

Comparative Analysis of Src Activity in Plasma Membrane Subdomains via Genetically Encoded FRET Biosensors

Gyuho Choi¹, Yoon-Kwan Jang¹, Jung-Soo Suh¹, Heonsu Kim^{1,2}, Sanghyun Ahn¹ and Tae-Jin Kim^{1,2,3*}

¹Department of Integrated Biological Science, Pusan National University, Busan 46241, Korea

²Institute of Systems Biology, Pusan National University, Busan 46241, Korea

³Department of Biological Sciences, Pusan National University, Busan 46241, Korea

Received December 12, 2022 /Revised January 20, 2023 /Accepted January 25, 2023

As a member of the focal adhesion complex of the plasma membrane, Src is a nonreceptor tyrosine kinase that controls cell adhesion and motility. However, how Src activity is regulated in the plasma membrane microdomain in response to components of the extracellular matrix (ECM) remains unclear. This study compared and investigated the activity of Src in response to three representative ECM proteins: collagen type 1, fibronectin, and laminin. Genetically encoded FRET-based Src biosensors for plasma membrane subdomains were used. FRET-based biosensors allow the real-time analysis of protein activity in living cells based on their high spatiotemporal resolution. The results showed that Src activity was maintained at a high level under all ECM conditions of the lipid raft, and there was no significant difference between the ECM conditions. In contrast, Src activity was maintained at a low level in the non-lipid raft membrane. In addition, the Src activity of lipid rafts remained significantly higher than that of non-lipid raft regions under the same ECM conditions. In conclusion, this study demonstrates that Src activity can be controlled differently by lipid rafts and non-lipid raft microdomains.

Key words : Biosensor, extracellular matrix, FRET, single-cell imaging, src

서 론

Src은 비수용체 타이로신 인산화효소(nonreceptor tyrosine kinase)로써 세포분화, 증식, 생존에 중요한 역할을 하며[4, 8, 16, 20] 특히 세포역학적 신호전달(mechanotransduction), 세포부착, 세포 이동성에 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다[7, 9, 24, 28].

세포가 extracellular matrix (ECM)에 부착하거나 이동하기 위해서는 국소접착부(Focal adhesions)를 생성하는데 이곳에 인테그린(integrin) 단백질이 위치한다[10]. 인테그린은 ECM과 상호작용하는 막단백질로써 세포 밖 부분에서 ECM과 결합하며 인테그린 군집화와 세포골격 복합체, 이차 전달자, 어댑터 단백질 등 후속 신호에 영향을 미친다고 알려져 있다[15, 22, 23]. 특히 인테그린의 세포 내 부분에 위치하면서 인테그린 매개 신호전달에 중요한 역

할을 하는 국소접착인산화효소(FAK, Focal adhesion kinase)는 Src의 SH2 도메인(domain)과 국소접착인산화효소의 자가인산화된 부위와 결합하여 다양한 하위 신호를 야기하고 있다[21]. 인테그린은 단일 단백질이 아닌 α -단위(subunit)와 β -단위가 각 1개씩 결합이 되어 있는 구조로 되어 있고 각 아단위에도 다양한 종류가 존재하여 α -아단위와 β -아단위가 어떤 조합이 되는가에 따라 인테그린 아형(subtype)이 결정되고 각 아형은 특이적으로 결합하는 ECM이 있다고 알려져 있다[2, 6].

인테그린은 지질유동섬(Lipid raft)에 위치한다고 알려져 있는데[18] 지질유동섬이란 세포막의 일종인 활성제 불용성 막(detergent-resistant membrane, DRM)과 같이 존재하는 세포막 미세영역(membrane microdomain)의 일종으로 세포막 안에는 콜레스테롤(cholesterol)과 스펅고당지질(sphingolipid)이 풍부하고 당지질의 일종으로 세포막 바깥으로는 긴 사슬 지방산(long chain fatty acid)을 포함한 글리코실포스파티딜이노시톨(glycophosphosphatidylinositol, GPI) anchor를 가진 막 단백질들을 통해 ECM과 상호작용할 수 있는 영역으로 ECM과 인테그린과 상호작용에 의한 물리적 자극이 세포 내로 전달이 될 수 있는 부위라고 알려져 있다[3, 35]. 반면에 비-지질유동섬(non-Lipid raft)의 경우엔 위와 같은 특징을 가지고 있지 않는다[19]. 따라서 Src의 활성은 ECM의 종류에 따라 그리고 인테그린이

*Corresponding author

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

E-mail : 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.

존재하는 지질유동성 부분과 그렇지 않은 비-지질유동성 부분 인지에 따라 다양한 활성의 차이를 나타낼 것으로 기대할 수 있다.

하지만 세포를 있는 상태 그대로 관측하는 것이 아닌 세포를 용해하여 추가적인 실험을 진행하는 전통적 실험 방법으로는 살아있는 세포가 순간적으로 나타나는 Src의 활성을 관측하기 어렵고 또한 활성제 불용성 막을 추출한다고 하더라도 활성제 처리 시 단백질의 용해성이 변하여 처리과정 중 활성제 불용성 막과 지질유동성 간의 위치가 일치하지 않게 되는 문제점이 있다[17, 27]. 따라서 본 연구에서는 실시간 생 세포 이미징(live cell imaging)을 사용하기 위해 fluorescence resonance energy transfer (FRET) 기반 바이오센서를 원하는 세포막 미세영역에 정확하게 위치시키고 세포 전체가 아닌 특히 ECM와 상호작용을 많이 세포부착부의 국소접착부에서만 나타나는 FRET 신호를 측정하여 Src 활성을 시공간적 분석을 진행하였다. 이를 통해 생 세포의 세포가장자리 부분의 각기 다른 세포막 미세영역에서 다양한 종류의 ECM과 상호작용을 할 때 나타나는 Src 활성의 차이를 알 수 있었다.

재료 및 방법

DNA 플라스미드

본 연구에 사용한 Src 바이오센서는 N말단부터 ECFP, SH2 도메인, 링커(linker), Src의 기질부, YPet 순서대로 구성되어 있다. Src-Lyn 바이오센서는 N말단에 지질유동성

에 위치시키는 Lyn tag (MGCIKSKRKDNLNDDE 모티프 (motif))를 가지고 있고 Src-KRas 바이오센서는 C말단에 비-지질유동성에 위치시키는 Kras tag (KKKKKKSKTKC VIM 모티프)를 가지고 있다. Fig. 1에서 센서의 구성 및 작동원리에 대하여 설명하였으나 더 자세한 내용은 선행 연구에 잘 나타나 있다[26, 33]. 캘리포니아 대학교 샌디에고 캠퍼스 생명공학과 Yingxiao Wang 교수로부터 Src-Lyn, Src-KRas 바이오센서를 기증 받았다.

HeLa 세포 배양

HeLa 세포는 10% 소태아혈청(HyClone, Logan, UT, USA)과 1 unit/ml penicillin과 100 µg/ml streptomycin (P/S, GenDepot, Katy, TX, USA)을 첨가한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GenDepot, Katy, TX, USA)을 사용하여 배양하였다. 세포는 인큐베이터(BB 150 CO₂ Incubator, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)에서 37°C의 가습 환경에서 5% CO₂로 유지되었다. HeLa 세포주는 한국과학기술연구원(Korea Institute of Science and Technology, Republic of Korea) 성지혜 박사 연구팀으로부터 제공 받았다. 세포는 공초점 접시(Glass bottom confocal dish, SPL, Pocheon, Republic of Korea) 위에 ECM을 처리하거나 처리하지 않은 유리 바닥에서 배양되었다. 사용된 ECM은 Molecular water (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 제1형 콜라겐(Type1 collagen, Corning, Corning, NY, USA), 피브로넥틴(Fibronectin, Gibco, Waltham, MA, USA), 라미닌(Laminin, Gibco, Waltham, MA, USA)을 각각 200 µg/ml,

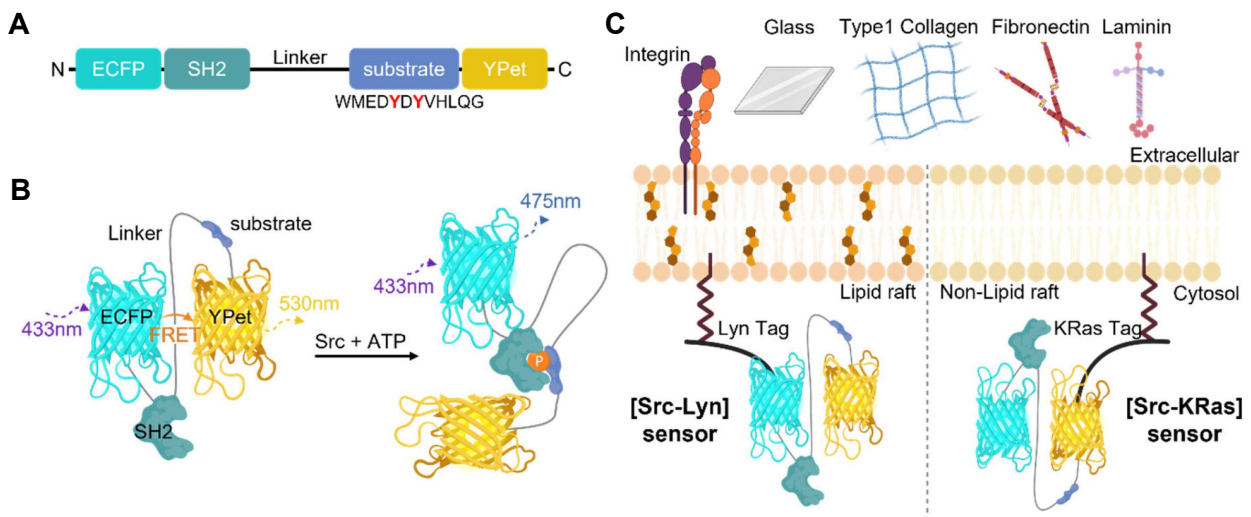


Fig. 1. The design, working mechanism, and localization of the Src biosensor. A) Schematic diagram of the Src biosensor. The Src biosensor consists of a donor ECFP, SH2 domain, linker, Src substrate, and acceptor YPet. The substrate amino acids, Tyr662, and Tyr664, are indicated as red Y. B) Phosphorylation at Tyr662 and Tyr664 in the substrate domain induces a conformational change in the Src biosensor and its lead decrease in the FRET emission intensity. C) Localization of Src-Lyn and Src-KRas biosensors. Four different ECM conditions will be expected to affect integrin-related Src activity. These diagrams were illustrated using Biorender (<http://biorender.com/>).

10 µg/ml, 10 µg/ml로 희석하여 유리 바닥 공초점 접시에 각각 200 µl씩 분주하고 37°C에서 2시간 처리 후 Phosphate buffered saline (PBS, Welgene, Seoul, Republic of Korea)를 이용하여 씻은 뒤 그 위에 세포를 배양하였다. DNA 플라스미드 형질주입 시 제조업체의 지침에 따라 Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)을 사용하였다. 형질주입을 한 뒤 약 60시간 정도 배양 후 이미징을 진행하였다.

현미경과 이미지 산출

이미징 전에 CO₂-독립배지(CO₂-independent media, Gibco, Waltham, MA, USA)로 교체하기 위해 세포를 PBS로 씻었다. CO₂-독립배지의 조성은 0.5% 소태아혈청(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)로 구성이 되었다. 세포는 이미징을 진행하는 동안 37°C 항온상자에서 유지되었다. 이미징에 사용된 현미경은 Leica Dmi8 현미경으로 charge-coupled device (CCD) camera (DFC450C, Leica, Wetzlar, Germany)와 100X HG PL FLUOTAR objective/NA 1.32 oil immersion이 장착되어 있다. 공여자로 사용되는 ECFP 형광을 측정하기 위해 436/20 여기 필터, 455 dichroic mirror, 480/40 방출 필터로 구성되었고 FRET 현상을 측정하기 위해 436/20 여기 필터, 455 dichroic mirrors, 535/30 방출 필터로 구성되었다. 이미지 분석과 계산은 Las X 소프트웨어(Las X, Leica, Wetzlar, Germany)를 이용하였다.

FRET 이미지 분석

Las X 소프트웨어의 픽셀-대비-픽셀(pixel-by-pixel) 이미지 이용한 ECFP/FRET 비율값(Ratio)을 분석할 때 다음과 같이 계산되었다.

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

여기서 'I'는 각 채널의 형광 강도를 의미한다. 위 식에서 표현을 했듯이 정확한 FRET 비율값을 도출하기 위해 FRET 및 ECFP의 이미지 채널에 관심영역(Region Of Interest, ROI)을 설정하여 배경영역의 ROI의 형광 강도를 정량 한 뒤 관심영역에서 나타난 값에서 차감하였다. 이후 FRET 비율값을 산출 시 ECFP/FRET로 계산식을 설정하여 센서가 작동하여 두 형광 단백질의 거리가 멀어질 때 FRET 비율값이 증가하도록 계산하였다. 형광강도를 측정할 때는 하나의 세포당 ROI를 3군데로 설정하여 평균을 내어 계산에 사용하였다. 세포의 픽셀-대비-픽셀 비율 이미지는 LAS X 소프트웨어의 intensity modified display 모드를 이용하여 이미지로 산출되었다.

통계처리

통계처리 시 GraphPad Prism 7.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA) 소프트웨어를 사용하여 one-way ANOVA test를 진행하였다. 모든 통계학적 데이터는 평균 ± 표준 오차(SEM, standard error of the mean)로 표현되었다. 실험군 간의 유의한 차이는 P값(*<0.05, **<0.01, ***<0.001, ****<0.0001)에 의해 결정되었다.

결 과

FRET 기반 Src 바이오센서의 구조와 원리

본 연구자는 Src의 신호를 시각화하기 위해 FRET 현상을 이용한 바이오센서를 사용하였다. FRET이란 10 nm 이하로 서로 다른 여기(excitation), 방출(emission) 파장을 가진 두 개의 형광 분자 간 거리가 가까워질 때 특정한 경우에 에너지를 전달하는 공급자(Donor)에서 에너지를 받는 수급자(Acceptor)로 한 쪽 형광분자의 에너지가 다른 쪽 형광 분자로 넘어 가는 현상으로 공급자에게 여기 파장(excitation wavelength)을 주었을 때 발생하는 공급자의 방출 파장(emission wavelength)이 수급자의 여기 파장대와 유사하여 수급자가 형광을 방출하는 현상을 의미한다 [13]. 이 현상을 이용하여 분자간의 상호작용을 감지하는 다양한 바이오센서들이 개발이 되어 있다[29]. 예를 들어 FRET 기반 Src 바이오센서의 종류로는 Src의 기질[30, 33]을 활용하거나 Src의 SH3 도메인을 목표로 하는 모노바디 [11]를 사용하기도 하고 Src의 활성시와 비활성시 나타나는 단백질 구조의 차이[14]를 활용한 바이오센서 등 다양한 바이오센서가 개발되어 있지만 본 연구에선 ECM과 지질유동성 또는 비-지질유동성에 위치한 Src의 활성 차이를 연구하기 위해 각 지질유동성에 위치할 수 있으며 높은 특이성을 가진 FRET 기반 바이오센서를 사용하였다 [33].

Fig. 1A는 Src 바이오센서의 구성에 대한 개략도이다. 센서의 양 말단에는 공급자로 사용될 ECFP 형광 단백질과 수급자로 사용될 YPet이 위치하고 사이에 Src에 의해 인산화 된 Tyr662, Tyr664와 결합하는 SH2 도메인과 Tyr662, Tyr664가 포함되어 있는 Src의 기질 부분 그리고 FRET 현상이 물리적인 방해 없이 발생할 수 있도록 그 사이를 연결하는 유연한 링커로 되어있다.

Fig. 1B에서는 Src 바이오센서의 작동원리를 모식도로 표현하였다. Src에 의해 센서의 기질 부분이 인산화가 되지 않을 때 ECFP와 YPet이 구조적으로 병렬로 정렬이 되기 때문에 형광단백질 간의 거리가 10 nm 이하로 가까워져 FRET 현상이 나타나게 된다. 이로 인해 YPet의 530 nm 방출파장이 방출되어 높은 FRET 신호를 보이게 된다. 반면에 Src이 활성화되면 기질 부분의 Tyr662, Tyr664가 인산화 되어 SH2 도메인과 결합을 하게 된다. 이러한 센

서 구조의 변형에 의해 두 형광 단백질 간 거리가 멀어져 FRET 현상이 일어나지 않게 되어 475 nm의 ECFP의 방출 파장이 방출되어 FRET 신호가 감소하도록 센서가 개발되어 되어있다[26]. Src 센서는 c-Src 센서[33]를 개조한 버전으로 기존에 c-Src의 구조가 밝혀져 있으므로 센서 비활성시 두 형광단백질이 병렬로 정렬될 것을 구조적으로 예측할 수 있다[31].

Fig. 1C에선 실험에 사용한 4종류의 ECM 조건과 상호작용하는 인테그린이 존재하는 세포막 미세영역인 지질유동섬과 그렇지 않은 비-지질유동섬 부분에서의 Src 활성을 비교하기 위해 특정 세포막 미세영역에 위치한 Src 바이오센서를 모식도로 설명한 그림이다. Src-Lyn 센서에는 N 말단에 지질유동섬에 위치시키는 MGCIKSKRKDN-LNDDE motif를 Lyn tag로 사용하였고 Src-KRas 센서는 C 말단에 비-지질유동섬에 위치시키는 KKKKKKSKT-KCVIM motif를 KRas tag로 사용하였고[26, 34] 각 센서는 유리, 제1형 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌의 ECM 조건에서 이미징을 각각 진행하였다. 본 연구에서는 선행 연구를 통해 인테그린이 상호작용하는 것으로 알려진 ECM인 제1형 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌을 선택하였다[6]. 각 ECM의 농도는 ECM과 인테그린 간의 결합을 충분히 야기할 수 있는 농도를 설정하기 위해 각 ECM 구입처에서 세포 배양 시 권장하는 농도를 사용하였다.

Src 바이오센서를 통한 Src 활성의 시각화

Src 활성의 차이가 세포막 미세영역과 ECM의 종류에 따라 다르게 나타나는 것을 시각화하기 위해 Src 바이오

센서를 HeLa 세포에 형질주입(Transfection)하고, 아무 처리하지 않은 유리 또는 나머지 3가지 ECM이 코팅된 유리 바닥 공초점 접시에 배양하여 이미징에 사용하였다. 이미징을 통한 분석 후 FRET 비율값에 따라 스펙트럼 색지표(color index)로 표현을 하여 낮은 Src 활성을 나타내는 FRET 비율값은 보라색 계열, 높은 FRET 비율값은 적색 계열로 설정하여 표시하였다(Fig. 2A). 그 결과, Src-Lyn 센서를 형질주입 한 세포를 다양한 ECM 조건에서 비교한 이미지에선 모든 ECM 조건에서 녹색(green)이 나타나 각 실험군 간에 큰 차이를 보이지 않았다(Fig. 2A의 상단 행).

Src-KRas 센서를 형질주입 한 세포를 다양한 ECM에서 비교한 이미지에서는 ECM을 처리하지 않은 유리 기질에선 녹색의 색지표를 보여주고 ECM을 처리한 모든 조건에선 청색(blue)이 나타나는 모습을 볼 수 있었다(Fig. 2A의 하단 행). 이러한 이미징 결과를 통해 ECM이 존재하는 조건일 때 비-지질유동섬 부분에서의 Src의 활성이 ECM을 처리하지 않은 조건과 비교하였을 때 상대적으로 낮은 활성을 보이는 것을 알 수 있다.

ECM 조건이 동일할 때 세포막 미세영역의 종류에 따른 Src의 활성 차이를 비교해볼 때 유리 조건일때는 색지표가 녹색으로 차이점을 보이지 않았다(Fig. 2A의 왼쪽 첫번째 열). 반면에 제1형 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌 조건에서는 Src-Lyn 센서를 형질주입 한 경우에는 녹색을 보이고 Src-KRas의 경우에는 청색의 색지표가 나타났다. 따라서 지질유동섬이 비-지질유동섬 부분 보다 Src의 활성이 높은 것으로 나타났다(Fig. 2A의 왼쪽 두번째, 세번째, 네번째 열).

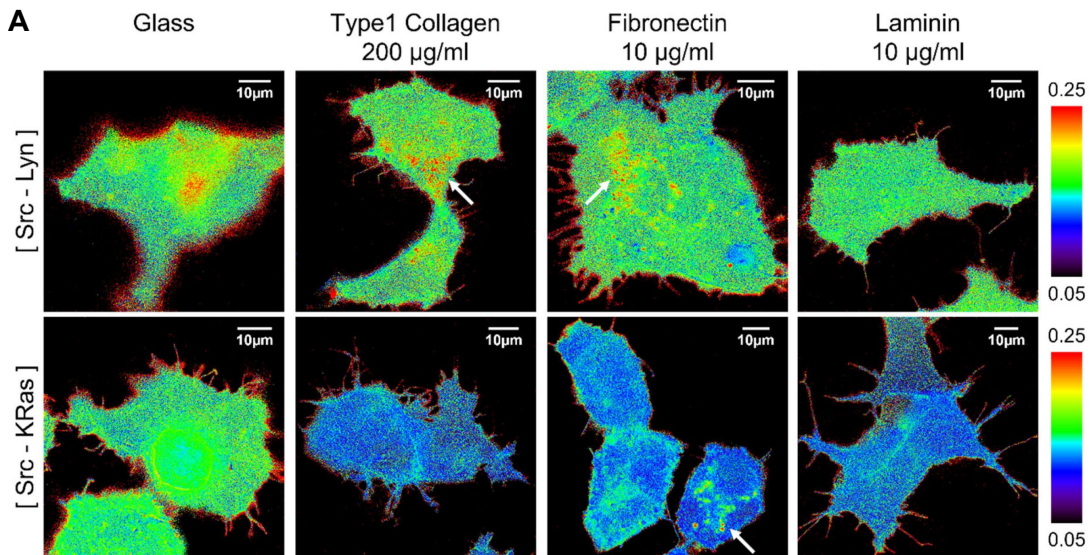


Fig. 2. The FRET ratio images of the Src-Lyn and Src-KRas in HeLa cells respond to different ECM proteins. A) FRET ratio images of the Src-Lyn and Src-KRas in HeLa cells. The color scale bars represent the range of the ECFP/FRET emission ratio detected by the Src biosensor. Hot and cold colors indicate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

또한 제1형 콜라겐, 피브로넥틴 조건에서 Src-Lyn 센서로 측정된 실험군과 피브로넥틴 조건에서 Src-KRas 센서로 측정된 실험군에서 점 같은 구조로 Src의 활성이 높은 부분이 있음을 알 수 있다(Fig. 2A의 흰색 화살표).

FRET 비율값 이미지를 통한 정량적 분석

정량적인 분석을 위해 세포당 3개의 관심영역을 국소 접착부에 설정하여 나온 값의 평균을 계산하여 점 도표(Dot Graph)로 표현하였고 실험군 간의 비교를 위해 one-way ANOVA test를 통해 유의성 검사를 진행하였다(Fig. 3).

그 결과, Fig. 2에서 보여준 결과와 동일하게 안정 상태의 세포에서 인테그린이 위치하는 지질유동성 주변부의 Src의 활성은 ECM 조건에 따라 유의미한 차이를 보이지 않고 모든 ECM 조건에서 유사한 활성도를 보였다(Fig.

3A).

반면 다양한 ECM 조건에 따라 비-지질유동성에 위치하는 Src의 활성도는 유리 조건에서 활성도가 나머지 모든 종류의 ECM 조건보다 높은 Src 활성도를 보여주었고 유리를 제외한 모든 ECM 조건에서 유사한 활성도를 보였다(Fig. 3B).

동일한 ECM 조건 일 때 지질유동성과 비-지질유동성 위치에서 나타나는 Src의 활성도는 유리 조건을 제외하고 나머지 ECM 조건에서 비-지질유동성 위치보다 지질유동성 위치에서 높게 나타났고 특히 라미닌 조건에선 제1형 콜라겐, 피브로넥틴 보다 지질유동성과 비-지질유동성 간에 더 낮은 유의성으로 Src 활성도 차이가 나는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3C).

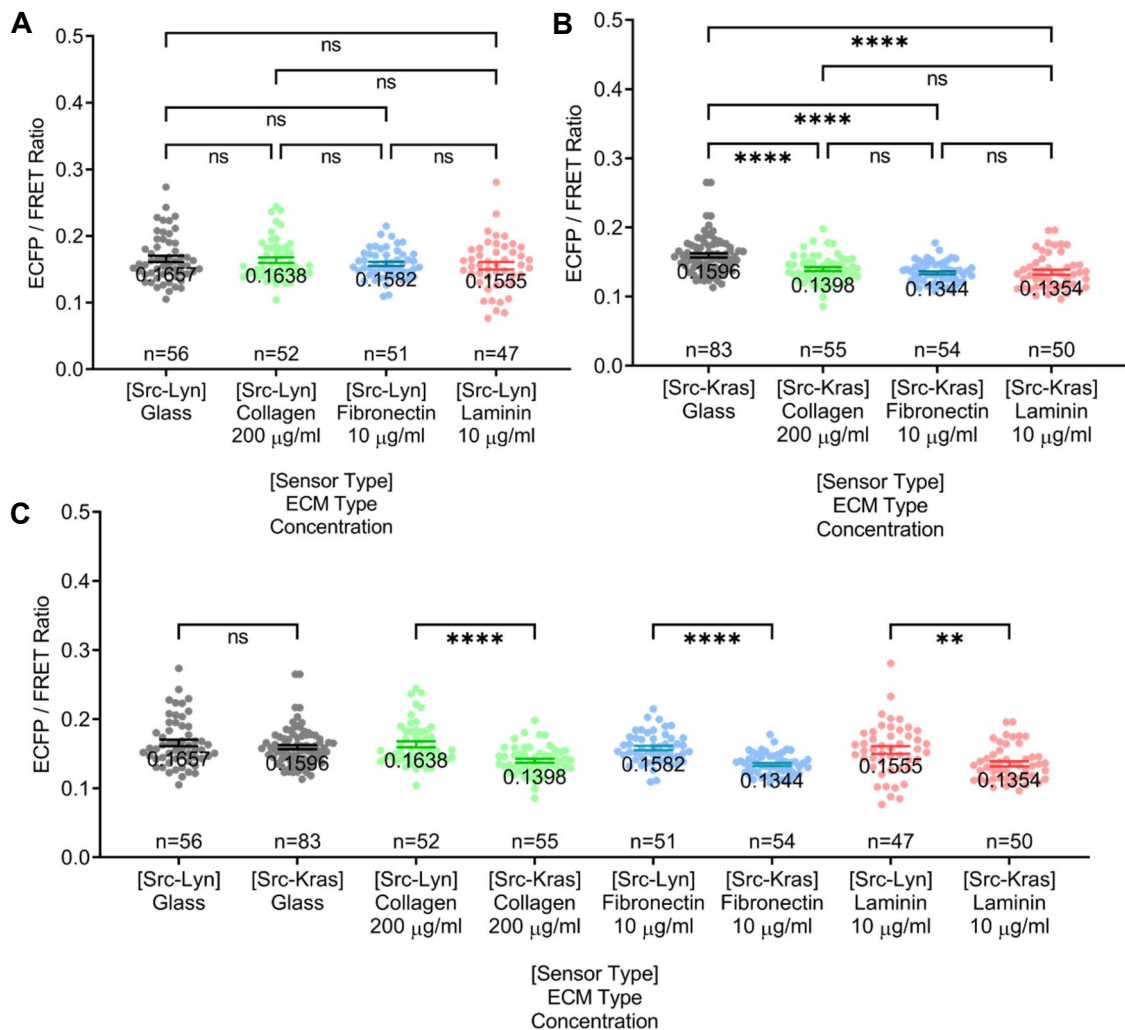


Fig. 3. The dot graphs for ECFP/FRET ratios of the Src biosensors in HeLa cells. A-C) ECFP/FRET Ratios of the Src biosensor-transfected cells in response to lipid raft or non-lipid raft microdomain and different ECM proteins. The mean values of the ECFP/FRET ratio describe under the error bar. The error bars indicate the standard error of the mean (S.E.M) (p -value ($* < 0.05$, $** < 0.01$, $*** < 0.001$, $**** < 0.0001$), one-way ANOVA for A, B, C). Each dot on the graph represents the average ECFP/FRET Ratio from 3 ROIs in a single cell. ‘n’ represents measured cell numbers.

고 찰

본 연구에서는 FRET 기반의 Src 바이오센서를 통해 세포막 미세영역에 따른 차이와 ECM의 차이로 발생하는 Src 활성화의 차이를 시각적, 정량적으로 확인할 수 있음을 보였다.

이번 실험에선 특별히 Src을 자극하는 약물을 처리한 것이 아니기 때문에 안정 상태에서 Src의 활성을 측정할 것이라 할 수 있다. Src의 경우 안정상태 일 때 주로 핵 주위에 있는 엔도솜(endosome)에 위치하고 있다가 자극이 오면 액틴 세포골격(actin cytoskeleton)을 통해 세포막으로 이동한다고 알려져 있다[12, 25]. 실제로 Fig. 2A의 흰색 화살표로 가리킨 부분을 보면 핵 주변부로 보이는 영역에 점 같은 형태로 Src 단백질이 엔도솜에 모여 있어 활성도가 높아지는 것으로 추정되는 부분이 관측이 되었다.

따라서 안정 상태 일 때는 본 연구에서 목표로 하는 국소접착부에서 Src 단백질이 세포막에 잘 분포가 되어 있지 않아 다양한 Src 활성을 보여주지 않을 것으로 예상할 수 있지만 그럼에도 불구하고 실제 결과에선 기저(basal)의 Src의 신호가 존재하고 조건에 따라 다양한 반응을 나타내는 것을 통해 안정상태 일 때도 Src이 주변 환경에 반응을 한다는 것을 알 수 있다.

Fig. 3C의 결과를 보면 안정 상태일 때 지질유동성 실험군에서 Src 활성이 더 높게 나타났는데 이는 세포 부착과 정 중에서 인테그린이 ECM과 결합하여 발생하는 기저 자극에 따른 Src의 활성이 나타난 것으로 보인다. 단 어떠한 ECM도 처리하지 않은 유리 실험군은 지질유동성 부분과 비-지질유동성 간에 차이가 나타나지 않고 ECM을 처리한 실험군보다 높은 Src의 활성을 보이기 때문에 이는 인테그린과 관계없는 세포부착 기작에 의해 Src의 활성이 높아진 것으로 생각할 수 있다.

또한 라미닌과 나머지 ECM을 비교해보았을 때 ECM의 종류에 따라 지질유동성 부분과 비-지질유동성에서 Src 활성의 차이가 달라지는 것을 통해 ECM 특이적인 인테그린 아단위 조합에 따라 Src의 활성이 달라질 수 있음을 시사한다.

본 연구자는 같은 실험 방법으로 국소접착인산화효소의 활성도에 대하여 보고한 적이 있다[5]. 국소접착인산화효소의 활성 패턴과 본 연구의 결과를 비교해볼 때 국소접착인산화효소와 Src은 밀접한 관계를 가지고 있다고 알려져 있지만[21] 본 연구를 통해 안정 상태에서 국소접착인산화효소와 Src의 활성은 패턴을 유사하게 보이는 것이 아닌 서로 독립적으로 이루어진다는 것을 알 수 있다.

본 연구는 단일세포에서 반응을 측정을 하였지만 신체 내의 세포는 ECM, 세포 간의 상호작용으로 인해 지속적으로 물리적인 영향을 받고 세포신호에 영향을 주게 된다[1, 32]. 따라서 물리적 자극이 지속적으로 존재하고 있는 상

태에서 다양한 세포 신호가 발생함으로 기존에 학계에서 연구되고 있는 다양한 세포 신호들은 신호가 발생할 때의 물리적 환경의 영향을 고려할 필요가 있을 것으로 생각되어진다. 따라서 본 연구는 세포 주변의 물리적인 환경과 그에 따른 다양한 생리학적 연구에 기초 정보를 제공할 수 있을 것이라 생각된다.

감사의 글

이 논문은 부산대학교 국립대학 육성사업(2021-2022)의 지원을 받아 연구되었음.

이 논문은 2022년도 정부의 재원으로 한국연구재단 기초연구실사업의 지원을 받아 수행된 연구임(2022R1A4A5 031503).

The Conflict of Interest Statement

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

References

- Alonso, J. L. and Goldmann, W. H. 2016. Cellular mechanotransduction. *AIMS Biophys.* **3**, 50-62.
- 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.
- Brown, M. T. and Cooper, J. A. 1996. Regulation, substrates and functions of src. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1287**, 121-149.
- Choi, G., Jang, Y., Suh, J., Kim, H., Ahn, S., Han, K., Kim, E. and Kim, T. 2022. Single-cell-imaging-based analysis of focal adhesion kinase activity in plasma membrane microdomains under a diverse composition of extracellular matrix proteins. *J. Life Sci.* **32**, 148-154.
- 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**, e2000795.
- Felsenfeld, D. P., Schwartzberg, P. L., Venegas, A., Tse, R. and Sheetz, M. P. 1999. Selective regulation of integrin-cytoskeleton interactions by the tyrosine kinase src. *Nat. Cell Biol.* **1**, 200-206.
- Frame, M. C. 2002. Src in cancer: Deregulation and consequences for cell behaviour. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer* **1602**, 114-130.
- Frame, M. C., Fincham, V. J., Carragher, N. O. and Wyke, J. A. 2002. V-src's hold over actin and cell adhesions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **3**, 233-245.

10. Guan, J. 1997. Focal adhesion kinase in integrin signaling. *Matrix Biol.* **16**, 195-200.
11. Gulyani, A., Vitriol, E., Allen, R., Wu, J., Gremyachinskiy, D., Lewis, S., Dewar, B., Graves, L. M., Kay, B. K. and Kuhlman, B. 2011. A biosensor generated via high-throughput screening quantifies cell edge src dynamics. *Nat. Chem. Biol.* **7**, 437-444.
12. Kaplan, K. B., Swedlow, J. R., Varmus, H. E. and Morgan, D. O. 1992. Association of p60c-src with endosomal membranes in mammalian fibroblasts. *J. Cell Biol.* **118**, 321-333.
13. 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.
14. Koudelkova, L., Pataki, A. C., Tolde, O., Pavlik, V., Nobis, M., Gemperle, J., Anderson, K., Brábek, J. and Rosel, D. 2019. Novel FRET-based src biosensor reveals mechanisms of src activation and its dynamics in focal adhesions. *Cell Chem. Biol.* **26**, 255-268. e4.
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. and Levchenko, A. 2012. Matrix rigidity controls endothelial differentiation and morphogenesis of cardiac precursors. *Sci. Signal.* **5**, ra41.
16. Levin, V. A. 2004. Basis and importance of SRC as a target in cancer, pp. 89-119. In: Kumar, R. (ed.), *Cancer Treatment and Research*. Springer US: Boston, MA.
17. 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.
18. Lietha, D. and Izard, T. 2020. Roles of membrane domains in integrin-mediated cell adhesion. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 5531.
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.
20. Martin, G. S. 2001. The hunting of the src. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2**, 467-475.
21. 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.
22. Park, J., Kim, P., Helen, W., Engler, A. J., Levchenko, A. and Kim, D. 2012. Control of stem cell fate and function by engineering physical microenvironments. *Integr. Biol. (Camb.)* **4**, 1008-1018.
23. 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.
24. Roskoski Jr, R. 2004. Src protein—tyrosine kinase structure and regulation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 1155-1164.
25. Sandilands, E., Cans, C., Fincham, V. J., Brunton, V. G., Mellor, H., Prendergast, G. C., Norman, J. C., Superti-Furga, G. and Frame, M. C. 2004. RhoB and actin polymerization coordinate src activation with endosome-mediated delivery to the membrane. *Dev. Cell* **7**, 855-869.
26. Seong, J., Lu, S., Ouyang, M., Huang, H., Zhang, J., Frame, M. C. and Wang, Y. 2009. Visualization of src activity at different compartments of the plasma membrane by FRET imaging. *Chem. Biol.* **16**, 48-57.
27. Shaw, A. S. 2006. Lipid rafts: Now you see them, now you don't. *Nat. Immunol.* **7**, 1139-1142.
28. Suter, D. M. and Forscher, P. 2001. Transmission of growth cone traction force through apCAM-cytoskeletal linkages is regulated by src family tyrosine kinase activity. *J. Cell Biol.* **155**, 427-438.
29. 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.
30. Ting, A. Y., Kain, K. H., Klemke, R. L. and Tsien, R. Y. 2001. Genetically encoded fluorescent reporters of protein tyrosine kinase activities in living cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 15003-15008.
31. Waksman, G. 1994. Crystal structure of the phosphotyrosine recognition domain SH2 of the src oncogene product complexed with tyrosine-phosphorylated peptides. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* **40**, 611-618.
32. Wang, N. 2017. Review of cellular mechanotransduction. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **50**, 233002.
33. 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.
34. 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.
35. Zeng, Y., Zhang, X. F., Fu, B. M. and Tarbell, J. M. 2018. The role of endothelial surface glycocalyx in mechanosensing and transduction, pp. 1-27. In: Crusio, W. E., Dong, H., Radeke, H. H., Rezaei, N., Steinlein, O. and Xiao, J. (eds.), *Advances in Experimental Medicine and Biology*. Springer International Publisher: Cham, The Switzerland.

초록 : 유전적으로 암호화된 FRET 바이오센서를 통한 세포막 하위 도메인의 Src 활성 비교 분석

최규호¹ · 장윤관¹ · 서정수¹ · 김현수^{1,2} · 안상현¹ · 김태진^{1,2,3*}

(¹부산대학교 생명시스템학과, ²부산대학교 생명시스템연구소, ³부산대학교 생명과학과)

세포막의 국소 접착부 복합체에 있는 한 구성원으로써 Src은 비수용체 타이로신 인산화효소 중 하나로 세포부착과 세포 이동성을 조절한다. 그러나 extracellular matrix (ECM)의 구성에 따라 세포막 미세영역에서 어떻게 Src 활성이 조절되는지는 여전히 잘 알려져 있지 않다. 본 연구는 유전적으로 암호화된 FRET 기반 세포막 하위 도메인 표적 Src 바이오센서를 이용해서 3개의 각기 다른 대표적 ECM 단백질인 제1형 콜라겐, 피브로넥틴, 라미닌에 따른 Src의 활성도를 비교 및 조사하였다. FRET 기반 바이오센서는 살아있는 세포에서 단백질의 활성을 시공간적 고해상력을 토대로 실시간으로 분석할 수 있게 해준다. 결과적으로 모든 ECM 조건에서 지질유동섬(Lipid raft)에서 높은 Src 활성을 보였고 ECM 조건에 따라 큰 차이를 보이지 않았다. 반면에 비-지질유동섬(non-Lipid raft)에선 낮은 Src 활성을 보였다. 게다가 같은 ECM 조건일 때 지질유동섬에서 비-지질유동섬보다 높은 Src 활성을 보였다. 따라서 본 연구는 Src 활성이 지질유동섬과 비-지질유동섬에 따라 다르게 조절된다는 것을 보여주었다.