

## Identification of a Protein Interacting with Human Nebulin SH3 Domain by Yeast Two-hybrid Screening

Min-A Lee\*, Ji-Hee Kim\*, Byung-In Min\*, Soo Ho Choi\*\*, Han Suk Ko\*\* and Chong-Rak Kim\*\*\*†

\*Department of Biology, \*\*Department of Medicine, \*\*\*Department of Medical Laboratory Science, Inje University

Nebulin is an unusually large actin-binding protein specific to the skeletal muscle of vertebrates. The correlation of nebulin size with thin filament length have led to the suggestion that nebulin acts as a molecular ruler for the length of thin filaments. An SH3 domain occupies the C terminus of nebulin, in the sarcomeric Z-disk and is preceded by a 120-residue stretch containing multiple putative phosphorylation sites. SH3 domain mediates protein-protein interaction involved in the subcellular localization of proteins, cytoskeletal organization and signal transduction. However the binding partner and physiological role of nebulin SH3 domains remains unknown.

Using the yeast two-hybrid system, we identified supervillin, an actin-binding protein, as a nebulin SH3 domain-interacting protein. The SH3 domain of nebulin binds to the sequence encoding amino acids 977 to 1335 of supervillin. But the sequence encoding amino acids 977 to 1335 displays weaker binding than the sequence encoding amino acids 977 to 1788.

**Key Words:** Nebulin, SH3, Supervillin, Yeast two-hybrid, Cell-adhesion

### 서 론

근질의 thin filament는 globular monomer인 G-actin이 결합하여 filamentous polymer인 F-actin으로 이루어져 있다. 질서 정연한 근질의 thin filament의 길이 조절은 오랜 동안 의문이었다. Nebulin은 드물게 거대한 actin 결합 단백질로 척추동물의 골격근에 특이한 단백질로 알려져 있다<sup>1,38</sup>. 단일 분자의 nebulin은 actin이 이루는 근질의 thin filament 전반에 구성되어 있으며, 근육의 수축과 이완 시 thin filament와 같은 위치에 존재한다. 분자량이 600 kDa에서 900 kDa이 되는 nebulin isoform이 골격근 조직과 발생 시기에 따라 나타나고 thin filament의 길이와 nebulin의 분자량의 상관관계로 미루어 nebulin은 thin filament의 길이를 조절하는 기준자로서 작용할 것으로 추정되었다<sup>4,10</sup>. Nebulin은 super repeat, simple repeat, SH3 domain과 같은 특징적인 구조가 나타나는데, 이 단백질의 대부분을 차지하며 35-residue module을 가진 super repeat은 actin filament와 결합하는 것으로 밝혀져 있고, 31-residue module로 이루어진 simple repeat 부분과 C-말단에 존재하는 SH3 domain은 그 기능이 알려져 있지 않다<sup>17,18,39</sup>.

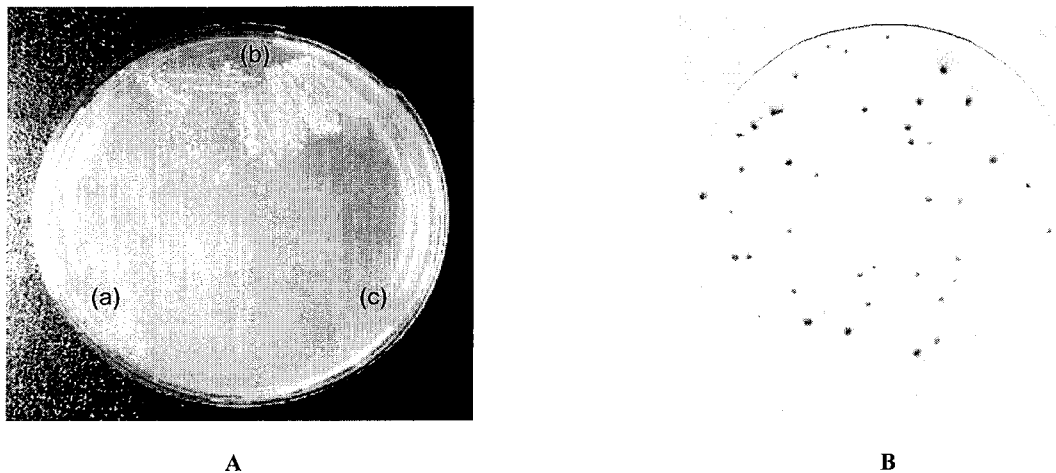
Src-homology 3 (SH3) domain을 통한 단백질과 단백질의 상호작용은 단백질의 subcellular localization과 cytoskeletal organization, signal transduction에 관여한다고 알려졌으며<sup>22,28</sup>, Abelson (ABL) SH3 domain이 3BP1 단백질을 인식한다고 알려진 이래<sup>7,34</sup> SH3 domain을 통한 단백질 간의 상호작용이 많이 보고되고 있다. 이들 중에는 SH3를 통한 growth factor receptor-bound protein-2 (GRB-2)와 Son-of Sevenless (SOS), Src kinase의 SH3 domain과 phosphatidylinositol 3-kinase의 p85 subunit, Crk SH3 domain과 C3G 등이 있다<sup>23,27</sup>. SH3 domain은 서로 직각을 이룬 두 개의 anti-parallel  $\beta$  sheet로 이루어져 있다<sup>27</sup>. RT와 n-Src loop라 불리는 두 개의 variable loop는 Pro-X-X-Pro (PXXP) consensus sequence와 결합하고 SH3 family에서 잘 보존되어 있는 ligand-binding region에 인접해 있다<sup>8,20,26,43</sup>.

Nebulin의 SH3 domain은 분자 내 유일하게 독립적으로 구형을 이루는 부분으로 생각되었다<sup>5,30,31</sup>. Nebulin SH3 domain은 근섬유라는 각별히 밀집된 환경에 존재하고, proline-rich 서열이 부재한 다수의 potential binding partner를 가지고 있는 세포골격의 결합을 조절하는 단백질의 SH3 domain과 보다 높은 상동성을 보이기 때문에, 신호전달체계에 관여하는 다른 SH3 domain과는 현저히 다른 것으로 여겨졌다<sup>32</sup>. 근질의 Z-line에서 nebulin SH3 domain과 결합할 가능성이 높은 단백질로 actin<sup>39</sup>과 titin<sup>9</sup>, Cap-Z protein<sup>35</sup>이 지목되었다. Politou 등<sup>32</sup>은 NMR spectroscopy에 의해 사람 nebulin SH3 domain의 3차 구조를 밝혀 Z-line 내의 물리적인 SH3 결합 단백질의 성격을

\*논문 접수: 2001년 4월 16일  
수정재접수: 2001년 6월 20일

†별책 요청 저자: 김정락

This work was supported by grants from the KOSEF (981-0509-049-1).



**Fig. 1.** Identification of positive yeast colonies. **(A)** Viability of yeast cells containing pGAD10-A3 plasmid on the SD/-Trp/-Leu/-His plate. The expression of pGAD10-A3 (prey, selected from human muscle cDNA library) was co-expressed with pGBT9 (bait) as the unfused plasmid (a), pGBT9-hnSH3 (b) or pLAMS' (c, false-positive detection plasmid) in yeast. **(B)** LacZ phenotype assay. Blue spots indicate colonies resulting from  $\beta$ -galactosidase activity (b).

구명하고, titin을 actin이나 Cap-Z protein 보다 결합 가능성이 높은 단백질로 지목하였다. 그렇지만 현재까지 nebulin SH3 domain의 결정적인 binding partner를 찾아내지 못하였다.

본 연구는 yeast two-hybrid system을 이용하여 nebulin SH3 domain의 binding partner를 찾고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. Yeast two-hybrid assay (Domain mapping)

Yeast two-hybrid assay을 위해 Gal4 DNA-binding domain을 포함하는 bait plasmid로는 pGBT9을 사용하였고, Gal4 activation domain을 포함하는 prey plasmid로는 pGAD10을 사용하여 시약 생산자의 매뉴얼에 따라 시행하였다 (Clontech). Yeast의 형질전환은 일반적인 lithium acetate method를 사용하였다<sup>11)</sup>. pGBT9-hnSH3와 (사람 nebulin 잔기 6464-6669) 사람 골격근의 cDNA library로 (HL4010AB, Clontech) yeast strain HF7c를 형질전환하여 Leu과 Trp, His을 제외한 기본 배지에서 키운 후 colony lift filer에서 galactosidase 활성도를 조사하여 HIS3와 lacZ reporter gene을 활성화 능력에 따라 nebulin SH3와 결합하는 peptide를 생산하는 clone을 검색하였다. 사람 nebulin의 SH3 domain을 포함한 PCR 생성물을 GENE CLEAN kit (BIO101)으로 정제한 후 Klenow enzyme을 처리하여 pBluescript II SK(+)<sup>12)</sup>의 EcoRV 지역으로 삽입하였다. Reading frame를 확인한 후 제한 효소 BamHI과 SalI으로 절단한 DNA 단편을 pGBT9에 삽입하여 bait plasmid인 pGBT9-hnSH3를 제작한 후 이것을 E. coli DH5 $\alpha$ 에서 증폭하여 사용하였다.

pGAD10-SV977-1788은 사람 골격근의 cDNA library로부터 선별한 것으로 supervillin C-말단이 EcoRI-NotI-SalI adaptor를

통해 pGAD10의 EcoRI 지역으로 삽입되어 있다. Domain mapping을 위한 prey plasmid의 제작은 pGAD10과 supervillin C-말단 2.5 kb 내에 존재하는 다양한 제한 효소 지역을 이용하여 여러 조각의 plasmid를 제작하였다.

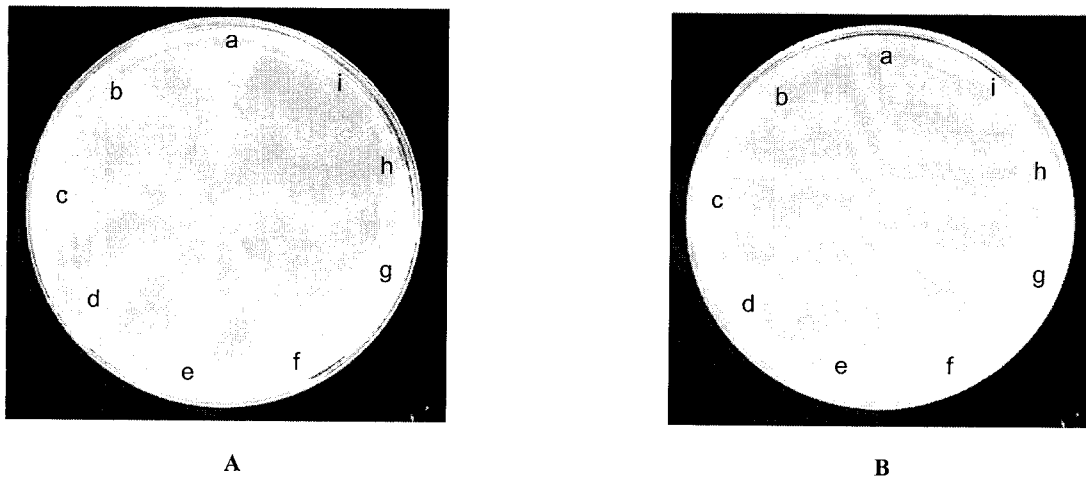
### 2. DNA 염기서열의 분석

DNA 염기서열은 형광으로 표지된 primer를 사용하여 Thermo Sequence Cycle Sequencing Kit와 (USB) DNA 증폭기를 (GeneAmp PCR System 2400, Perkin Elmer) 이용하여 염기서열 자동 분석기로 (LI-COR 4200, LI-COR) 분석하였다.

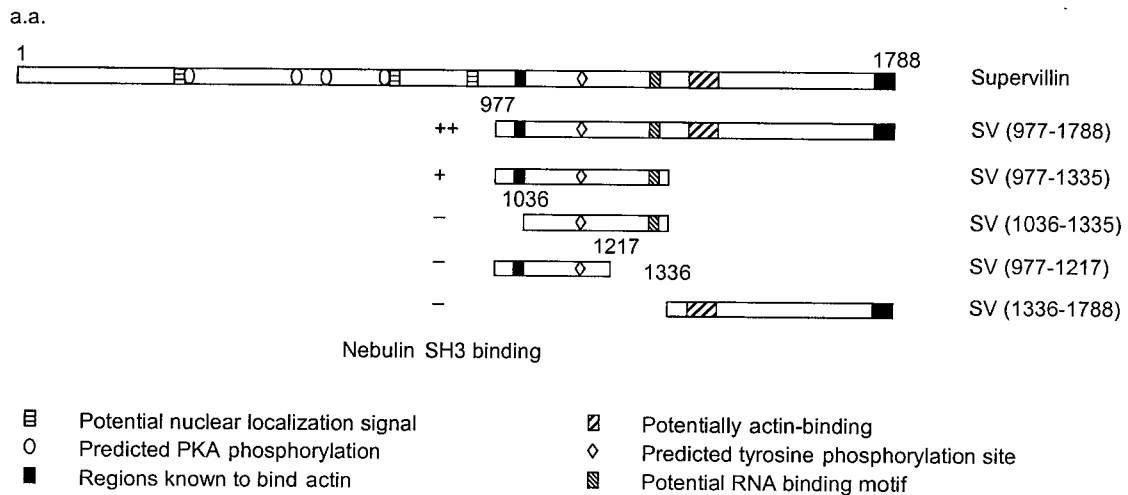
## 결 과

Yeast two-hybrid screening으로 pGAD10에 클로닝된 사람 골격근의 cDNA library를 pGBT9-hnSH3로 검색하여 His<sup>+</sup>/ $\beta$ -gal<sup>+</sup> 클론을 얻었다 (Fig. 1). 염기서열 분석 결과 선별된 cDNA 조각은 supervillin의 C 말단 2.6 kb로 villin과 gelsolin의 actin-binding motif와 높은 상동성을 보였다.

Nebulin SH3와 결합하는 supervillin의 domain mapping을 위해 pGAD10에 supervillin 아미노산 잔기 977-1217 (pGAD10-SV977-1217, Fig. 2-b), supervillin 아미노산 잔기 1036-1335 (pGAD10-SV1036-1335, Fig. 2-c), supervillin 아미노산 잔기 977-1335 (pGAD10-SV977-1335, Fig. 2-d), supervillin 아미노산 잔기 1336-1778 (pGAD10-SV1336-1778, Fig. 2-e), supervillin 아미노산 잔기 977-1788을 (pGAD10-SV977-1788, Fig. 2-f) 갖는 다양한 prey plasmid를 제작하여 yeast two-hybrid assay를 시행하였다. Trp과 Leu, His가 결합된 배지에서 자라는 yeast double transformant는 bait 단백질과 prey 단백질의 상호작용으로



**Fig. 2.** The SH3 domain of nebulin binds specifically to supervillin in the yeast two-hybrid system. **(A)** Viability of yeast cells on the SD/-Trp/-Leu plate. **(B)** Viability of positive yeast cells on the SD/-Trp/-Leu/-His plate. a: pGBT9-hnSH3 + pGAD10. b: pGBT9-hnSH3 + pGAD10-SV977-1217. c: pGBT9-hnSH3 + pGAD10-SV1036-1335. d: pGBT9-hnSH3 + pGAD10-SV977-1335. e: pGBT9-hnSH3 + pGAD10-SV1336-1788. f: pGBT9-hnSH3 + pGAD10-SV977-1788. g: pVA3 + pTD1. h: pGBT9-hnSH3. i: pGAD10.



**Fig. 3.** Domain mapping of nebulin SH3 with supervillin. Representation of the domain structure showing the three potential nuclear localization signals, four predicted PKA phosphorylation consensus sequences, conserved regions homologous to segment 2 and the head-piece of villin (regions known to bind actin), a potentially actin-binding region, a predicted tyrosine phosphorylation site and a potential RNA binding motif.

HIS3 reporter gene이 유도된 것으로 판단하였다. pGBT9-hnSH3와 pGAD10-SV977-1335 (Fig. 2-d) 또는 pGAD10-SV977-1788을 (Fig. 2-f) 갖는 형질전환체만이 histidine이 제외된 선별배지에서 성장하여 nebulin SH3 domain과 결합반응을 나타내었다. 그러나 pGAD10-SV977-1335을 갖는 형질전환체는 pGAD10-SV977-1788 보다 느리게 성장하여 약한 결합반응을 나타내었다. 대조 실험으로 이러한 reporter gene의 활성이 fusion protein의 비특이적 활성화에 기인한 것이 아님을 나타내었다. pGBT9-hnSH3와 nonfused pGAD10 (Fig. 2-a), 또는 pGBT9-hnSH3나 (Fig. 2-h) pGAD10 (Fig. 2-i) 단독으로는 이러한 re-

porter gene의 활성이 나타나지 않는다. 양성 대조군은 p53이 융합된 pVA3와 T-antigen이 융합된 pTD1을 가진 형질전환체이다 (Fig. 2-g).

## 고 찰

Actin filament가 관여하는 cell junction은 adherens junction과 focal adhesion으로 대별되는데 cell adhesion과 proliferation, differentiation, polarization, motility과 같은 세포가 기능을 수행하는데 중요한 역할을 한다<sup>12)</sup>. Adherens junction은 transmembrane

protein인 cadherin을 통해 세포와 세포 간의 결합을 이룬다<sup>10</sup>. 세포질에서 cadherin은  $\beta$ -catenin,  $\gamma$ -catenin과 결합하고,  $\beta$ -catenin은 다시  $\alpha$ -catenin과 결합을 이룬다<sup>11</sup>.  $\alpha$ -Catenin은 F-actin과 직접 결합하거나  $\alpha$ -actinin이나 vinculin, 여러 가지 F-actin-binding protein을 통해 간접적으로 결합하기도 한다<sup>40</sup>. Focal adhesion에서는 transmembrane protein인 integrin이 extracellular matrix와 결합하고<sup>13</sup> 세포질에서는  $\alpha$ -actinin이나 vinculin, paxillin, talin 등과 결합하여 이들이 다시 F-actin과 결합을 이룬다<sup>3,15,42</sup>. 여러 가지 actin-binding protein들이 cadherin이나 integrin 같은 adhesion molecule과 actin cytoskeleton을 연결하는 linker 역할을 수행한다.

Nebulin SH3와 유연관계가 있는 단백질로는 nebulin과 Lasp-1, cortactin, vinexin, ponsin 등이 있다. Nebulette SH3는 nebulin SH3의 아미노산 서열과 80%가 동일하며 91%의 유사성을 가지고 있으며 adherens junction과 focal adhesion에서 발견되는 zyxin과 결합한다<sup>19</sup>. Nebulette는 심장근의 z-line과 dense body에 나타나며 actin과 결합하고 있다<sup>24,25</sup>. Lasp-1 SH3는 nebulin SH3의 아미노산 서열과 83%가 동일하며 92%의 유사성을 가지고 있다. Lasp-1은 세포막의 cortical region에서 actin cytoskeleton을 조절하는 것으로 알려졌다<sup>6,36</sup>. Cortactin SH3는 nebulin SH3의 아미노산 서열과 50%가 동일하고 65%의 유사성을 가지고 있으며 cortactin은 EMS1, p80/85 src substrate로도 알려져 있는데 cell-matrix contact site에 존재한다<sup>37</sup>. Vinexin SH3는 nebulin SH3의 아미노산 서열과 40%가 동일하고 67%의 유사성을 가지고 있으며 vinculin과 결합하는 것이 알려졌다. Vinexin은 섬유아세포의 focal adhesion과 상피세포의 adherens junction에서 발견된다<sup>2</sup>. Ponsin SH3는 nebulin SH3의 아미노산 서열과 38%가 동일하고 61%의 유사성을 가지고 있으며 I-afadin과 vinculin이 경쟁적으로 결합하는 것이 알려졌다. Ponsin도 focal adhesion과 상피세포의 adherens junction에서 발견된다<sup>21</sup>.

본 연구에서 nebulin SH3 domain의 표적분자로 찾아낸 supervillin은 네 개의 잠재적인 nuclear localization site와 N-terminal의 gelsolin-like core, C-terminal의 headpiece domain으로 이루어져 있다. Supervillin은 adherent cell의 adherens junction에서 E-cadherin과 공존하여 actin bundle 형성에 관여하는 것으로 추정되고 있다<sup>29,33,41</sup>. Nebulin SH3와 결합하는 부위는 supervillin 아미노산 잔기 977-1335가 중심이 되는 것으로 나타났는데, supervillin C 말단부 보다 (아미노산 잔기 977-1788) 결합이 약한 것으로 보아 완전한 결합을 위해서는 C 말단부 아미노산이 추가되어야 할 것으로 보인다 (Fig. 3). GRB-2 SH3와 SOS의 결합처럼 예외적으로 강한 결합력을 가진 경우 외에, 일반적으로 SH3의 결합력은 작기 때문에 강한 결합을 위해서는 주변부의 협동적 결합이 필요한 것으로 추측된다.

Nebulin SH3 domain과 supervillin의 결합으로부터 두 가지

가능성을 추정할 수 있다. 첫째는 앞서 살펴본 바와 같이 nebulin SH3와 유연관계가 있는 단백질들은 세포막의 focal adhesion과 adherens junction에서 actin bundle 형성에 관여하는 것처럼 nebulin과 nebulin도 근육의 z-line에서 supervillin과 같은 actin-binding protein을 통해 actin bundle 형성에 관여하며, 아직도 구조 규명이 이루어지지 않은 Z-line이 focal adhesion이나 adherens junction과 공통된 구조에서 유래되었을 가능성이 있다. 둘째는 현재까지 nebulin은 골격근에만 발견되고 supervillin은 모든 세포에서 발견되는 것으로 알려져 있으므로, 근육이 아닌 일반 세포에서도 supervillin을 통해 세포막의 focal adhesion과 adherens junction에서 actin bundle 형성에 관여하는 SH3를 가진 작은 가상의 nebulin isoform 단백질이 존재할 가능성이 있다.

## 참 고 문 헌

- 1) Aberle H, Butz S, Stappert J, Weissig H, Kemler R and Hoshuetzky H (1994): Assembly of the cadherin-catenin complex in vitro with recombinant proteins. *J Cell Sci*, **107**: 3655-3663.
- 2) Akamatsu M, Aota S, Suwa A, Ueda K, Amachi T, Yamada KM, Akiyama SK and Kioka N (1999): Vinexin forms a signaling complex with Sos and modulates epidermal growth factor-induced c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase activities. *J Biol Chem*, **274**: 35933-35937.
- 3) Burridge K and Fath K (1989): Focal contacts: transmembrane links between the extracellular matrix and the cytoskeleton. *BioEssays*, **10**: 104-108.
- 4) Chen MJ, Shih CL and Wang K (1993): Nebulin as an actin zipper. A two-module nebulin fragment promotes actin nucleation and stabilizes actin filaments. *J Biol Chem*, **268**: 20327-20334.
- 5) Chen MJ and Wang K (1994): Conformational studies of a two-module fragment of nebulin and implications for actin association. *Arch Biochem Biophys*, **310**: 310-317.
- 6) Chew CS, Parente JA Jr, Chen X, Chaponnier C and Cameron RS (2000): The LIM and SH3 domain-containing protein, lasp-1, may link the cAMP signaling pathway with dynamic membrane restructuring activities in ion transporting epithelia. *J Cell Sci*, **113**: 2035-2045.
- 7) Cicchetti P, Mayer BJ, Thiel G and Baltimore D (1992): Identification of a protein that binds to the SH3 region of Abl and is similar to Bcr and GAP-rho. *Science*, **257**: 803-806.
- 8) Feng S, Chen JK, Yu H, Simon JA and Schreiber SL (1994): Two binding orientations for peptides to the Src SH3 domain:

- development of a general model for SH3-ligand interaction. *Science*, **266**: 1241-1247.
- 9) Gautel M, Goulding D, Bullard B, Weber K and Fuerst DO (1996): The central Z-disk region of titin is assembled from a novel repeat in variable copy numbers. *J Cell Sci*, **109**: 2747-2754.
  - 10) Geiger B and Ginsberg D (1991): The cytoplasmic domain of adherens-type junctions. *Cell Motil Cytoskeleton*, **20**: 1-6.
  - 11) Gietz D, St Jean A, Woods RA and Schiestl RH (1992): Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res*, **20**: 1425.
  - 12) Gumbiner BM (1996): Cell adhesion: the molecular basis of tissue architecture and morphogenesis. *Cell*, **84**: 345-357.
  - 13) Horwitz A, Duggan K, Buck C, Beckerle MC and Burridge K (1986): Interaction of plasma membrane fibronectin receptor with talin-a transmembrane linkage. *Nature*, **320**: 531-533.
  - 14) Hu DH, Kimura S and Maruyama K (1989): Huge proteins in vertebrate striated muscle. *Biomed Res*, **10**: 165-171.
  - 15) Jockusch BM, Bubeck P, Giehl K, Kroemker M, Moschner J, Rothkegel M, Rüdiger M, Schuter K, Stanke G and Winkler J (1995): The molecular architecture of focal adhesions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **11**: 379-416.
  - 16) Kruger M, Wright J and Wang K (1991): Nebulin as a length regulator of thin filaments of vertebrate skeletal muscles: correlation of thin filament length, nebulin size, and epitope profile. *J Cell Biol*, **115**(1): 97-107.
  - 17) Labeit S and Kolmerer B (1995): The complete primary structure of human nebulin and its correlation to muscle structure. *J Mol Biol*, **248**: 308-315.
  - 18) Labeit S and Kolmerer B (1995): Titins, giant proteins in charge of muscle ultrastructure and elasticity. *Science*, **270**: 293-296.
  - 19) Li B and Trueb B (2001): Analysis of the  $\alpha$ -actinin/zyxin interaction. *J Biol Chem*, in press.
  - 20) Lim WA, Richards FM and Fox RO (1994): Structural determinants of peptide-binding orientation and of sequence specificity in SH3 domains. *Nature*, **372**: 375-379.
  - 21) Mandai K, Nakanishi H, Satoh A, Takahashi K, Satoh K, Nishioka H, Mizoguchi A and Takai Y (1999): Ponsin/SH3 P12: an I-afadin- and vinculin-binding protein localized at cell-cell and cell-matrix adherens junctions. *J Cell Biol*, **144**: 1001-1017.
  - 22) Mayer B and Baltimore D (1993): Signalling through SH2 and SH3 domains. *Trends Cell Biol*, **3**: 8-13.
  - 23) Mayer BJ and Gupta R (1998): Functions of SH2 and SH3 domains. *Curr Top Microbiol Immunol*, **228**: 1-22.
  - 24) Millevoi S, Trombitas K, Kolmerer B, Kostin S, Schaper J, Pelin K, Granzier H and Labeit S (1998): Characterization of nebulin and nebulin and emerging concepts of their roles for vertebrate Z-discs. *J Mol Biol*, **282**: 111-123.
  - 25) Moncman CL and Wang K (1995): Nebulette: a 107 kD nebulin-like protein in cardiac muscle. *Cell Motil Cytoskeleton*, **32**: 205-225.
  - 26) Musacchio A, Noble M, Pauptit R, Wierenga R and Saraste M (1992): Crystal structure of a src-homology 3 (SH3) domain. *Nature*, **359**: 851-855.
  - 27) Musacchio A, Wilmanns M and Saraste M (1994): Structure and function of the SH3 domain. *Prog Biophys Mol Biol*, **61**(3): 283-297.
  - 28) Pawson T and Scott JD (1997): Signalling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278**: 2075-2080.
  - 29) Pestonjamas KN, Pope RK, Wulfschlegel JD and Luna EJ (1997): Supravillin (p205): A novel membrane-associated, F-actin-binding protein in the villin/gelsolin superfamily. *J Cell Biol*, **139**: 1255-1269.
  - 30) Pfuhl M, Winder SJ and Pastore A (1994): Nebulin, a helical actin binding protein. *EMBO J*, **13**: 1782-1789.
  - 31) Pfuhl M, Winder SJ, Castiglione MM, Labeit S and Pastore A (1996): Correlation between conformational and binding properties of nebulin repeats. *J Mol Biol*, **257**: 367-384.
  - 32) Politou AS, Millevoi S, Gautel M, Kolmerer B and Pastore A (1998): SH3 in muscles: Solution structure of the SH3 domain from nebulin. *J Mol Biol*, **276**: 189-202.
  - 33) Pope RK, Restonjamas KN, Smith KP, Wulfschlegel JD, Strassel CP, Lawrence JB and Luna EJ (1998): Cloning, characterization, and chromosomal localization of human supravillin (SVIL). *Genomics*, **52**: 342-351.
  - 34) Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P and Baltimore D (1993): Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*, **259**: 1157-1161.
  - 35) Schafer DA, Hug C and Cooper JA (1995): Inhibition of CapZ during myofibrillogenesis alters assembly of actin filaments. *J Cell Biol*, **128**: 61-70.
  - 36) Tomasetto C, Moog-Lutz C, Regnier CH, Schreiber V, Basset P and Rio MC (1995): Lasp-1 (MLN 50) defines a new LIM protein subfamily characterized by the association of LIM and SH3 domains. *FEBS Lett*, **373**: 245-249.
  - 37) Van Damme H, Brok H, Schuurings-Scholtes E and Schuurings E (1997): The redistribution of cortactin into cell-matrix contact sites in human carcinoma cells with 11q13 amplification is

- associated with both overexpression and post-translational modification. *J Biol Chem*, **272**: 7374-7380.
- 38) Wang K and Williamson C (1980): Identification of a N2 line protein of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**: 3254-3258.
- 39) Wang K, Knipfer M, Huang QQ, van Heerden A, Hsu LC, Gutierrez G, Quian XL and Stedman H (1996): Human skeletal muscle nebulin sequence encodes a blueprint for thin filament architecture. Sequence motifs and affinity profiles of tandem repeats and terminal SH3. *J Biol Chem*, **271(8)**: 4304-4314.
- 40) Weiss EE, Kroemker M, Rüdiger A-H, Jockusch BM and Rüdiger M (1998): Vinculin is part of the cadherin-catenin junctional complex: complex formation between  $\alpha$ -catenin and vinculin. *J Cell Biol*, **141**: 755-764.
- 41) Wulfkuhle JD, Donina IE, Stark NH, Pope RK, Pestonjamasp KN, Niswonger ML and Luna EJ (1999): Domain analysis of supervillin, an F-actin bundling plasma membrane protein with functional nuclear localization signals. *J Cell Sci*, **112**: 2125-2136.
- 42) Yamada KM and Geiger B (1997): Molecular interactions in cell adhesion complexes. *Curr Opin Cell Biol*, **9**: 76-85.
- 43) Yu HS, Chen JK, Feng S, Dalgarno DC, Brauer AW and Schreiber SL (1994): Structural basis for the binding of proline-rich peptides to SH3 domains. *Cell*, **76**: 933-945.
-