없었다. 나머지 ECM 조건끼리는 상호 간에 유의미한 차이가 없었다(Fig. 3B).

같은 ECM Type 일 때 지질유동섬과 비-지질유동섬에 각각 위치하는 FAK의 활성도는 유리 조건에선 비-지질유동섬 위치보다 지질유동섬 위치에서 높게 나타났고 피브로네틴 조건에선 앞서 말한 유리 조건보다 더 높은 유의성으로 지질유동섬에 위치하는 FAK의 활성이 높게 나왔다 하지만 유형1 콜라겐, 라미닌 조건에선 지질유동섬과 비-지질유동섬 간에 유의미한 FAK의 활성도의 차이는 없었다(Fig. 3C).

#### 고찰

본 연구에서는 형광공명에너지 전이(FRET) 기반의 FAK 센

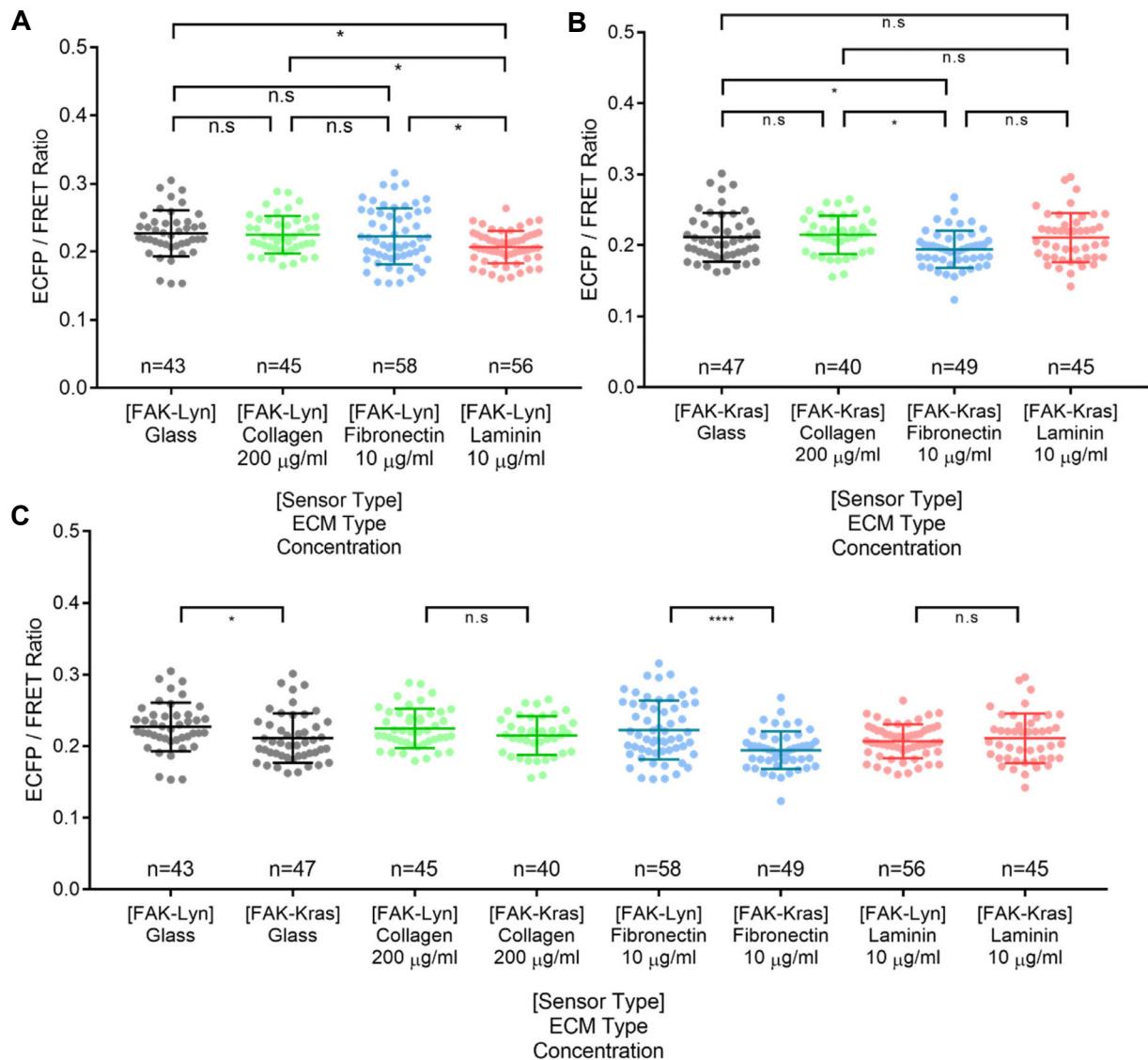


Fig. 3. The dot graphs for ECFP/FRET Ratios of the FAK biosensors in HeLa cells. A-C) ECFP/FRET Ratios of the FAK-Lyn or FAK-KRas biosensor-transfected cells in response to different types of ECM proteins. The dot graphs describe mean values of ECFP/FRET Ratio with error bars indicating the standard error of the mean (S.E.M) (n.s.  $p>0.05$ , \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ , \*\*\* $p<0.001$ , \*\*\*\* $p<0.0001$ , one-way ANOVA for A,B and student t-test for C). Each dot on the graph represents the average of 3 ROIs in a single cell.

서를 통해 세포막 미세영역에 따른 차이와 ECM의 차이로 인해 FAK 활성화의 차이를 시각적으로 확인할 수 있음을 보였다. 선행 연구에 비해 지질유동섬과 비-지질유동섬 간에 FAK 신호의 FRET 비율값의 큰 차이가 나지 않음을 알 수 있었는데 이는 국소접착부의 생성을 촉진하는 EGF 같은 약물을 처리하는 것이 아닌 부착되어 있는 정적인 순간을 관측하여 FAK신호의 큰 차이를 보이지는 않았던 것으로 보인다. 하지만 그럼에도 불구하고 피브로네틴이 ECM으로 존재할 때 지질유동섬 부분과 비-지질유동섬 간에 차이가 높은 유의성으로 나타나는 것을 보아 ECM의 종류와 상호작용을 하느냐에 따라 지질유동섬과 비-지질유동섬 간에도 FAK의 활성이 달라짐을 알 수

있었다. 이는 피브로네틴에 의한 비-지질유동섬에서의 FAK 신호의 활성이 타 영역에 비해 상대적으로 덜 활성화되는 것으로 보여진다.

우리 몸에 있는 세포는 ECM과 인테그린의 상호작용으로 인해 세포는 물리적으로 영향을 지속적으로 받게 된다. 따라서 물리적 자극이 지속적으로 형성되고 있는 상태에서 다양한 화학적 반응들이 연계되어 세포 내에서 일어나므로 학계에서 연구되고 있는 다양한 신호분자들은 생체내의 물리적 환경의 영향을 고려하여 연구할 필요가 있을 것으로 생각된다. 따라서 이번 연구는 세포가 위치하는 환경을 이해하고 그에 따른 다양한 생리학적/병리학적 연구의 기초를 제공할 수 있을 것

이라 사료된다.

## 감사의 글

본 연구는 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었고, 2020학년도 부산대학교 BK21 FOUR 대학원혁신지원사업 지원으로 이루어졌다.

## The Conflict of Interest Statement

The authors declare that they have no conflicts of interest with the contents of this article.

## References

- Barczyk, M., Carracedo, S. and Gullberg, D. 2010. Integrins. *Cell Tissue Res.* **339**, 269-280.
- Bershadsky, A. D., Balaban, N. Q. and Geiger, B. 2003. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **19**, 677-695.
- Cai, X., Lietha, D., Ceccarelli, D. F., Karginov, A. V., Rajfur, Z., Jacobson, K., Hahn, K. M., Eck, M. J. and Schaller, M. D. 2008. Spatial and temporal regulation of focal adhesion kinase activity in living cells. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 201-214.
- Dhavalikar, P., Robinson, A., Lan, Z., Jenkins, D., Chwatko, M., Salhadar, K., Jose, A., Kar, R., Shoga, E., Kannapiran, A. and Cosgriff-Hernandez, E. 2020. Review of integrin-targeting biomaterials in tissue engineering. *Adv. Healthc. Mater.* **9**, 1-26.
- Ffrench-Constant, C. 2004. Integrins. *Myelin Biol. Disord.* **1**, 609-632.
- Guan, J. L. 1997. Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol.* **16**, 195-200.
- Jammey, P. A. and McCulloch, C. A. 2007. Cell mechanics: integrating cell responses to mechanical stimuli. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **9**, 1-34.
- Kim, T. J., Joo, C., Seong, J., Vafabakhsh, R., Botvinick, E. L., Berns, M. W., Palmer, A. E., Wang, N., Ha, T., Jakobsson, E., Sun, J. and Wang, Y. 2015. Distinct mechanisms regulating mechanical force-induced Ca<sup>2+</sup> signals at the plasma membrane and the ER in human MSCs. *Elife* **2015**, 1-14.
- Kim, T. J., Lei, L., Seong, J., Suh, J. S., Jang, Y. K., Jung, S. H., Sun, J., Kim, D. H. and Wang, Y. 2019. Matrix rigidity-dependent regulation of Ca<sup>2+</sup> at plasma membrane microdomains by FAK visualized by fluorescence resonance energy transfer. *Adv. Sci.* **6**, 4.
- Kiyokawa, E., Hara, S., Nakamura, T. and Matsuda, M. 2006. Fluorescence (Förster) resonance energy transfer imaging of oncogene activity in living cells. *Cancer Sci.* **97**, 8-15.
- Kshitiz, Hubbi, M. E., Ahn, E. H., Downey, J., Afzal, J., Kim, D., Rey, S., Chang, C., Kundu, A., Semenza, G. L., Abraham, R. M., Levchenko, A., Hubbi, M. E., Ahn, E. H., Downey, J., Afzal, J., Kim, D., Rey, S., Chang, C., Kundu, A., Semenza, G. L., Abraham, R. M. and Levchenko, A. 2012. Matrix rigidity controls endothelial differentiation and morphogenesis of cardiac precursors. *Sci. Signal.* **5**, ra41.
- Kshitiz, Park, J., Kim, P., Helen, W., Engler, A. J., Levchenko, A. and Kim, D. H. 2012. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. *Integr. Biol.* **4**, 1008-1018.
- Lichtenberg, D., Goñi, F. M. and Heerklotz, H. 2005. Detergent-resistant membranes should not be identified with membrane rafts. *Trends Biochem. Sci.* **30**, 430-436.
- Lietha, D. and Izard, T. 2020. Roles of membrane domains in integrin-mediated cell adhesion. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1-19.
- Malinsky, J., Opekarová, M., Grossmann, G. and Tanner, W. 2013. Membrane microdomains, rafts, and detergent-resistant membranes in plants and fungi. *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**, 501-529.
- Mitra, S. K., Hanson, D. A. and Schlaepfer, D. D. 2005. Focal adhesion kinase: in command and control of cell motility. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6**, 56-68.
- Papusheva, E., de Queiroz, F. M., Dalous, J., Han, Y., Esposito, A., Jares-Erijman, E. A., Jovin, T. M. and Bunt, G. 2009. Dynamic conformational changes in the FERM domain of FAK are involved in focal-adhesion behavior during cell spreading and motility. *J. Cell Sci.* **122**, 656-666.
- Parsons, J. T., Horwitz, A. R. and Schwartz, M. A. 2010. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 633-643.
- Roca-Cusachs, P., Iskratsch, T. and Sheetz, M. P. 2012. Finding the weakest link-exploring integrin-mediated mechanical molecular pathways. *J. Cell Sci.* **125**, 3025-3038.
- Seong, J., Ouyang, M., Kim, T., Sun, J., Wen, P. C., Lu, S., Zhuo, Y., Llewellyn, N. M., Schlaepfer, D. D., Guan, J. L., Chien, S. and Wang, Y. 2011. Detection of focal adhesion kinase activation at membrane microdomains by fluorescence resonance energy transfer. *Nat. Commun.* **2**, 406.
- Shaw, A. S. 2006. Lipid rafts: Now you see them, now you don't. *Nat. Immunol.* **7**, 1139-1142.
- Terai, K., Imanishi, A., Li, C. and Matsuda, M. 2019. Two decades of genetically encoded biosensors based on Förster resonance energy transfer. *Cell Struct. Funct.* **44**, 153-169.
- Waksman, G. 1994. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of the Src oncogene product complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Cell. Mol. Biol.* **40**, 611-618.
- Wang, Y., Botvinick, E. L., Zhao, Y., Berns, M. W., Usami, S., Tsien, R. Y. and Chien, S. 2005. Visualizing the mechanical activation of Src. *Nature* **434**, 1040-1045.
- Zacharias, D. A., Violin, J. D., Newton, A. C. and Tsien, R. Y. 2002. Partitioning of lipid-modified monomeric GFPs into membrane microdomains of live cells. *Science* **296**, 913-916.
- Zeng, Y., Zhang, X. F., Fu, B. M. and Tarbell, J. M. 2018. The role of endothelial surface glycocalyx in mechanosensing and transduction. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1097**, 1-27.
- Zhao, X. and Guan, J. L. 2011. Focal adhesion kinase and its signaling pathways in cell migration and angiogenesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **63**, 610-615.

---

## 초록 : 다양한 ECM 조건하에서의 세포막 미세영역 부위 국소접착인산화효소 활성의 단일세포 이미징 기반 분석

최규호<sup>1</sup> · 장윤관<sup>1</sup> · 서정수<sup>1</sup> · 김현수<sup>1,2</sup> · 안상현<sup>1</sup> · 한기석<sup>3</sup> · 김은혜<sup>1</sup> · 김태진<sup>1,2,3\*</sup>

(<sup>1</sup>부산대학교 생명시스템학과, <sup>2</sup>부산대학교 생명시스템연구소, <sup>3</sup>부산대학교 생명과학과)

국소접착인산화효소(FAK)는 국소접착부에서 세포부착, 세포이동, 세포역학적 신호전달 등에 관여한다고 알려져 있다. 그러나 세포 외 기질(ECM)과 상호작용하는 인테그린 막단백질과 함께 위치하는 세포막 미세영역(membrane microdomain)의 종류와 ECM 구성에 따른 FAK 활성은 여전히 불분명하다. 형광 공명 에너지 전달(FRET)을 기반으로 유전적으로 인코딩 된 바이오센서는 세포 내 FAK 신호를 높은 시공간 해상도로 제공할 수 있다. 본 연구에서는 유리, 제1형 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌의 ECM 조건에서 FRET 기반 막 표적 FAK 바이오센서를 사용하여 지질유동섬(Lipid raft) 및 비-지질유동섬(non-Lipid raft)에서 FAK의 활성을 분석하고 시각화 하였다. 흥미롭게도, 지질유동섬에서 라미닌 조건 하의 FAK 활성은 다른 ECM 조건보다 낮았고, 비-지질유동섬에서 FAK 활성은 다른 ECM 조건보다 낮았다. 동일한 ECM 조건 상의 비교에서는 피브로넥틴 조건일 때 지질유동섬에서 비-지질유동섬 보다 높은 FAK 활성이 관측되었다. 따라서 이번 연구는 FAK 활성도가 ECM 유형 및 세포막 미세영역에 따라 특이적으로 조절되는 것을 시각적, 정량적으로 보여준다.