

# 미세파상 패턴 ECM 에서 세포질 FAK 신호의 실시간 FRET 이미징

서정수<sup>1</sup> · 장윤관<sup>1</sup> · 김태진<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>부산대학교 자연과학대학 생명시스템학과, <sup>2</sup>부산대학교 자연과학대학 생명과학과

## Real-time FRET imaging of cytosolic FAK signal on microwavy patterned-extracellular matrix (ECM)

Jung-Soo Suh<sup>1</sup>, Yoon-Kwan Jang<sup>1</sup> and Tae-Jin Kim<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Department of Integrated Biological Science

<sup>2</sup>Department of Biological Sciences, Pusan National University

(Manuscript received 5 November 2018 ; revised 2 January 2019 ; accepted 2 January 2019)

**Abstract:** Human mesenchymal stem cells (hMSC) are multipotent stromal cells that have great potential to differentiate into a variety of cell types such as osteocytes, chondrocytes, and myocytes. Although there have been many studies on their clinical availability, little is known about how intracellular signals can be modulated by topographic features of the extracellular matrix (ECM). In this study, we investigated whether and how microwavy-patterned extracellular matrix (ECM) could affect the signaling activity of focal adhesion kinase (FAK), a key cellular adhesion protein. The fluorescence resonance energy transfer (FRET)-based FAK biosensor-transfected cells are incubated on microwavy-patterned surfaces and then platelet derived growth factor (PDGF) are treated to trigger FAK signals, followed by monitoring through live-cell FRET imaging in real time. As a result, we report that PDGF-induced FAK was highly activated in cells cultured on microwavy-patterned surface with L or M type, while inhibited by H type-patterned surface. In further studies, PDGF-induced FAK signals are regulated by functional support of actin filaments, microtubules, myosin-related proteins, suggesting that PDGF-induced FAK signals in hMSC upon microwavy surfaces are dependent on cytoskeleton (CSK)-actomyosin networks. Thus, our findings not only provide new insight on molecular mechanisms on how FAK signals can be regulated by distinct topographical cues of the ECM, but also may offer advantages in potential applications for regenerative medicine and tissue engineering.

**Key words:** Focal adhesion kinase (FAK), Fluorescence resonance energy transfer (FRET), Live cell imaging, Microwavy-extracellular matrix

### 1. 서 론

세포접착(cell adhesion)은 대부분의 세포에서 나타나는 가장 기본적인 행위로서 세포가 조직을 형성할 때 반드시 필요하다. 세포접착은 세포-세포 사이에 발생하거나 세포-세포외기질(extracellular matrix, ECM) 사이

에 형성되며, 이들간의 상호작용을 통해 조직은 기능적 통합을 일으킨다[1]. 특히 재생의학 분야에서 지속적인 연구의 대상인 줄기세포는 세포외기질 환경과 긴밀하게 상호작용을 하여 분화 등의 세포생리 과정을 적절하게 수행하고 있는 것으로 잘 알려져 있다[2]. 그러나 줄기세포이식 및 세포치료법에서 여전히 수반되는 어려움은 숙주세포에 이식된 세포가 효율적으로 통합되지 못하고, 세포사멸 혹은 비정상적인 세포로 돌변하는 위험성을 내재하고 있다는 점이다[3]. 따라서 세포접착과정에서 동반되는 신호전달 및 총체적인 신호네트워크에 대한 체계적이고 과학적인 이해가 필요할 것으로 사료된다.

세포외기질로부터 전해지는 생물물리학적(biophysical)

Corresponding Author: Tae-Jin Kim  
Department of Biological Sciences Department of Integrated Biological Science Pusan National University, Pusan 46241, Republic of Korea  
Tel: +82-051-510-2261  
E-mail: tjkim77@pusan.ac.kr

이 논문은 부산대학교 기본연구지원사업(2년)에 의하여 연구되었음.

혹은 기계적 신호(mechanical signal)들은 줄기세포의 기능과 행동 조절에 필수적으로 작동하고 있으며, 이들이 세포에서 어떠한 기전을 통해 신호전달과정에 영향을 미치는지는 아직 충분한 연구가 수행되어 있지 못하다. 더욱이 최근 연구에서는 세포외기질의 지형적인(topographical) 특징이 세포의 이동(migration), 증식(proliferation), 분화(differentiation), 성장(growth) 등에 큰 영향을 끼치고 있는 것으로 보고됨에 따라[4-6], 세포가 어떻게 지형적인 특징들을 감지하고 세포신호전달 과정으로 반영하는지에 대한 깊은 이해와 연구가 필요하다. 본 연구에서 사용된 사람중간엽줄기세포(human mesenchymal stem cell, hMSC)는 세포외기질의 물리적, 지형적 특성을 반영한 분자적/생화학적 신호가 다양한 세포계통으로의 분화를 촉진하는 것으로 보고되고 있다[7]. 예를 들어, 세포외기질의 탄성(elasticity) 정도에 따라 이 줄기세포는 각기 뼈를 구성하는 골세포 및 연골세포나 근육조직을 형성하는 근육세포 계통으로 분화가 가능하다[8]. 세포외기질의 탄성을 더 연성화시켰을 경우에는 심지어 신경세포로까지 분화가 가능한 것은 매우 흥미로운 발견이다[8-10]. 또 다른 선행 연구에 의하면, 세포외기질 표면의 지형적인 특징이 hMSC를 각기 뼈형성조직 계통으로 분화시키거나, 지방세포계통으로의 분화 및 성장 촉진에 기여하는 것으로 보고되고 있다[11].

따라서, 본 연구에서는 세포외기질의 지형적인 특징 중에 근육세포 및 조직에서 흔히 나타나는 미세파상(microwavy) 패턴형태를 실험적으로 모사하여, hMSC를 배양한 후, 세포외기질과의 세포접착에 중요한 역할을 하는 신호 단백질인 국소접착키나아제(focal adhesion kinase, FAK)의 실시간 활성도를 측정 분석하였다. 세포접착과정의 최전선에서는 세포외기질과 인테그린(integrin)-국소접착단백질 복합체(focal adhesion protein complex)가 긴밀하게 형성되고, FAK은 이들 복합체의 기능과 역할을 조절해주는 필수적인 구성원이다[12-13]. 특히, 이전의 연구에서 주로 수행되었던 생화학적 연구방법과는 조금 차별화하여, 본 연구에서는 주로 형광공명에너지전이(fluorescence resonance energy transfer, FRET) 기반의 FAK 바이오센서를 활용해 세포질에서 일어나는 FAK의 역동적인(dynamic) 현상을 살아 있는 세포 수준에서 실시간 고해상도 이미지를 통해 분석하였다.

## II. 연구방법

### 1. 미세파상 패턴 제작(Fabrication of microwavy-pattern)

본 연구에서 사용된 시료는 에드먼드 옵틱스(Edmund Optics)에서 시판중인 홀로그래픽 회절격자(Holographic diffraction grating)를 생체에 적합한 polydimethylsil

oxane(PDMS)으로 복제하여 제조하였다. 홀로그래픽 회절격자는 일반적으로 광학에 널리 사용되고 있고, 서로 다른 파장의 광을 방출하여, 표면이 대략 정현파(sinusoidal) 형태로 나타나며 넓은 영역에 걸쳐 매우 균일하게 만들 수 있다. 표준화된 격자는 200 nm 에서 2 mm pitch의 범위에서 생산되었고, 패턴은 홈(groove)을 가지고 있으며, 표면은 약해지고 시간이 지남에 따라 마모된다. 마모는 진폭(amplitude)을 줄이지만 파장(wavelength)은 변하지 않으므로, 몇 가지 주형을 사용하여 여러 종횡비를 생성할 수 있었다. Sylgard 184 polydimethylsilox(Dow Corning)을 표준염기 대 가교제(crosslinker) 비율이 10:1이 되도록 혼합하고 일반적인 복제성형 기술을 사용하여 생체적합성 회절격자 제품을 생산하였다.

### 2. 원자력 현미경(Atomic force microscopy)

미세파상모양의 표면형태는 Asylum MFP-3D 원자력현미경(AFM)을 사용하여 특성화되었다. AFM 팁은 단일빔, 실리콘 캔틸레버(silicon cantilever)로 사용하였고 325 kHz의 공진주파수와 40 N/m의 힘을 가하였다. 시료는 100  $\mu\text{m}^2$  으로 256x256 지점으로 스캔화 되었으며, 각 표본 표면에서 두 개의 무작위로 선택된 영역이 스캔화 되었다. 각 패턴으로 여러 시료가 제작되었으며 치수는 동일한 마스터 패턴으로 평균화 되었다. 정량적으로 표면의 형태를 특성화 하기 위해, 표면 높이 Z 는 2차원 Matlab을 사용한 정현 함수에 의해 피팅되었다.

### 3. DNA 플라스미드 및 재료

본 연구에서 사용된 DNA 플라스미드는 세포질 FAK 바이오센서로 c-Src으로부터 SH2 도메인과 연결 아미노산 잔기(GSTSGSGKPGSGEGS) 및 FAK의 기질 펩타이드(ETDDYAEIIDE)를 N-말단의 청색형광단백질(EYFP, enhanced cyanine fluorescent protein) 와 C-말단의 황색형광단백질(YPet, yellow fluorescent protein variant) 사이로 삽입하였다. 세포질 FAK 바이오센서는 한국과학기술연구원 성지혜 박사 연구팀으로부터 제공되었으며, mCherry-Paxillin을 발현하는 DNA vector는 University of California at San Diego(UCSD)의 Yingxiao Wang 교수팀으로부터 제공받았다[14]. 본 연구에서 사용된 약물인 PDGF, Cytochalasin D, Nocodazole, Blebbistatin, ML-7은 시그마(Sigma -Aldrich, St. Louis, MO)사로부터 구입하였다.

### 4. 세포배양

패턴화된 세포배양용 PDMS를 준비하기 위해 시료 표면을 산소 플라즈마로 100W에서 30초로 처리한 후 사람피브

로넥틴(human fibronectin, BD Bioscience, San Jose, CA) 50 µg/mL 농도로 사용하여 표면을 코팅하였다. 이 방법은 세포접착을 위한 가장 효과적인 표면개질법 중의 하나로 패턴은 실온에서 1시간 동안 교반 후 PBS(phosphate buffered saline)로 3회 세정하였다. 사람중간엽줄기세포는 미국의 Lonza Walkersville, Inc로부터 공급받았으며 10% 소태아혈청(FBS), 2 mM L-글루타민, 100 µg/ml 페니실린, 100 µg/ml 스트렙토마이신과 1 mM sodium pyruvate가 혼합된 줄기세포전용 배지를 통해 배양되었다. 세포배양에 사용된 시약들은 GIBCO로부터 구입하였으며, 세포는 95% 공기, 5% 이산화탄소가 혼합된 공기를 가습된 배양기에 공급하여 37°C를 유지하였다. DNA 플라스미드를 주입하기 위해서는 Invitrogen사에서 판매하는 Lipofactamine 2000 을 주어진 프로토콜에 따라 사용하였다.

**5. 형광공명에너지전이 이미징(Fluorescence resonance energy transfer-based imaging)**

실시간 세포이미징 실험 전에 hMSC를 36-48 시간 동안 0.5 % FBS로 처리하고, 이미징 과정 동안에는, 세포를 37°C에서 CO<sub>2</sub> 독립적인 배지(CO<sub>2</sub>-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 이색성 거울, 필터교환기에 의해 통제되는 두 종류의 방출필터로 구성되어 있다(CFP의 경우 480DF30, YFP의 경우 535DF25). 이미지는 1 분마다 저속으로 촬영 수집하고 FRET ratio 이미지를 MetaFluor 6.2 소프트웨어(Universal Imaging, West Chester, PA)에서 계산하고 분석하였다.

**6. 데이터 통계분석**

모든 통계학적 데이터는 평균 ± 평균의 표준편차(SD) 또는 표준오차(SEM)로 표현되었다. Excel 소프트웨어를 사용하여 통계적 평가를 실시하고 Student's t-검정을 수행하여 그룹 간의 통계적 차이를 확인하였다. 유의한 차이는 P 값(<0.05)에 의해 결정되었다.

**III. 연구결과 및 고찰**

**1. 미세파상 패턴을 가진 ECM에서의 세포배양**

본 연구에서는 표 1에 제시된 바에 따라 세포외기질의 세 가지 지형학적 차이를 보이는 미세파상 형태의 패턴구조물에서 세포를 배양하였다. 미세파상 패턴 L(low)유형의 파장과 진폭은 각각 1.0782 ± 0.1(µm)와 27 ± 3(nm)의 지형학

표 1. 세 종류의 미세파상 패턴의 지형학적 특징

Table 1. Geomorphic features in three types of microwavy pattern

Pattern type	Wavelength (µm)	Amplitude (nm)	Accuracy (R <sup>2</sup> )
L	1.0782±0.1	27±3	0.9861
M	1.1791±0.1	80±4	0.9581
H	1.4704±0.2	141±5	0.9769

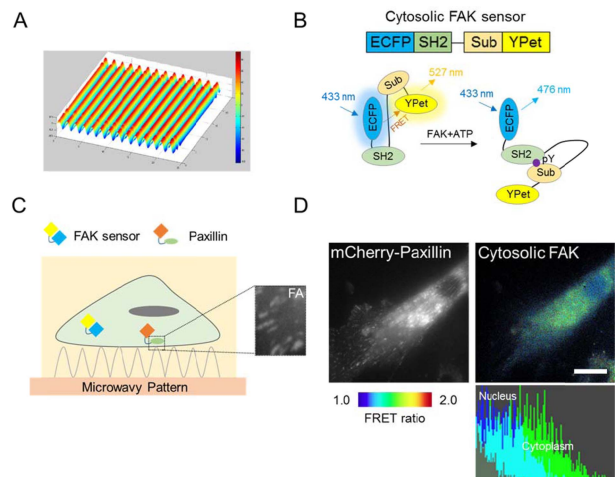


그림 1. 미세파상 패턴 ECM에서의 hMSC 배양 및 Paxillin 및 세포질 FRET-FAK 바이오센서 발현 양상 (A. 본 연구에서 사용된 미세파상 패턴 형태, B. 세포질의 FAK 활성을 탐지할 수 있는 FRET 바이오센서, 두 형광단백질과 SH2와 기질 펩타이드로 구성, C. FAK 센서가 함유된 hMSC의 미세파상패턴에서의 배양, D. mCherry-Paxillin 과 FAK 센서의 hMSC에서의 발현 양상) (Scale bar = 20 µm).

Fig. 1. hMSC cultured on microwavy-patterned ECM and the expression of paxillin and cytosolic FRET-FAK sensor (A. Microwavy-pattern used in this study, B. FRET biosensor capable of detecting cytosolic FAK activity, consisting of two fluorescent proteins, SH2 domain, and its substrate peptide, C. FAK sensor-transfected hMSC cultured on microwavy-patterned ECM, D. The expression profile of mCherry-Paxillin and cytosolic FAK sensor). (Scale bar = 20 µm).

적 특징을 보였고, M(medium)유형은 1.1791 ± 0.1(µm)과 80 ± 4(nm)로써 L유형에 비해 파장과 진폭이 비교적 크다. 이에 반해 가장 큰 수치는 H(high)유형으로 미세파상 패턴의 파장과 진폭이 각각 1.4704 ± 0.2(µm)와 141 ± 5(nm)로 측정되었다.

그림 1에 나타난 바와 같이, 대표적인 미세파상 형태의 패턴구조물과 FAK 바이오센서가 삽입된 hMSC의 배양 방법에 대해서 그림으로 간략히 묘사하였다(그림 1A-C). FAK 바이오센서는 청색형광단백질(ECFP, enhanced cyanine

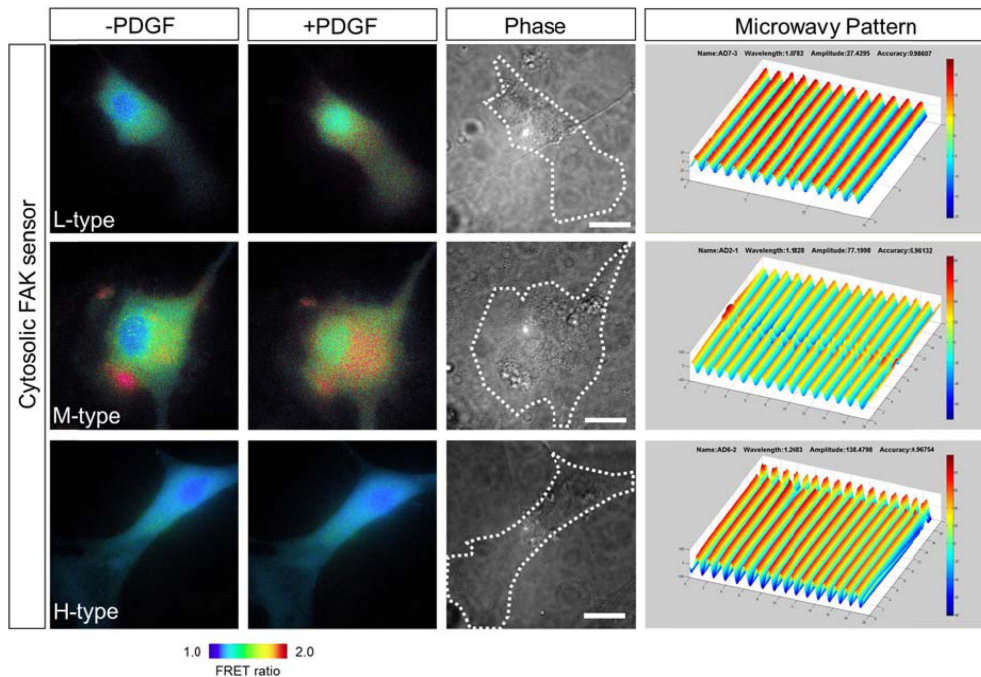


그림 2. 세 유형의 미세파상 패턴 ECM에 배양된 hMSC에서 PDGF 처리 전후 FAK 활성의 변화에 따른 FRET 이미지 (Scale bar = 20  $\mu$ m).  
 Fig. 2. FRET images of FAK activity in hMSC cultured on three different types of microwavy-patterned ECM before and after treatment of PDGF (Scale bar = 20  $\mu$ m).

4

fluorescent protein)와 황색형광단백질(YFP, yellow fluorescent protein)의 변형체인 YPet, 두 종류의 형광단백질(fluorescent protein)이 삽입되어 형광공명에너지전이 쌍(FRET pair)을 이루고 있으며, FAK 단백질의 인산화 부위와 기질 복합체로 구성되어 있어서, 세포내의 활성화된 FAK의 증가에 따라 바이오센서의 구조가 변하게 되어 두 형광단백질이 멀어지게 되므로 FRET 현상의 차이를 감지하도록 설계되어 있다(그림 1B). 미세파상의 형태의 패턴구조물에서 배양된 세포에서도 국소접착단백질의 하나인 Paxillin이 잘 발현되는 것을 보았고, 동일한 세포에서 FAK 바이오센서도 높은 해상력으로 발현되는 것이 관찰되었다. Paxillin 단백질은 세포 전 부위에 골고루 분포하고 있는 양상을 보이거나 세포 외곽부위에서는 응축되어 높은 형광발현 양상을 보여주고 있다. 이에 반해 FAK 바이오센서를 통해 드러난 FAK의 활성은 세포질에서 높게 나타났으며, 핵과 세포 외곽부위에는 비교적 낮은 활성도를 나타내고 있다(그림 1D).

## 2. 미세파상 패턴에서 배양된 hMSC에서 PDGF에 유도되는 FAK 신호의 변화

세포내의 FAK는 혈소판유래성장인자(platelet-derived growth factor, PDGF)에 의해 활성화되는 것으로 보고되고 있어[15], 본 연구진은 PDGF(50 ng/ml)를 처리하여 미

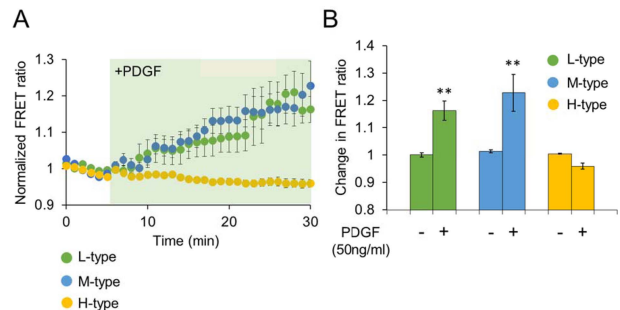


그림 3. 세 유형의 미세파상 패턴 ECM에 배양된 hMSC에서 PDGF 처리 전후 FAK 활성의 시간경과에 따른 변화 측정.

Fig. 3. Time courses of FRET analysis of FAK activity in hMSC cultured on three different types of microwavy-patterned ECM before and after treatment of PDGF.

세파상의 패턴표면에서 배양된 줄기세포에서의 FAK 활성 변화를 실시간으로 관찰하였다. 그 결과 그림 2에서 보이는 바와 같이, L과 M형의 미세파상 패턴에서 배양된 줄기세포에서는 PDGF 처리 전 후를 비교해 볼 때, FAK 센서의 FRET 신호가 높게 나타나는 현상이 이미지를 통해 측정된 데 반해, H형의 미세파상 패턴에서는 유의미한 색깔의 변화가 없었다. FRET ratio 컬러신호에서 붉은 색은 활성도의 높음을, 파란색은 활성도의 낮음을 나타낸다(그림 2).

시간경과이미지(time course image) 분석에서는 FAK

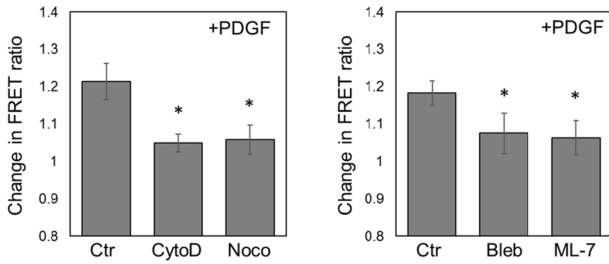


그림 4. 세포골격과 미오신 관련 단백질이 미세파상 패턴 (M형) ECM에 배양된 hMSC의 PDGF-유도성 FAK 활성화에 미치는 영향 (n=3, \*p < 0.05).

Fig. 4. The effect of cytoskeleton and myosin-associated proteins on PDGF-induced FAK activation in hMSC cultured on M type of microwavy-patterned ECM (n = 3, \*p < 0.05).

센서를 발현하는 세포를 이미징 시작 10분 경과 후 PDGF를 처리하자, FAK의 FRET 신호증가가 L과 M형 미세파상 패턴에서는 지속적인 증가추이를 보였으며, 30분 후 활성화도는 최대값에 도달하게 되었다. 이에 반해 H형 미세파상 패턴에서는 FRET 신호증가가 PDGF 처리 후에도 형성되지 않았으며, 이를 해석하면 L과 M형 미세파상 패턴에서는 FAK이 높은 활성도를 보이나, H형 미세파상 패턴에서는 FAK의 활성이 지형학적 특징에 의해 억제됨을 의미한다고 볼 수 있다(L형: n=3, \*p < 0.05, M형: n = 7, \*p < 0.05, H형: n = 5) (그림 3).

이전 선행 연구에서도 나노스케일의 지형학적 신호 (geometric cue)가 세포의 신호를 조절하여, 중간엽줄기세포(MSC)의 분화를 유도할 수 있다고는 알려져 있으나, 대부분의 연구가 세포내의 JNK, ERK1/2와 같은 내재성 단백질과의 연관성에 초점을 두고 있다[16-17]. 그러나 이번 연구결과에서는 지형학적 신호가 리간드(i.e. PDGF)와 세포막에 위치한 수용체(i.e. PDGFR)간의 상호작용 민감성 (sensitivity)에도 작용하여, 단계적인 신호전달에 영향을 줄 수 있다는 새로운 증거를 제시하고 있다.

### 3. PDGF 유도성 FAK 신호의 변화에 세포골격과 미오신 단백질의 영향

본 연구의 후속 실험에서 세 종류의 특이적 지형을 가지는 미세파상 패턴에서 배양된 hMSC가 보이는 PDGF에 유도되는 FAK의 활성화도 차이의 기전을 알고자, 세포외기질-국소접착단백질 복합체와 세포내 신호전달을 중재하는 세포골격(cytoskeleton)과 미오신(myosin) 중개 단백질의 관련성을 조사하였다. 우선적으로 세포골격의 두 요소인 액틴섬유(actin filament)와 미세소관(microtubule)의 억제제인 Cytochalasin D(1  $\mu$ M)와 Nocodazole(1  $\mu$ M)을 각각 처리한 후 PDGF를 처리하여 보다 큰 반응성을 보인 M형의 미

세파상에서의 FAK 활성도를 측정하였다. 그 결과 대조군에 비해 두 억제제를 사용한 실험군에서 FAK의 활성화 모두가 상당히 억제되었다(그림 4). 계속되는 실험에서는 미오신 억제제인 Blebbistatin(10  $\mu$ M)과 미오신 L사슬 키나아제(Myosin light chain kinase, MLCK) 억제제인 ML-7(5  $\mu$ M)을 처리한 후 PDGF와 반응하는 FAK의 활성도를 측정하였다. 그 결과 두 억제제 모두 실험군에서 PDGF에 의해 유도되는 FAK의 활성을 억제하였다(그림 4). 이러한 결과를 통해 세포골격형성과 미오신 단백질 네트워크는 미세파상 패턴에서의 PDGF 유도성 FAK의 활성화 조절에 중요한 작용을 하는 것으로 사료된다.

## IV. 결 론

본 논문에서는 미세파상형태의 패턴을 가진 세포외기질에 hMSC를 배양하고 PDGF에 의해 유도되는 FAK 신호의 활성을 FRET 기반의 실시간 고해상도 이미징을 통해 분석하였다. 그 결과 L과 M형의 미세파상 패턴에서는 FAK 신호 활성이 높게 측정된 데에 반해 H형 패턴에서는 활성이 억제되었다. 이러한 PDGF 유도성 FAK 활성은 세포골격과 액토미오신(actomyosin) 단백질 네트워크에 의해 조절되고 있음을 본 연구를 통해 드러났다. 따라서 본 연구를 통해 얻은 연구 결과는 향후 세포접착 과정에서 세포외기질의 복잡하고 다양한 물리적 지형학적 특징이 어떻게 세포의 신호전달과정을 조절하는지에 대한 중요한 정보와 기본적인 지식을 제공해 줄 것이다. 아울러 본 연구의 결과들은 재생 의학 및 조직공학 분야에서 생체재료를 활용한 세포접착의 효율성을 제고하는 데 있어서도 유의한 정보가 될 것이다.

## 참고문헌

- [1] F. Rosso, A. Giordano, M. Barbarisi, and A. Barbarisi, "From cell-ECM interactions to tissue engineering," *J. Cell. Physiol.*, vol. 199, no. 2, pp. 174-180, 2004.
- [2] S. Martino, F. D'Angelo, I. Armentano, J.M. Kenny, and A. Orlicchio, "Stem cell-biomaterial interactions for regenerative medicine," *Biotechnol. Adv.*, vol. 30, no.1, pp. 338-351, 2012.
- [3] N. Joyce, G. Annett, L. Wirthlin, S. Olson, G. Bauer, and J. A. Nolte, "Mesenchymal stem cells for the treatment of neurodegenerative disease," *Regen. Med.*, vol. 5, no. 6, pp. 933-946, 2010.
- [4] L.C. Lee, N. Gadegaard, M.C. de Andrés, L.A. Turner, K.V. Burgess, S.J. Yarwood, and M. J. Dalby, "Nanotopography controls cell cycle changes involved with skeletal stem cell self-renewal and multipotency," *Biomaterials*, vol. 116, pp. 10-20, 2017.
- [5] W. Qian, L. Gong, X. Cui, Z. Zhang, A. Bajpai, C. Liu, A.B. Castillo, J.C.M. Teo, and W. Chen, "Nanotopographic regulation of human mesenchymal stem cell osteogenesis," *ACS*

- Appl. Mater. Interfaces*, vol. 9, no. 48, pp. 41794-41806, 2017.
- [6] K. Kulangara, Y. Yang, J. Yang, and K.W. Leong, "Nanotopography as modulator of human mesenchymal stem cell function," *Biomaterials*, vol. 33, no. 20, pp. 4998-5003, 2012.
- [7] F.M. Watt, and W.T. Huck, "Role of the extracellular matrix in regulating stem cell fate," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 14, no. 8, pp. 467-473, 2013.
- [8] A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, and D.E. Discher, "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 677-689, 2006.
- [9] S. Even-Ram, V. Artym, and K.M. Yamada, "Matrix control of stem cell fate," *Cell*, vol. 126, no. 4, pp. 645-647, 2006.
- [10] J. Deng, B.E. Petersen, D.A. Steindler, M.L. Jorgensen, and E.D. Laywell, "Mesenchymal stem cells spontaneously express neural proteins in culture and are neurogenic after transplantation," *Stem cells*, vol. 24, no. 4, pp. 1054-1064, 2006.
- [11] G. Abagnale, M. Steger, V.H. Nguyen, N. Hersch, A. Sechi, S. Jousen, B. Denecke, R. Merkel, B. Hoffmann, A. Dreser, U. Schnakenberg, A. Gillner, and W. Wagner, "Surface topography enhances differentiation of mesenchymal stem cells towards osteogenic and adipogenic lineages," *Biomaterials*, vol. 61, pp. 316-326, 2015.
- [12] F.G. Giancotti, and E. Ruoslahti, "Integrin signaling," *Science*, vol. 285, no. 5430, pp. 1028-1033, 1999.
- [13] S.K. Mitra, and D.D. Schlaepfer, "Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells," *Curr. Opin Cell Biol.*, vol. 18, no. 5, pp. 516-523, 2006.
- [14] J. Seong, M. Ouyang, T. Kim, J. Sun, P.C. Wen, S. Lu, Y. Zhuo, N. M. Llewellyn, D.D. Schlaepfer, J. J. Guan, S. Chien, Y. Wang, "Detection of focal adhesion kinase activation at membrane microdomains by fluorescence resonance energy transfer," *Nat. Commun.*, vol. 2, pp. 406, 2011.
- [15] I. Hunger-Glaser, R.S. Fan, E. Perez-Salazar, and E. Rozen-gurt, "PDGF and FGF induce focal adhesion kinase (FAK) phosphorylation at Ser-910: Dissociation from Tyr-397 phosphorylation and requirement for ERK activation," *J. Cell. Physiol.*, vol. 200, no. 2, pp. 213-222, 2004.
- [16] Q. Chen, P. Shou, C. Zheng, M. Jiang, G. Cao, Q. Yang, J. Cao, N. Xie, T. Velletri, X. Zhang, C. Xu, L. Zhang, H. Yang, J. Hou, Y. Wang, and Y. Shi, "Fate decision of mesenchymal stem cells: adipocytes or osteoblasts?," *Cell death Differ.*, vol. 23, no. 7, pp. 1128-1139, 2016.
- [17] K. A. Kilian, B. Bugarija, B.T. Lahn, and M. Mrksich, "Geometric cues for directing the differentiation of mesenchymal stem cells," *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, vol. 107, no. 11, pp. 4872-77, 2010.