

형광공명에너지전이 알파카테닌 센서를 활용한 세포 부착접합부에서의 힘 전달 이미징

장윤관^{*,**,*†} · 서정수^{*,**,*†} · 석명은^{***,†} · 김태진^{*,**,*†}

*부산대학교 자연과학대학 생명시스템학과
 46241 부산광역시 금정구 부산대학로 63번길 2
 **부산대학교 자연과학대학 생명과학과
 46241 부산광역시 금정구 부산대학로 63번길 2
 ***동의대학교 IT융합부품소재공과대학 기계공학과
 47340 부산광역시 부산진구 엄광로 176

(2021년 1월 13일 접수, 2021년 3월 10일 수정본 접수, 2021년 3월 17일 채택)

Force Transmission in Cellular Adherens Junction Visualized by Engineered FRET Alpha-catenin Sensor

Yoon-Kwan Jang^{*,**,*†}, Jung-Soo Suh^{*,**,*†}, Myungeun Suk^{***,†} and Tae-Jin Kim^{*,**,*†}

*Department of Integrated Biological Science, Pusan National University, 2 Busandaehak-ro
 63beon-gil, Geumjeong-gu, Busan, 46241, Korea

**Department of Biological Sciences, Pusan National University, 2 Busandaehak-ro
 63beon-gil, Geumjeong-gu, Busan, 46241, Korea

***Department of Mechanical Engineering, IT Convergence College of Components and Materials Engineering,
 Dong-Eui University, 176, Eomgwang-ro, Busanjin-gu, Busan, 47340, Korea

(Received 13 January 2021; Received in revised from 10 March 2021; Accepted 17 March 2021)

요 약

캐드헤린-카테닌 복합체는 세포의 부착 접합부에서 힘의 전달에 중요한 역할을 하는 것으로 생각된다. 그러나 기계적 힘 신호를 시각화 하고 감지하는 적절한 도구의 부재로, 캐드헤린-카테닌 복합체가 세포 간 접합에서 힘 전달을 조절하는 기본 메커니즘은 아직 파악하기가 어렵다. 본 연구에서는 형광공명에너지전이를 기반으로 설계된 알파카테닌 센서를 사용하여 캐드헤린에 의해 매개되는 힘 전달을 시각화 하였다. 이러한 결과는 알파카테닌이 세포-세포 접합부에서 캐드헤린 매개 기계적에너지변환(mechanotransduction) 경로의 핵심적인 힘 트랜스듀서(force transducer)임을 보여준다. 본 연구는 향후 기계적 힘의 세포-세포 상호간의 의사소통에 미치는 영향과 생리학적/병리학적 현상과의 관계를 연구하는 데 중요한 이해를 제공할 것이라 본다.

Abstract – Cadherin-Catenin complex is thought to play an essential role in the transmission of force at adherens junction. Due to the lack of proper tools to visualize and detect mechanical force signals, the underlying mechanism by which the cadherin-catenin complex regulates force transmission at intercellular junctions remains elusive. In this study, we visualize cadherin-mediated force transmission using an engineered α -Catenin sensor based on fluorescence resonance energy transfer. Our results reveal that α -catenin is a key force transducer in cadherin-mediated mechanotransduction at cell-cell junctions. Thus, our finding will provide important insights for studying the effects of chemical and physical signals on cell-cell communication and the relationship between physiological and pathological phenomena.

Key words: α -catenin, Fluorescence resonance energy transfer (FRET), Live cell imaging, Traction force, Shear stress

1. 서 론

조직(tissue)은 일련의 세포들로 구성되어 있고, 조직 내의 세포들은 지속적으로 상호간 활발한 의사소통을 수행한다[1,2]. 조직은 이러한 상호작용을 통해서, 세포의 생리 활동을 조절 통합하고 조직 특유의 고유한 기능을 수행하고 있다. 세포 상호간의 주요한 신

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: tjkim77@pusan.ac.kr, msuk@deu.ac.kr

^{*}Contributed equally to this work

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.

호전달 구조적 경로 가운데 위치하는 부착접합부(adherens junction, AJ)는 지속적으로 조립 및 분해되는 세포-세포 접착 복합체로써 조직 내의 세포가 미세환경의 힘(force), 생화학 신호 및 구조적 변화에 민감하게 반응할 수 있도록 관여하고 있다[3,4]. 접합 형성 과정의 상세한 기전은 아직 완전히 밝혀지지 않았지만 궁극적으로 부착접합부의 기본 건축물을 형성하는 캐드헤린(Cadherin), 카테닌(Catenin) (β -카테닌, α -카테닌)과 세포골격단백질(Cytoskeleton), 어댑터단백질(adaptor protein)의 충원을 통해 수행된다[5,6].

최근 연구에서 알파카테닌(α -Catenin)은 세포접착 접합부위에 존재하는 캐드헤린 복합체(Cadherin complex)에서 힘을 전달하는 매개자로 크게 주목받고 있다[7-9]. 이는 세포의 부착접합부에서 캐드헤린을 통해 힘의 이동이 이웃 세포로 전달되며, 전가된 힘의 신호는 캐드헤린의 세포내 영역 결합 단백질인 p120-카테닌, 베타카테닌, 알파카테닌 등으로 순차적으로 전달된다. 이러한 신호는 궁극적으로 알파카테닌과 결합하는 F-액틴(actin)을 통해 핵(nucleus)으로 전달되어 유전자의 발현과 조절에 영향을 끼치는 것으로 보고 되고 있다[10]. 아직 p120-카테닌과 베타카테닌은 메카노센서(mechanosensor)로써 기능을 수행하는지 보고 된 바가 없다. 이에 반해, 알파카테닌은 afadin, α -actinin, formin, ZO-1 등과 결합할 수 있어, 다양한 신호 경로의 매개자로 인식되어 왔고, 특히 vinculin, F-액틴과의 결합은 세포-세포간의 긴장력(tension)을 조절할 수 있을 뿐만 아니라 메카노센서로써의 가능성을 지속적으로 암시하여 왔다[11,12]. 최근 연구에서 본 연구자는 알파카테닌을 형광공명에너지전이(FRET, Fluorescence resonance energy transfer) 유형의 바이오센서로 제작하고 개발한 바가 있다[13].

이번 연구에서는 개발된 FRET 알파카테닌 센서를 활용하여, E-캐드헤린 엑토도메인(Ectodomain)을 코팅한 젤에서의 힘의 변화를 측정하였고, 견인력 현미경(traction force microscopy)을 통해서, 견인력의 변화와 알파카테닌 간의 FRET 신호 상관관계를 분석해 보았다. 아울러, 세포가 생리환경조건에서 겪을 수 있는 전단응력(shear stress) 실험을 통해 알파카테닌의 E-캐드헤린과의 결합력(binding force)을 검증하였다. 이러한 연구 결과들은, 세포 부착접합부에서의 알파카테닌 단백질이 메카노센서로써의 기능을 수행할 뿐만 아니라 기계적 힘의 조절 능력 여부를 검증하는 데 주요하게 활용될 수 있으며, 아울러 상피조직에서의 세포-세포간의 의사소통 및 기계적에너지변환(mechanotransduction)의 근원적 기작을 연구하는 데 유용한 정보를 제공할 수 있을 것이라 사료된다.

2. 실험

2-1. DNA 플라스미드

본 연구에서 사용된 DNA 플라스미드는 pcDNA3.1이며 인간-유래 알파카테닌 cDNA는 addgene으로부터 구입하였다. 형광공명에너지전이 쌍을 이루는 청색형광단백질(EYFP, enhanced cyanine fluorescent protein)과 황색형광단백질(YFPet, yellow fluorescent protein variant)은 각각 아미노산 잔기 265-324, 634-670 사이의 flexible linker 영역에 삽입되었으며 힘의 변화에 따라 알파카테닌 센서가 접힘/펼쳐짐(folding/unfolding) 구조로 설계되었다. 자세한 센서와 작동원리와 사용된 프라이머(primer)는 본 연구자의 선행연구에 잘 나타나 있다[13].

2-2. 폴리(아크릴아미드)(Polyacrylamide) 젤 제작

폴리아크릴아미드(Polyacrylamide, PA) 젤(gel)의 제작과정은 본 연구자의 이전 선행연구에서 자세하게 잘 설명되어 있다[14-17]. 간략히 설명하면, 40%(w/v) 아크릴아미드(acrylamide) 및 2%(w/v) 비스-아크릴아미드(bis-acrylamide) 용액(Bio-Rad, Hercules, CA)을 10 mM HEPES 버퍼와 혼합하였다. 상이한 탄성(elasticity)을 가진 PA 젤은 아크릴아미드(3~7.5%)와 비스 아크릴아미드 크로스 링커(0.03~0.6%) 용액의 최종 농도를 변화시킴으로써 얻어졌다. 용액을 중합하기 위해, 2.5 μ L의 10%(w/v) 암모늄 퍼셀레이트(ammonium persulfate) (Bio-Rad, Hercules, CA) 및 0.25 μ L의 N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (TEMED) (Bio-Rad, Hercules, CA)가 500 μ L의 최종 볼륨으로 용액에 첨가되었다. 중합 후, 광(light)에 의해 활성화되는 크로스 링커(cross-linker)인 N-Sulfosuccinimidyl-6-(4'-azido-2'-nitrophenylamino) hexanoate 이하 sulfo-SANPAH (Pierce Biotechnology, Rockford, IL)가 젤 표면에 세포 외 매트릭스 분자(extracellular matrix molecules)를 교차 연결하는 데 사용되었다. sulfo-SANPAH의 분말은 0.5% DMSO를 함유한 10 mM HEPES 완충제에 용해되었고, sulfo-SANPAH 용액(0.5 mg/ml)을 PA 젤 위에 첨가하였다. 젤 디쉬(dish)는 후드(hood)의 UV광선으로부터 ~15 cm의 거리에 6분 동안 배치하고 조사되었으며 10 mM HEPES 버퍼로 세 번 행구었다. 인테그린을 사용한 세포접착을 위해서, 소혈장 유래 피브로넥틴(fibronectin) 용액(0.1 mg/ml, Sigma) 200 μ L를 37 °C에서 sulfo-SANPAH가 코팅된 PA 젤 위에서 16시간 동안 배양되었다.

2-3. 세포배양 및 재료

본 연구에서는 MDCK WT(Madin-Darby Canine Kidney Wild-type)과 알파카테닌 MDCK KD(knockdown) 세포주를 사용하였다. Stable KD 세포주를 만들기 위해 Adam Kwiatkowski와 James Nelson (Stanford University, Palo Alto, CA)에 의해 공급된 하이브리드 벡터를 사용하였고, 벡터에는 알파카테닌, pEGFP-C1 및 G418(400 μ g/ml)에서 선별을 위한 neomycin 내성 유전자가 함유되어 있다. 또한 DLD1 세포와 DLD1 라인의 알파카테닌 null 서브클론(subclone)인 DLD1-R2/7 세포주도 사용하였다. 세포는 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)에서 배양되었고, 배지는 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 2 mM L-글루타민(glutamine), 1 unit/ml 페니실린(penicillin), 100 μ g/ml 스트렙토마이신(streptomycin) 및 1mM 나트륨 피루베이트(sodium pyruvate)가 함유되어 있다. 세포는 37 °C의 가습 환경에서 5% CO₂로 유지되었고, DNA 플라스미드 센서는 Lipofectamine 2000 또는 LTX 시약(Invitrogen, Carlsbad, CA)과 함께 제조업체의 지침에 따라 사용되었다. β 1 인테그린 차단 항체 AIIB2를 생산하는 hybridoma 계통(hybridoma 배양 배지의 1:25 희석) 및 인테그린 α 6 항체(GOH3, 20 μ g/ml)는 Santa Cruz Biotechnology에서 구입해 사용하였다.

2-4. 견인력 현미경(traction force microscopy) 측정

견인력 측정 실험에서 적색 형광 비드(red fluorescent bead, 0.2 μ m, Molecular Probes, Eugene, OR)가 내장되어 있는 E-캐드헤린으로 코팅된 PA 젤에 2000-3000 cell/cm²로 시딩(seeding)을 통해 수행되었다. 세포를 젤에 6 시간 동안 배양하고, 인테그린 매개 세포 부착을 차단하기 위해 인테그린 항체 GOH3 및 AIIB2를 포함하는 배지에서, 일리노이대학교(UIUC)의 Ning 왕 교수팀(Prof. Ning Wang)

에서 제공 한 fast fourier transform 소프트웨어를 사용하여 견인력을 측정하고 분석하였다[18,19]. 칼슘이온(Ca^{2+})이 제거된 배지(4.81 mM EDTA 포함 DMEM)에서 세포를 트립신(trypsin) 처리하기 전과 후에 젤에 있는 비드의 형광 이미지를 캡처하고, 비드 변위를 사용하여 맞춤형(custom) MatLab 프로그램으로 평균 견인력을 계산하였다.

2-5. 면역세포화학염색(Immunocytochemistry) 및 공초점 이미징(Confocal Imaging)

단층(monolayer)을 형성한 세포를 PBS(phosphate buffer saline)로 3 회 세척 한 후 PBS-4 v/v% 파라 포르말데히드(Sigma, St Louis, MO) 용액으로 실온에서 15 분 동안 고정시켰다. 뒤이어 PBS로 3 회 세척 한 후, 시료를 PBS-0.1% Triton X-100 용액으로 30 분 동안 투과를 목적으로 처리하였다. 투과 후 시료를 1% 소혈청알부민(bovine serum albumin, BSA)로 실온에서 30분 동안 블로킹(blocking) 처리하고, PBS로 세척 한 다음 알파카테닌 항체(polyclonal anti- α -Catenin antibody (1:1000) (Sigma, St Louis, MO)와 함께 실온에서 2 시간 동안 배양하였다. 2 차 항체로는 anti-rabbit IgG FITC (1:200) (Sigma, St Louis, MO)를 실온에서 1 시간 동안 처리 한 후 세포를 PBS로 3 회 세척 한 후, ProLong Gold Anti-Fade (Invitrogen, Carlsbad, CA)로 셀을 장착하였다. 공초점 이미지는 x63 / 1.4 NA 오일 대물 렌즈가 있는 Leica SP2 공초점 레이저 스캐닝 현미경에서 수집되었으며 Leica Software로 처리되었다. 아르곤 이온 레이저와 헬륨 네온 레이저의 458 및 543 nm 스펙트럼 라인이 각각 사용되었다.

2-6. 형광공명에너지전이 이미징(FRET imaging)

실시간 세포 이미징 실험 전에 세포를 36~48 시간 동안 0.5% FBS로 처리하고, 이미징 과정 동안에는, 세포를 37 °C에서 CO_2 -독립 배지 (CO_2 -independent medium, Invitrogen, CA)에서 유지시켰다. 이미지는 냉각된 전하결합소자(CCD) 카메라(Cascade 512B, Photometrics)가 장착된 Zeiss Axiovert 200M 현미경(Carl Zeiss)에 의해서 촬영되었으며, 현미경의 본체에는 440DF20 여기필터, 455DRLP Dichroic mirror, 필터교환기에 의해 통제되는 두 종류의 방출필터로 구성되어 있다(CFP의 경우 480DF30, YFP의 경우 535DF25). 형광공명에너지전이(FRET)는 두 개의 감광성 분자 사이의 비복사 에너지전이를 설명하는 메커니즘으로 분자간의 상호 작용을 측정하는 방법이다. YPet/ECFP의 픽셀-대비-픽셀(pixel-by-pixel) 비율 이미지는 YPet 및 ECFP의 배경(background) 신호를 차감하고, MetaFluor 6.2 소프트웨어(Universal Imaging, West Chester, PA)에서 계산하고 분석하였다. 이러한 FRET 비율 이미지는 IMD(intensity modified display)모드로 표시되어 이미지로 산출되었다.

2-7. 유동시스템(flow system)과 전단응력(shear stress) 실험

세포에 층류(laminar flow)를 적용하기 위해 평행판 유동챔버(parallel-plate flow chamber)를 사용하였다[20-22]. 세포가 배양된 유리슬라이드는 실리콘 개스킷(silicone gasket)을 끼우고 커버 유리슬라이드와 아크릴 판을 끼워서 유동채널의 바닥에 놓이도록 형성한다. 세포는 서로 다른 높이에 위치한 두 저장소 사이의 정수압(hydrostatic pressure) 차이에서 발생하는 흐름에 의해 생성된 전단 응력에 노출되도록 챔버는 설계되어 있다. 채널 너비는 10 mm, 높이는 0.5 mm, 총 길이와 입구의 길이는 각각 45 mm와 15 mm이다.

이러한 유량 챔버 시스템은 정밀하게 전단 응력을 제어하도록 잘 확립되어 있으며, 아래와 공식과 같이 계산할 수 있다:

$$Tw = 6\mu Q/h^2w$$

여기서 μ 는 용액의 유체점도(fluid viscosity), Q 는 유속(flow rate), h 는 채널높이(channel height), w 는 채널너비(channel width)이다. 유동시스템은 층류 패턴을 확인하기 위해 폴리스티렌 입자를 포함하는 매체로 관류되어 있으며, 전단응력(Shear stress, SS)은 12와 15 dyn/cm^2 으로 설정되었다. pH는 7.4로 유지되었으며 37 °C에서 5% CO_2 -독립 배지에서 수행되었다.

2-8. 데이터 통계분석

모든 통계학적 데이터는 평균 \pm 표준편차(SD) 또는 표준 오차(SEM)로 표현되었다. 엑셀(Excel) 소프트웨어를 사용하여 통계 평가가 실시되었고, Student's *t*-test를 수행하여 실험군 간의 통계적 차이를 확인하였다. 유의한 차이는 P값(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$)에 의해 결정되었다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 알파카테닌 센서를 통한 E-캐드헤린 매개 긴장력(tension) 신호 시각화

본 연구에서는 알파카테닌 센서를 통해 세포 부착접합부에 발현되는 E-캐드헤린을 통해 전달되는 긴장력의 변화를 형광공명에너지전이(FRET) 신호로 변환해 시각화 할 수 있음을 보이고 있다. 이를 위해 사용된 세포는 알파카테닌이 높게 발현되는 MDCK WT 세포와 발현이 현저히 감소하는 MDCK KD(knockdown) 세포주를 사용하였다. 추가 실험에서는 DLD1 세포가 사용되었고 대장암 세포주에 속하며, 알파카테닌이 높게 발현되고 있다. DLD1 R2/7 세포는 DLD1의 이형(variant)으로써 E-캐드헤린은 정상적으로 발현되지만 α E-카테닌 내지 α N-카테닌은 발현하지 않는 세포이다[23,24].

Fig. 1A에 보여진 바와 같이 이번 연구에서 사용된 세포를 α E-카테닌 항체로 면역세포화학적 방법으로 염색을 시켰을 때, MDCK WT과 DLD1 세포에서는 α E-카테닌이 세포 부착접합부에서 매우 높게 발현됨을 확인하였다. 이에 반해, MDCK KD와 DLD1 R2/7 세포에서는 세포 부착접합부에서의 발현이 거의 없거나 현저히 감소함을 알 수 있었다(Fig. 1A). Fig. 1B에서는 본 연구에서 사용된 α -카테닌 FRET 센서와 작동원리를 소개하고 있으며, D(domain)1과 D2 사이에 ECFP가 링커로 연결되어 있고, YPet 단백질은 D2와 D3사이에 삽입되어 있다. 기본적으로 ECFP는 여기파장(excitation wavelength)과 방출파장(emission wavelength)의 정점(peak)이 각각 435 nm와 475 nm이다. E-캐드헤린/ α E-카테닌 복합체에서 긴장력이 높아지면 D3의 액틴결합부위에서 F-액틴이 충전 결합되어 센서 자체의 긴장력이 높아져 ECFP와 YPet의 거리는 증가해 FRET 신호는 감소하게 된다. 이와는 대조적으로, 긴장력이 감소하는 경우는 ECFP와 YPet의 거리도 감소해 ECFP의 방출파장이 YPet의 여기파장으로 작동해 FRET 신호가 증가하도록 센서가 설계되어 있다(Fig. 1B). 실제로 알파카테닌 센서의 FRET 신호가 E-캐드헤린을 매개로 하는 긴장력의 변화에 정상적으로 작동하는 지 알아보기 위해, 내재성 알파카테닌이 결핍된 MDCK KD 세포에 알파카테닌 센서를 주입하고, E-캐드헤린이 코팅된 PA 젤에서 배양하여

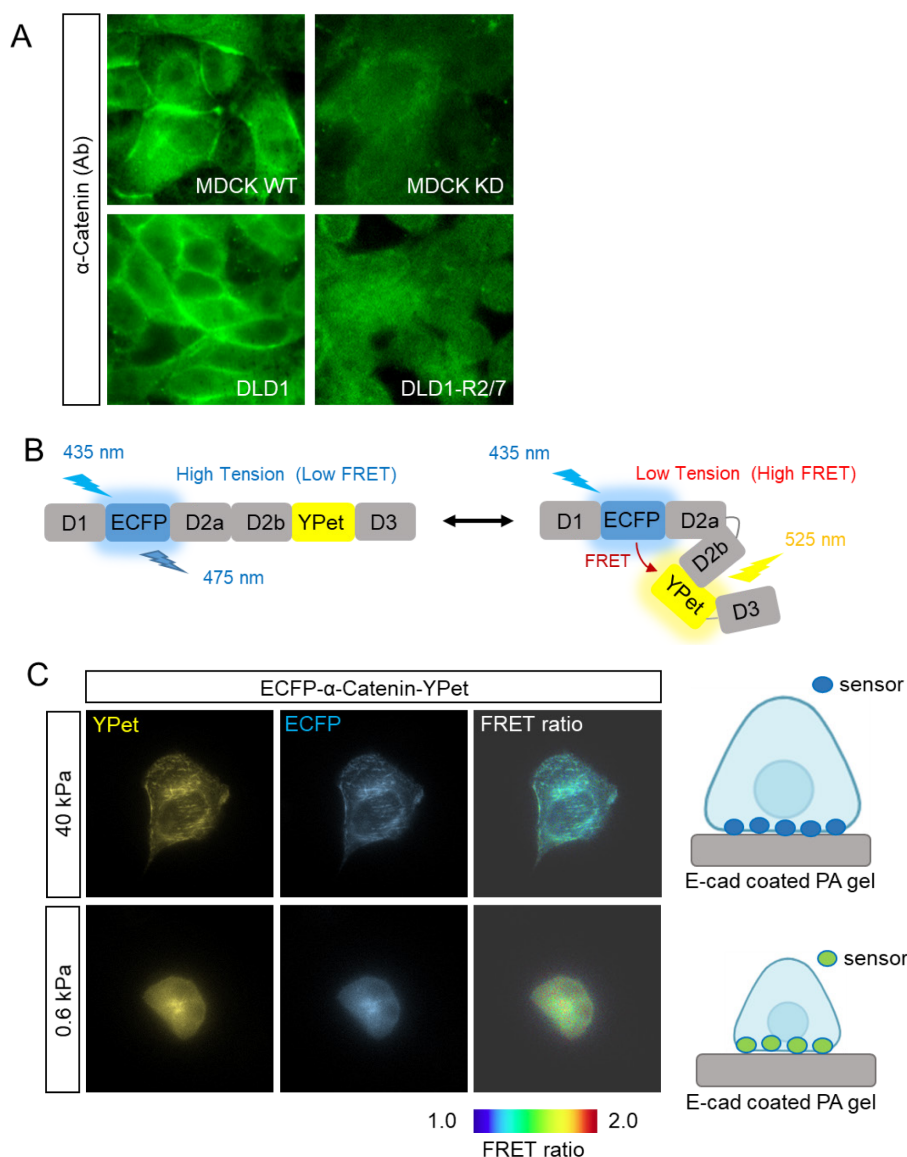


Fig. 1. The principle of fluorescence resonance energy transfer (FRET) α -catenin sensor and its FRET-based visualization of E-cadherin mediated force transmission by the sensor (A) Cell lines (MDCK WT, MDCK KD, DLD1, DLD1 R2/7) used in this study. Expression of endogenous α -catenin by immunocytochemical staining with antibodies (B) Schematic diagram of the principle of conformational switching of the α -catenin sensor. When the tension of α -catenin increases, the FRET signal is suppressed due to the unfolded structure of the sensor. However, when the tension is reduced, the ECFP and YPet are exposed in proximity and form a strong FRET signal due to the sensors' "folding" structure. (C) Culture of MDCK KD cells transfected with α -catenin sensor and measurement of FRET signals in PA gel coated with E-cadherin.

FRET 신호를 측정, 시각화 하였다. 알파카테닌 센서가 발현되는 MDCK KD세포는 40 kPa와 0.6 kPa의 매트릭스 강도(matrix rigidity) 조건 하에서 배양함으로써, E-캐드헤린에 의해 매개되는 매트릭스 긴장력의 변화를 측정하였다. 본 연구에서 매트릭스 강도를 40 kPa와 0.6 kPa로 차이를 두고 설정한 이유는 실제 생리 조건하의 인체조직에서, stiff와 soft 한 조직의 경우 각각 34~40kPa, 0.1~1kPa의 매트릭스 강도를 나타내고 있다[18]. 따라서 매트릭스 강도가 상이한 두 조건을 각각 40 kPa와 0.6 kPa로 설정하였고, 그 결과, 40 kPa에서 배양된 세포에서는 높은 긴장력을 반영하듯이 낮은 FRET 비율 값이 관측되었고, 색지표(color index)는 파란색 계열로 표시되었다. 반면에, 낮은 긴장력을 반영하는 0.6 kPa 조건하에서는 높은 FRET 비율 값에 따른 녹색색(green-red) 이 검출되었다(Fig. 1C). 이러한

결과는 개발된 알파카테닌 센서가 FRET 신호를 통해 E-캐드헤린을 매개로 하는 세포 부착접합부에서의 긴장력의 변화를 효과적으로 탐지할 수 있음을 가리킨다.

3-2. 견인력(traction force) 측정과 알파카테닌 센서의 FRET 신호

세포의 주변환경으로부터 발생하는 기계적 힘은 세포의 생리학 또는 병리학적 현상과 서로 밀접하게 관련되어 있다. 특히 세포-세포의 매트릭스(Cell-ECM) 접착에서 형성되는 견인력 측정은 현미경 기반 기술로 힘을 정량화하여 측정이 가능하다[18,25]. 본 연구에서는 견인력 현미경(traction force microscopy)을 이용하여 견인력을 정량적으로 측정하여 알파카테닌 센서가 주입된 세포에서의 FRET 신호변화와의 상관관계를 측정하였다. Fig. 2에서는 MDCK

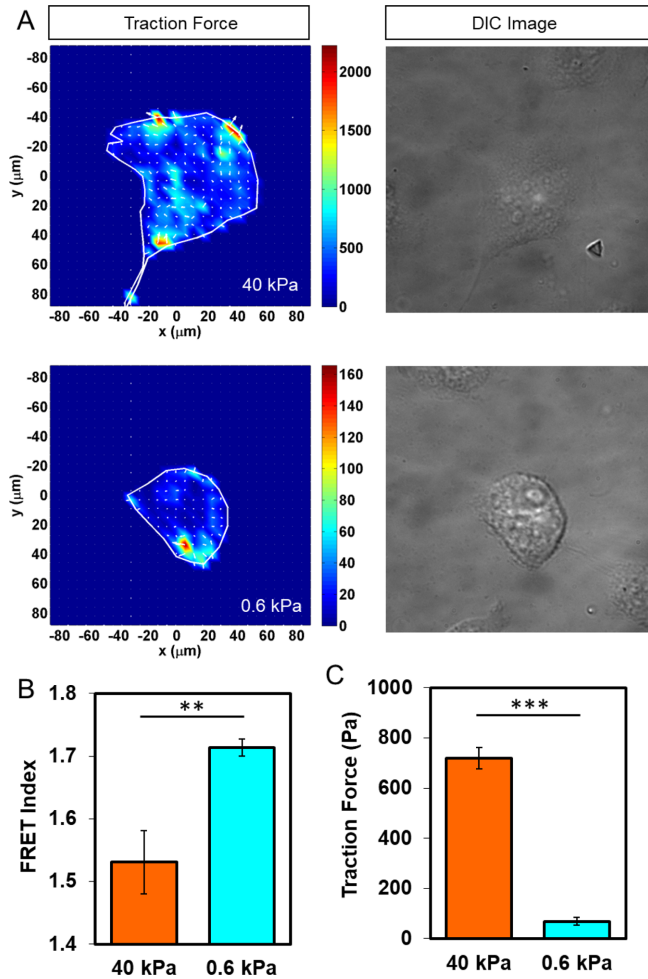


Fig. 2. Measurement of traction force and FRET signal in MDCK KD cells transfected with α -Catenin sensor. (A) Map of traction force distribution visualized by traction force microscopy and the corresponding DIC image. (B-C) Measurement of FRET signals and traction force in MDCK KD w/ α -Catenin cells cultured on PA gels with different matrix rigidity (40 kPa and 0.6 kPa). The lower the FRET index value, the stronger the tension (mean±s.e.m., n=5, **p<0.01, ***p<0.001).

KD세포를 활용하여 알파카테닌 센서를 주입시키고 인테그린 항체와 E-카드헤린 이 코팅된 40 kPa와 0.6 kPa PA 젤에서 견인력과 FRET을 측정하였다. 단일세포에서 견인력이 높게 측정된 지역은 붉은 색으로 표시되었고, 낮을수록 파란색으로 표시되어 세포 내에서 형성되는 견인력의 분포도를 자세히 살펴 볼 수 있다(Fig. 2A). Fig. 2B-C는 각각의 주어진 조건하에서 측정된 FRET 비율 값과 견인력 값을 나타내고 있다. 40 kPa에서의 FRET 비율 평균값은 1.531 ± 0.05 (n=5)으로 0.6 kPa에서 측정된 1.713 ± 0.01 (n=5, **P<0.01)에 비해 유의적으로 낮게 형성되었다. 견인력 값의 경우, 40 kPa에서는 719.11 ± 43.25 (n=5), 0.6 kPa 조건에서는 68.40 ± 14.87 (n=5, ***P<0.001)로 측정되었다. 이러한 결과는 E-카드헤린에 의해 매개된 견인력으로 발생하는 기계적 힘을 알파카테닌 센서가 FRET 신호를 통해 시각화 하고 정량적으로 탐지할 수 있음을 나타낸다.

3.3. 세포-세포 연결(cell-cell junction)에서의 알파카테닌 센서의 기계적 힘의 FRET 시각화

세포-세포 연결은 세포와 세포 간극에 존재하는 인터페이스로써

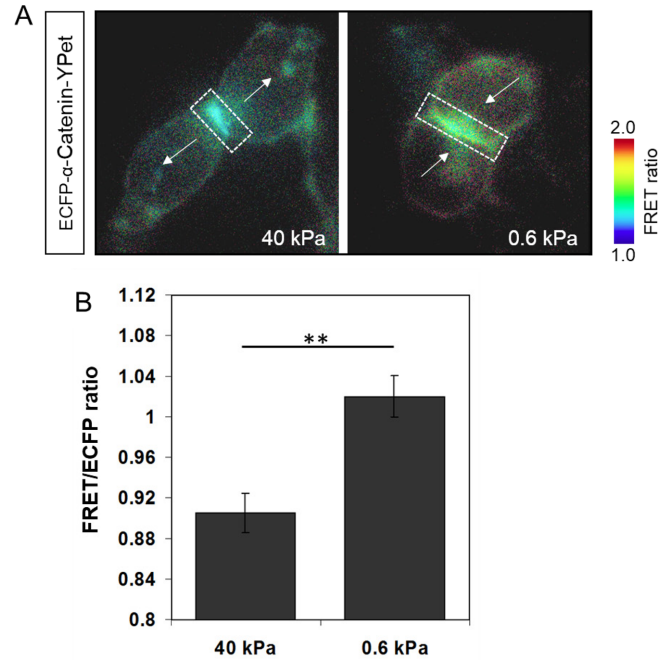


Fig. 3. FRET visualization of force transmission by α -Catenin sensor at cell-cell junction. (A) α -Catenin sensor-transfected DLD1 R2/7 cells were cultured on 40 kPa and 0.6 kPa gels and imaged to monitor FRET signals at cell-cell junction. The area marked with a square indicates the cell-cell junction, and the arrow indicates the tension of the cell in stiff and soft gel. (B) The bar graph indicates the measured FRET values (mean±s.e.m., n=15-16, **p<0.01).

세포간의 화학적 신호뿐 만 아니라 기계적 신호의 전달 통로로 중요한 역할을 한다. 이번 연구에서는 실제로 세포 부착접합부에서 긴장력의 차이에 따른 알파카테닌 센서의 FRET 신호 시각화를 검증해 보았다. Fig. 3에서 보여진 바와 같이, 알파카테닌이 발현되지 않는 DLD1 2/7 세포를 이용하여, 알파카테닌 센서를 주입하고, 각각 40 kPa와 0.6 kPa PA 젤에서 배양한 뒤, 세포 부착접합부에서의 FRET 신호를 측정하였다. 그 결과, 40 kPa 젤에서 배양한 세포의 부착접합부에서의 FRET 신호는 0.6 kPa 젤에서 배양한 세포에 비해 현저히 낮았으며, 이미징에서의 색상 또한 파란색 계열에 가까웠다(0.904 ± 0.02 in 40 kPa, n=15 vs. 1.02 ± 0.02 in 0.6 kPa, n=16, **P<0.01). 이러한 실험 결과는, 알파카테닌 센서가 세포-세포 사이의 기계적 힘 신호의 중요한 표지자로써 사용될 수 있으며, 색상 표시 및 FRET 신호로 시각화가 가능함을 나타낸다.

3-4. 알파카테닌 센서의 전단응력(shear stress)에 대한 세포 부착 평가

전단응력은 주로 접하는 힘이 표면에 작용할 때 생성되는 단위 면적당 힘으로, 심혈관계(cardiovascular system)를 포함한 다양한 세포에서 일상적으로 발생한다. 심혈관계를 감싸는 내피(endothelium)는 혈류 방향으로 혈관 내강 표면에 작용하는 혈역학적(hemodynamic) 전단응력에 매우 민감하다. 그러므로 생리적 전단응력은 내피의 기능 통합을 유지하는 데 중요한 요소로 평가된다. 따라서, 본 연구진은 알파카테닌 센서가 알파카테닌의 주요 기능으로 예상되는 전단응력에 대항하여 힘을 지탱하고 유지할 수 있는지를 평가하였다.

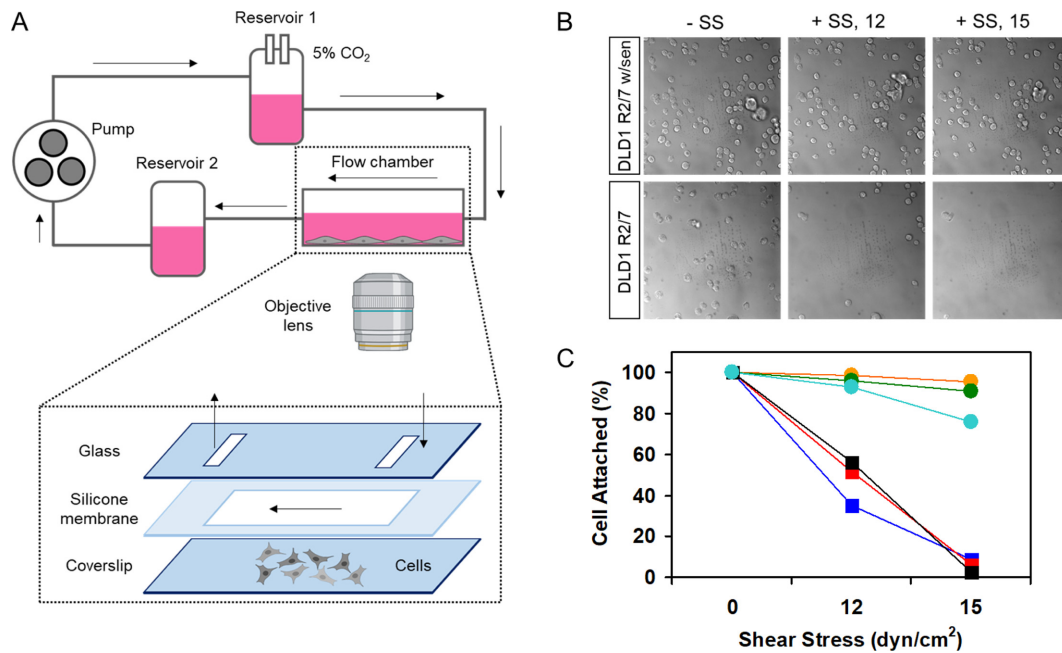


Fig. 4. The effect of α -catenin sensor on cell adhesion in response to shear stress. (A) The flow system comprises a flow chamber for seeded cells, two reservoirs forming hydrostatic pressure, a pump to circulate the cell medium and the tube system that connects each composition. (B-C) DIC images and data showing the appearance of attached cells as various magnitudes of shear stress were applied (-SS, +SS 12 dyn/cm², +SS 15 dyn/cm²).

본 실험에서는 DLD1 2/7 세포와 알파카테닌 센서가 주입된 DLD1 R2/7 세포를 활용하여, 전단응력 정도를 달리하여 세포의 부착력을 검증해보았다. 그 결과, Fig. 4에서 보여진 바와 같이, 알파카테닌 센서가 주입된 세포에서는 강한 세포 부착능을 나타내었다. 전단응력이 주어지지 않은 조건(-SS)과 비교하여, 전단응력 이 12 dyn/cm² (+SS, 12)이 주어졌을 때는 알파카테닌 센서가 주입된 세포에서는 평균 95.84%(±2.62%, n=3)의 부착율을 보인데 반해, 내재성 알파카테닌이 결핍된 DLD1 R2/7 세포에서는 47.67%(±11.15%, n=3, **p<0.01)을 보였다. 전단응력을 15 dyn/cm² (+SS, 15)로 증가시켰을 경우, 알파카테닌 센서가 주입된 세포에서는 평균 87.42%(±10.02%, n=3)의 부착율을 보인데 반해, 결핍된 세포에서는 6.01%(±3.00%, n=3, ***p<0.001)를 보였다. 이러한 결과는, 알파카테닌 센서가 전단응력에 대해 세포접착을 유지하고 지탱할 수 있는 상대적 힘을 보유할 수 있음을 의미한다.

4. 결 론

본 연구에서는 형광공명에너지전이(FRET) 기반의 알파카테닌 센서를 통해 세포 부착접합부에서의 힘 전달을 시각화 할 수 있음을 보였다. 특히, 알파카테닌 센서를 통해 세포에서 발현되는 알파카테닌 단백질이 세포-세포간의 힘 신호 전달을 매개하는 주요 기능을 수행하고 있음을 확인할 수 있었다. 아울러, E-캐드헤린 매개성 긴장력과 견인력 형성에도 중요하게 관여할 수 있음을 발견하였다. E-캐드헤린과 알파카테닌 복합체에서의 기계적/물리적 힘 신호의 전달은 세포-세포의 의사소통 및 상호작용에 필수적인 요소이므로 향후 이들 단백질 복합체에 의해 조절되는 기계적에너지변환(mechanotransduction)의 역할 규명은 세포와 조직의 다양한 생리학적/병리학적 연구에 유용하게 활용될 수 있을 것이라고 사료된다.

감 사

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

References

1. Armingol, E., Officer, A., Harismendy, O. and Lewis, N. E., "Deciphering Cell-cell Interactions and Communication From Gene Expression," *Nat. Rev. Genet.*, 1-18(2020).
2. Mittelbrunn, M. and Sánchez-Madrid, F., "Intercellular Communication: Diverse Structures for Exchange of Genetic Information," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **13**(5), 328-335(2012).
3. Meng, W. and Takeichi, M., "Adherens Junction: Molecular Architecture and Regulation," *Cold Spring Harbor Perspect. Biol.*, **1**(6), a002899(2009).
4. Vining, K. H. and Mooney, D. J., "Mechanical Forces Direct Stem Cell Behaviour in Development and Regeneration," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **18**(12), 728-742(2017).
5. Leckband, D. E. and De Rooij, J., "Cadherin Adhesion and Mechanotransduction," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **30**, 291-315(2014).
6. Ladoux, B., Nelson, W. J., Yan, J., and Mege, R. M., "The Mechanotransduction Machinery at Work at Adherens Junctions," *Integr. Biol.*, **7**(10), 1109-1119(2015).
7. Yonemura, S., Wada, Y., Watanabe, T., Nagafuchi, A. and Shibata, M., "α-Catenin as a Tension Transducer That Induces Adherens Junction Development," *Nat. Cell Biol.*, **12**(6), 533-542(2010).
8. Mei, L., de Los Reyes, S. E., Reynolds, M. J., Leicher, R., Liu, S. and Alushin, G. M., "Molecular Mechanism for Direct Actin Force-sensing by α-catenin," *Elife*, **9**, e62514(2020).

9. Leckband, D. E., in Chien S., Engler A., Wang P. (Ed.), *Cadherins in Mechanotransduction*. In *Molecular and Cellular Mechanobiology*, New York, 57-80(2016).
10. McCrea, P. D., Maher, M. T. and Gottardi, C. J., "Nuclear Signaling From Cadherin Adhesion Complexes," *Curr. Top. Dev. Biol.*, **112**, 129-196(2015).
11. Ishiyama, N., Sarpal, R., Wood, M. N., Barrick, S. K., Nishikawa, T., Hayashi, H., Kobb, A. B., Flozak, A. S., Yemelyanov, A., Fernandez-Gonzalez, R., Yonemura, S., Leckband, D. E., Gottardi, C. J., Tepass, U. and Ikura, M., "Force-dependent Allostery of the α -catenin Actin-binding Domain Controls Adherens Junction Dynamics and Functions," *Nat. Commun.*, **9**(1), 1-17(2018).
12. Kobiela, A. and Fuchs, E., " α -catenin: at the Junction of Intercellular Adhesion and Actin Dynamics," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**(8), 614-625(2004).
13. Kim, T. J., Zheng, S., Sun, J., Muhamed, I., Wu, J., Lei, L., Kong, X., Leckband, D. E. and Wang, Y., "Dynamic Visualization of α -catenin Reveals Rapid, Reversible Conformation Switching Between Tension States," *Curr. Biol.*, **25**(2), 218-224(2015).
14. Kim, T. J., Seong, J., Ouyang, M., Sun, J., Lu, S., Hong, J. P., Wang, N. and Wang, Y., "Substrate Rigidity Regulates Ca^{2+} Oscillation via RhoA Pathway in Stem Cells," *J. Cell Physiol.*, **218**(2), 285-293(2009).
15. Kim, T. J., Sun, J., Lu, S., Qi, Y. X. and Wang, Y., "Prolonged Mechanical Stretch Initiates Intracellular Calcium Oscillations in Human Mesenchymal Stem Cells," *PLoS One*, **9**(10), e109378(2014).
16. Kim, T. J., Sun, J., Lu, S., Zhang, J. and Wang, Y., "The Regulation of β -adrenergic Receptor-mediated PKA Activation by Substrate Stiffness via Microtubule Dynamics in Human MSCs," *Biomaterials*, **35**(29), 8348-8356(2014).
17. Kim, T. J., Lei, L., Seong, J., Suh, J. S., Jang, Y. K., Jung, S. H., Sun, J., Kim, D. H. and Wang, Y., "Matrix Rigidity-Dependent Regulation of Ca^{2+} at Plasma Membrane Microdomains by FAK Visualized by Fluorescence Resonance Energy Transfer," *Adv. Sci.*, **6**(4), 1801290(2019).
18. Schwarz, U. S. and Soiné, J. R., "Traction Force Microscopy on Soft Elastic Substrates: A Guide to Recent Computational Advances," *Bioch. Biophys. Acta.*, **1853**(11), 3095-3104(2015).
19. Poh, Y. C., Shevtsov, S. P., Chowdhury, F., Wu, D. C., Na, S., Dundr, M. and Wang, N., "Dynamic Force-induced Direct Dissociation of Protein Complexes in a Nuclear Body in Living Cells," *Nat. Commun.*, **3**(1), 1-10(2012).
20. Liu, B., Lu, S., Hu, Y. L., Liao, X., Ouyang, M. and Wang, Y., "RhoA and Membrane Fluidity Mediates the Spatially Polarized Src/FAK Activation in Response to Shear Stress," *Sci. Rep.*, **4**(1), 1-8(2014).
21. Wang, Y., Chang, J., Li, Y. C., Li, Y. S., Shyy, J. Y. J. and Chien, S., "Shear Stress and VEGF Activate IKK via the Flk-1/Cbl/Akt Signaling Pathway," *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **286**(2), H685-H692(2004).
22. Liu, B., Kim, T. J. and Wang, Y., "Live Cell Imaging of Mechanotransduction," *J. R. Soc. Interface.*, **7**(suppl_3), S365-S375(2010).
23. Thomas, W. A., Boscher, C., Chu, Y. S., Cuvelier, D., Martinez-Rico, C., Seddiki, R., Heysch, J., Ladoux, B., Thiery, J. P., Mege, R. M. and Dufour, S., " α -Catenin and Vinculin Cooperate to Promote High E-cadherin-based Adhesion Strength," *J. Biol. Chem.*, **288**(7), 4957-4969(2013).
24. Vermeulen, S. J., Bruyneel, E. A., Bracke, M. E., De Bruyne, G. K., Krist'l, M. V., Vleminckx, K. L., Berx, G. J., van Roy, F. M., and Mareel, M. M., "Transition from the Noninvasive to the Invasive Phenotype and Loss of α -catenin in Human Colon Cancer Cells," *Cancer Res.*, **55**(20), 4722-4728(1995).
25. Style, R. W., Boltyanskiy, R., German, G. K., Hyland, C., MacMinn, C. W., Mertz, A. F., Wilen, L. A., Xu, Y. and Dufresne, E. R., "Traction Force Microscopy in Physics and Biology," *Soft Matter*, **10**(23), 4047-4055(2014).