

## Regulated Expression of Nebulin by Transfection of Green Fluorescent Protein-Tagged Nebulin Fragments in Cultured Chicken Myoblast

Su Jung Park\*, Ji-Hee Kim\*\*, Han Suk Ko\*\*\*, Chong-Rak Kim†, Han Do Kim\* and Ho Sung Kang\*

\*Department of Molecular Biology, Pusan National University, \*\*Department of Biology, \*\*\*Department of Medicine, †Department of Medical Laboratory Science, Inje University

Nebulin is an approximately 700 kDa filamentous protein in vertebrate skeletal muscle. It binds to the Z line and also binds side-by-side to the entire thin actin filament in a sarcomere. 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. The C-terminal part of human nebulin is anchored in the sarcomeric Z-disk and contains an SH3 domain. SH3 domains have been identified in an ever-increasing number of proteins important for a wide range of cellular processes, from signal transduction to cytoskeleton assembly and membrane localization. However, the exact physiological role of SH3 domains remains, in many cases, unclear. To explore the role of nebulin SH3 in the cytoskeletal rearrangement that accompanies myoblast differentiation, we transfected sense and antisense nebulin SH3 domain fused to enhanced green fluorescent protein in myoblast. Cells expressing nebulin SH3 fragment showed decrease of cell-cell adhesion, and cells transfected with antisense nebulin SH3 gene showed a rounded cell morphology and loss of cell-matrix adhesion. No alteration in cell shape and differentiation were observed in control cells expressing enhanced green fluorescent protein. Perturbation of nebulin altered the cell shape and disrupted cell adhesion in myoblast, demonstrating that nebulin can affect cytoskeleton rearrangement.

**Key Words:** Nebulin, SH3, Myoblast, Sense, Antisense, EGFP, Cytoskeleton

### 서 론

Nebulin은 골격근에만 존재하는 것으로 알려진 거대한 단백질로서, 근섬유 단백질의 2~3%를 차지한다<sup>13,33</sup>. 중, 발생시기 그리고 골격근의 위치에 따라 크기가 600~900 kDa으로 다양하게 나타나며<sup>12,19,34</sup>, 단일 폴리펩티드로 되어 있고 여러 조직의 근절의 길이와 actin filament의 길이에 비례하므로 actin filament의 길이를 조절하는 기준자로 작용할 것이라고 추정되었다<sup>17,18,32</sup>. Nebulin에는 super repeat, simple repeat, SH3 domain과 같은 특징적인 구조가 나타난다. 35-residue module이 반복하는 super repeat은 actin filament와 결합하는 것으로 밝혀져 있고, 31-residue module로 이루어진 simple repeat과 C-말단에 존재하는 SH3 domain은 그 기능이 알려져 있지 않다.

Src-homology 3 (SH3) domain은 50여 개의 아미노산으로

이루어져 있으며 효모에서 포유류에 이르기까지 다양한 종에 보존되어 있다<sup>33</sup>. 일반적으로 SH3 domain은 단백질의 subcellular localization과 cytoskeletal organization, signal transduction에 관여한다고 알려졌으며<sup>2,24</sup>, SH3 domain을 통한 신호전달은 단백질 kinase와 같은 효소의 연쇄적 반응을 일으키거나 cytoskeleton의 결합구조를 변화시킨다. SH3 domain을 가진 단백질은 효소활성을 가진 src나 abl과 같은 non-receptor tyrosin kinase, phospholipase C, phosphatidylinositol 3'-kinase 등의 효소에서 발견되며<sup>14,32</sup>, cytoskeleton의 결합에 관여하는 spectrin<sup>32</sup>, myosin 1b, vinculin, yeast의 actin binding protein인 ABP1, chick src substrate인 p80/85에서 발견되었다<sup>7,32,35</sup>. SH3 domain과 결합하는 단백질로는 cytoskeleton인 paxillin과 3BP1, 3BP2, guanine nucleotide exchange protein (Sos), Ras GTPase-activating protein (GAP), macrophage의 c-cbl이 알려졌으며 이들 단백질은 SH3 domain의 binding site로 작용하는 proline-rich motif를 가지고 있다<sup>8,28</sup>. 특히 이들 단백질 중 일부는 focal adhesion에 관여하는 단백질임이 밝혀졌다. Focal adhesion protein은 세포의 형태와 성장 그리고 분화와 연관되어 세포와 세포간의 접촉이 일어나는 부위에 위치하는 단백질들로 extracellular matrix

\*논문 접수: 2001년 12월 1일

수정재접수: 2001년 12월 21일

†별책 요청 저자: 김정락

본 논문은 한국학술진흥재단 1996년도 박사 후 연수과정지원사업 (Su Jung Park) 지원으로 이루어짐.

(ECM)과 cytoskeleton 또는 이들을 서로 연결하는 integral protein의 세 가지 공간적 위치를 차지하고 있다. Focal adhesion에 관여하는 ECM으로는 fibronectin, collagen 등이 알려져 있으며<sup>6,15,33,34</sup>, cytoskeleton으로는 구조단백질인 actin,  $\alpha$ -actinin, dystrophin, talin, vinculin, tensin, paxillin, zyxin, 58 kDa의 단백질 등이 있다<sup>11</sup>). 이들은 서로 상호작용함으로써 ECM의 다양한 기능은 이들의 수용체의 발현에 의해 조절 받으며, cytoskeleton은 actin 결합단백질에 의해 조절 받는다고 보고되었다<sup>20,24</sup>.

Nebulin의 SH3 domain은 분자내 유일하게 독립적으로 구형을 이루는 부분으로 생각되었다<sup>3,25,26</sup>. Nebulin SH3 domain은 근섬유의 아주 밀집된 환경에 존재하고 cytoskeleton의 결합을 조절하는 단백질과 아주 높은 상동성을 보이며 prolin-rich 지역이 없는 potential binding partner를 가지고 있음을 미루어 보아 nebulin SH3은 signal transduction 과정에 관여하는 SH3 domain과는 현저히 다른 것으로 생각되고 있다<sup>27</sup>.

본 연구에서는 nebulin SH3 domain을 enhanced green fluorescent protein (EGFP)의 C-말단에 sense와 antisense로 cloning하여 SH3 domain이 근원세포분화에 어떠한 영향을 주는지 알아보려고 하였다.

## 재료 및 방법

### 1. 근원세포배양

O'Neill과 Stockdale의 방법에 따라<sup>21</sup>) 입란 후 12일된 계배로부터 가슴근육을 추출하여 minimum Eagle's essential media (MEM) 내에서 결합조직과 지방을 제거한 뒤 1~2 mm 조각이 되게 잘게 찢은 다음 최종 농도가 0.1%가 되게 트립신을 30~40분간 처리하였다. 그리고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에 30분간 배양 후 원심 분리로 트립신을 제거한 다음 811 배양액 (80% MEM/10% horse serum/10% embryo extract)을 넣고 피펫으로 세포들을 잘 풀고 멸균한 20  $\mu$ m nylon net filter (Milipore)로 거른 후 콜라겐으로 전 처리한 직경 100 mm의 배양 용기에 세포들을 8 ml씩 배양하였다. 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 15분간 두어서 쉽게 부착하는 섬유아세포를 제거하고 혈구계수기로 세포수가 5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml이 되도록 811 배지로 희석하여 3 ml씩 60 mm dish에 배양하였다. 세포의 confluency가 40~60%가 될 때까지 배양한 후 transfection에 이용하였다.

### 2. RT-PCR

Chomczynski의 방법에 따라<sup>4</sup>) TRI REAGENT (NRC, TR-118)로 분리한 total RNA를 50  $\mu$ l의 TE buffer에 녹인 후 DNase를 처리했다. Phenol:chloroform:isoamyl alcohol (25:24:1)과 chloroform:isoamyl alcohol (24:1)를 처리 후 100% 에탄올로 침전시킨 후 40  $\mu$ l의 멸균수로 녹였다. Total RNA 2  $\mu$ g을

주형으로 하여 oligo dT primer (Promega) 0.5  $\mu$ g를 첨가시키고, 최종 부피를 14  $\mu$ l로 해서 70°C에서 10분간 변성시킨 후 5X synthesis buffer (M-MLV) 4  $\mu$ l와 10 mM dNTP mix 1  $\mu$ l, M-MLV 역전사 효소 (Promega) 1  $\mu$ l를 첨가하여 42°C에서 2시간 반응시켜 cDNA를 얻었다. 합성된 cDNA를 주형으로 SH3 domain 전후의 forward primer (5'-GTGTGAATTCCTTCCTCC-CACCCATCC-3')와 reverse primer (5'-ACTAGAATTCACCAT-GGAAGAGAGGC-3')를 사용하여 PCR을 시행하였다. PCR products를 EcoRI 제한효소를 이용하여 절단한 후, pEGFP-C3의 (CLONTECH) EcoRI 지역에 삽입하였다. DNA sequencing으로 reading frame과 sense, antisense를 확인하였다.

### 3. Lipofection

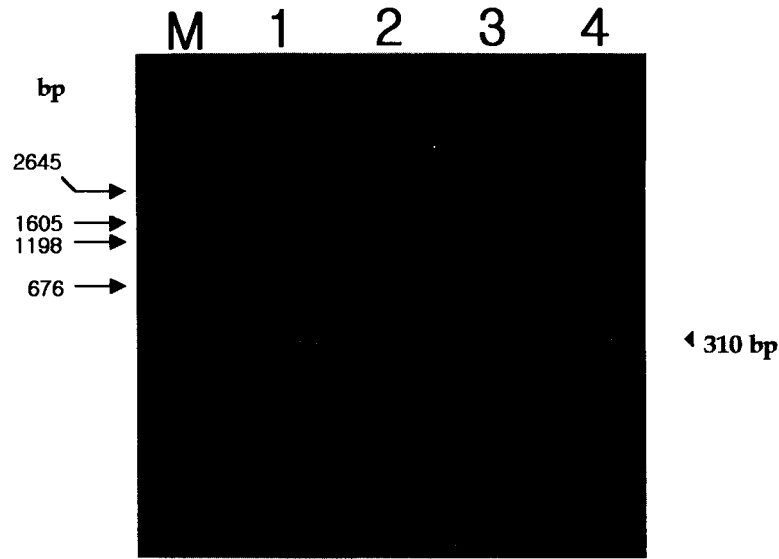
근원세포를 (5 $\times$ 10<sup>5</sup> cells/ml) 소독한 cover glass가 담긴 culture dish에서 cell confluency가 40~60% 될 때까지 배양하여 준비했고, DNA는 Plasmid Midi kit (QIAGEN)로 순수정제 분리하여 준비했다. 순수정제 분리한 DNA 5  $\mu$ g는 serum-free media 100  $\mu$ l에 희석하고 Lipofectin 15  $\mu$ g를 serum-free media 100  $\mu$ l에 희석한 다음 상온에 30~45분 동안 두었다. 각각 희석된 DNA와 Lipofectin을 혼합하여 1분간 부드럽게 vortex한 다음 상온에서 10~15분간 두었다. 준비된 세포를 serum-free media로 1회 수세한 후 DNA/Lipofectin 혼합액에 serum-free media 2 ml를 더 첨가한 다음 세포에 처리했다. 8시간 동안 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 transfection시켰다. Transfection이 끝난 후 8102 media (80% MEM/10% horse serum/2% embryo extract)로 교체하였다.

### 4. 형광현미경

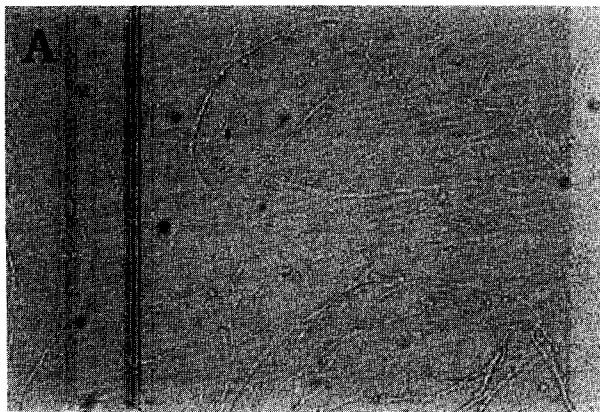
Liposome를 이용하여 nebulin SH3 fragment와 antisense nebulin SH3 fragment를 transfection시킨 근원세포를 48, 73시간 후 PBS로 3번 수세한 다음 4% paraformaldehyde로 30분 동안 고정시켰다. PBS로 2회 더 수세한 다음 cover glass를 slide glass로 옮겨 mounting한 후 형광현미경 (Olympus, BX-FLA)을 이용하여 FITC filter로 관찰하였다.

## 결 과

닭의 가슴근육으로부터 분리한 myoblast를 24, 48, 72, 96시간 배양 후 total RNA를 추출하고 oligo-dT로 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 주형으로 SH3 domain 전후의 primer로 PCR를 수행하여 310 bp의 PCR 생성물을 얻었다 (Fig. 1). SH3 domain PCR 생성물과 pEGFP-C3 vector를 EcoRI 제한효소를 처리하여 EGFP의 C-말단에 SH3 domain을 sense와 antisense로 각각 삽입하였다. 각각 준비된 SH3와 antisense SH3를 liposome를 이용하여 myoblast에 transfection시킨 다음 관



**Fig. 1.** Detection of nebulin SH3 domain in cultured myoblast by RT-PCR. Total RNA was isolated from 24 hr, 48 hr, 72 hr, 96 hr cultured myoblast and was subjected to RT-PCR using primers specific for chicken nebulin SH3 domain. M, pGEM DNA marker; 1, 24 hr; 2, 48 hr; 3, 72 hr; 4, 96 hr.



**Fig. 2.** Visualization of autofluorescence in cultured myoblast. **A**, myoblast was observed under normal light; **B**, myoblast was observed under a fluorescent microscopy (Olympus, BX-FLA) using a standard FITC filter set.

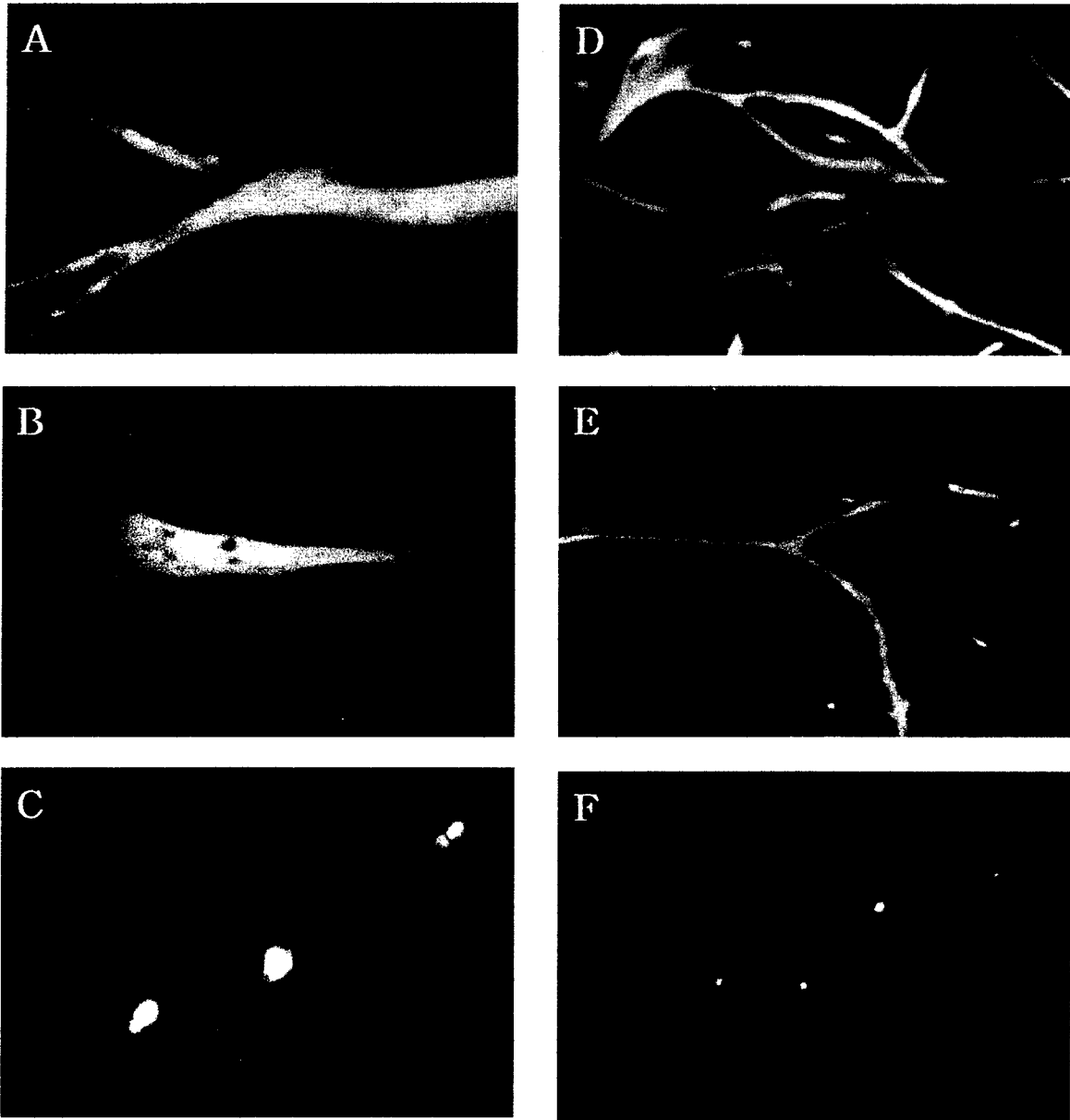
찰하였다. Myoblast의 autofluorescence를 관찰한 결과, myoblast가 스스로 내는 형광은 관찰되지 않았다 (Fig. 2).

EGFP-fused gene의 산물은 핵을 제외한 세포 전체에 걸쳐 나타났다. Transfection 48시간과 73시간 후 관찰하였을 때 pEGFP vector만 transfection된 경우에는 myoblast의 분화에 아무런 영향을 주지 않았다 (Fig. 3, A and D). Nebulin SH3를 도입한 48시간에는 골격근 세포분화의 특징인 세포융합에 의한 다핵세포 형성이 억제되어 주로 단일세포가 발견되었고 (Fig. 3, B), 73시간에는 48시간에 비해서 회복되어 분화가 진행되었음을 알 수 있었다 (Fig. 3, E). Antisense nebulin SH3를 도입한 경우, 48시간 경과 후 부분적으로 단일세포가 관찰되면서 cell-matrix의 결합이 소실되어 대부분 세포괴사를 보였다

(Fig. 3, C). 73시간 후에도 회복효과는 보이지 않았다 (Fig. 3, F).

## 고 찰

척추동물 골격근 근질의 경계를 이루는 Z-line은 30 nm 정도의 폭으로, actin filament의 barbed end와 titin의 N 말단, nebulin의 C 말단을 비롯하여 여러 가지 조절단백질과 구조단백질로 이루어져 있다. Z-line은 연속된 근절 사이에 경계를 이룰 뿐 아니라 개별적인 근절에서 생성된 장력을 근섬유 전체로 전달하여 효과적인 근육의 수축을 일으킨다<sup>21)</sup>. 인접한 근절의 actin filament는 Z-line에서 중첩되어 CapZ나  $\alpha$ -actinin에 의해 cross-link되어 있다<sup>23)</sup>. 인접한 근절의 titin filament도 Z-line에



**Fig. 3.** Expression EGFP, EGFP-SH3 and EGFP-antisense SH3 fused genes in cultured myoblast. EGFP fused genes were transfected into the chicken breast myoblast using a liposome mediated technique. To determine the distribution of tagged proteins, the cells were fixed 48 hr (A, B and C, 400X), 73 hr (D, E and F, 100X) post transfection. A and B, EGFP; C and D, EGFP-SH3; E and F, EGFP-antisense SH3.

서 중첩되어  $\alpha$ -actinin에 의해 cross-link되어 있는 것으로 추정된다<sup>39</sup>). Nebulin의 super repeat를 이루는 N 말단은 F-actin과 결합하여 1  $\mu$ m의 I-band thin filament를 이루고 simple repeat와 serine-rich domain, SH3 domain으로 이루어진 C 말단은 30 nm폭의 Z-line에 묻혀있다. 최근에 nebulin은 Z-line에서 myopalladin에 의해  $\alpha$ -actinin과 연결되어 있다고 보고되었다<sup>1</sup>).

세포의 다양한 생리 활성을 조절하는 신호전달 체계의 분석은 세포막 수용체에 관한 연구, 그리고 핵 내의 전사인자와 DNA의 상호작용에 관한 연구 등에 힘입어 괄목할만한 성과를

를 거두었다. 그러나 세포질 내에서 특정 자극에 대한 특정 반응을 유도하는 신호전달 경로의 특이성에 관한 연구는 아직 미흡하며, 이에 대한 한 가지 실마리로 신호전달과정에 관여하는 단백질들 간의 상호작용을 조절하는 도메인인 SH2와 SH3 도메인이 관심을 끌고 있다. 이 두 도메인은 src oncogene에서 처음 발견되었으며 tyrosin kinase의 활성화와 세포 내의 cytoskeleton 결합구조에 관여하는 domain으로 알려졌다<sup>5,9,10</sup>). SH3 domain은 downstream의 signal transduction protein과 결합하여 특이한 상호작용에 관여한다고 알려졌다. SH3 domain

을 통해 downstream의 단백질과 결합하여 효소의 기질특이성과 활성도를 조절하며, cytoskeleton의 구조 조절에 관여하여 세포의 형태와 이동성에 변화를 일으킨다.

본 연구에서 SH3 fragment의 overexpression이 세포간의 adhesion이 억제되어 분화가 지연됨을 보였다. Antisense SH3 fragment로 nebulin의 기능을 억제했을 때 myoblast의 matrix adhesion의 방해로 세포가 round화 되고 cytotoxic effect를 나타내었다. Sense SH3 fragment의 효과는 endogenous nebulin과 경쟁하여 일부 기능을 방해하는 것으로 추정되며 antisense SH3 fragment는 endogenous nebulin mRNA와 결합하므로 nebulin expression을 원천적으로 억제하므로 보다 극단적인 효과가 나타나는 것으로 추정된다. 본 연구 결과는 이제까지 알려진 바와 같이 nebulin이 단순히 세포질에 있는 근절과 Z-line 구조 형성의 조절에만 관여하는 것이 아니라는 것을 암시한다. 세포의 형태 결정은 ECM과 integral protein, cytoskeleton의 상호작용에 따라 cell-cell adhesion과 cell-matrix adhesion에 의해 조절되기 때문이다. 따라서 nebulin SH3 domain은 cytoskeleton의 정상적인 organization이나 cell-cell junction에 중요한 역할을 할 것으로 예상된다.

## 참 고 문 헌

- 1) Bang ML, Mudry RE, McElhinny AS, Trombitas K, Geach AJ, Yamasaki R, Sorimachi H, Granzier H, Gregorio CC and Labeit S (2001): Myopalladin, a novel 145-kilodalton sarcomeric protein with multiple roles in Z-disc and I-band protein assemblies. *J Cell Biol*, **153(2)**: 413-427.
- 2) Bar-Sagi D, Rotin D, Batzer A, Mandiyan V and Schlessinger J (1993): SH3 domains direct cellular localization of signaling molecules. *Cell*, **74(1)**: 83-91.
- 3) Chen MJ and Wang K (1994): Conformational studies of a two-module fragment of nebulin and implications for actin association. *Arch Biochem Biophys*, **310(2)**: 310-317.
- 4) Chomczynski P (1993): A reagent for the single-step simultaneous isolation of RNA, DNA and proteins from cell and tissue samples. *Biotechniques*, **15(3)**: 532-534, 536-567.
- 5) Collett MS and Erikson RL (1978): Protein kinase activity associated with the avian sarcoma virus src gene product. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75(4)**: 2021-2024.
- 6) Davis S, Lu ML, Lo SH, Lin S, Butler JA, Druker BJ, Roberts TM, An Q and Chen LB (1991): Presence of an SH2 domain in the actin-binding protein tensin. *Science*, **252(5006)**: 712-715.
- 7) Drubin DG, Mulholland J, Zhu ZM and Botstein D (1990): Homology of a yeast actin-binding protein to signal transduction proteins and myosin-I. *Nature*, **343(6255)**: 288-290.
- 8) Egan SE and Weinberg RA (1993): The pathway to signal achievement. *Nature*, **365(6449)**: 781-783.
- 9) Egan SE, Giddings BW, Brooks MW, Buday L, Sizeland AM and Weinberg RA (1993): Association of Sos Ras exchange protein with Grb2 is implicated in tyrosine kinase signal transduction and transformation. *Nature*, **363(6424)**: 45-51.
- 10) Hanazono Y, Odai H, Sasaki K, Iwamatsu A, Yazaki Y and Hirai H (1996): Proto-oncogene products Vav and c-Cbl are involved in the signal transduction through Grb2/Ash in hematopoietic cells. *Acta Haematol*, **95(3-4)**: 236-242.
- 11) Horwitz AF (1997): Integrins and health. *Sci Am*, **276(5)**: 68-75.
- 12) Hu DH, Kimura S and Maruyama K (1986): Sodium dodecyl sulfate gel electrophoresis studies of connectin-like high molecular weight proteins of various types of vertebrate and invertebrate muscles. *J Biochem (Tokyo)*, **99(5)**: 1485-1492.
- 13) Hu DH, Kimura S and Maruyama K (1989): Huge proteins in vertebrate striated muscle. *Bioed Res*, **10**: 165-171.
- 14) Kapeller R, Prasad KV, Janssen O, Hou W, Schaffhausen BS, Rudd CE and Cantley LC (1994): Identification of two SH3-binding motifs in the regulatory subunit of phosphatidylinositol 3-kinase. *J Biol Chem*, **269(3)**: 1927-1933.
- 15) Knudsen KA, McElwee SA and Myers L (1990): A role for the neural cell adhesion molecule, NCAM, in myoblast interaction during myogenesis. *Dev Biol*, **138(1)**: 159-168.
- 16) Koch CA, Anderson D, Moran MF, Ellis C and Pawson T (1991): SH2 and SH3 domains: elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, **252(5006)**: 668-674.
- 17) 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.
- 18) Labeit S, Gibson T, Lakey A, Leonard K, Zeviani M, Knight P, Wardale J and Trinick J (1991): Evidence that nebulin is a protein-ruler in muscle thin filaments. *FEBS Lett*, **282(2)**: 313-316.
- 19) Locker RH and Wild DJ (1986): A comparative study of high molecular weight proteins in various types of muscle across the animal kingdom. *J Biochem (Tokyo)*, **99(5)**: 1473-1484.
- 20) Marcantonio EE, Guan JL, Trevithick JE and Hynes RO (1990): Mapping of the functional determinants of the integrin beta 1 cytoplasmic domain by site-directed mutagenesis. *Cell Regul*, **1(8)**: 597-604.

- 21) O'Neill MC and Stockdale FE (1972): A kinetic analysis of myogenesis in vitro. *J Cell Biol*, **52(1)**: 52-65.
- 22) Otey CA, Pavalko FM and Burridge K (1990): An interaction between alpha-actinin and the beta 1 integrin subunit in vitro. *J Cell Biol*, **111(2)**: 721-729.
- 23) Papa I, Astier C, Kwiatek O, Raynaud F, Bonnal C, Lebart MC, Roustan C and Benyamin Y (1999): Alpha actinin-CapZ, an anchoring complex for thin filaments in Z-line. *J Muscle Res Cell Motil*, **20(2)**: 187-197.
- 24) Pawson T and Scott JD (1997): Signaling through scaffold, anchoring, and adaptor proteins. *Science*, **278(5346)**: 2075-2080.
- 25) Pfuhl M, Winder SJ and Pastore A (1994): Nebulin, a helical actin binding protein. *EMBO J*, **13(8)**: 1782-1789.
- 26) Pfuhl M, Winder SJ, Castiglione Morelli MA, Labeit S and Pastore A (1996): Correlation between conformational and binding properties of nebulin repeats. *J Mol Biol*, **257(2)**: 367-384.
- 27) 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(1)**: 189-202.
- 28) Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P and Baltimore D (1993): Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*, **259(5098)**: 1157-1161.
- 29) Rickles RJ, Botfield MC, Weng Z, Taylor JA, Green OM, Brugge JS and Zoller MJ (1994): Identification of Src, Fyn, Lyn, PI3K and Abl SH3 domain ligands using phage display libraries. *EMBO J*, **13(23)**: 5598-5604.
- 30) Salgia R, Li JL, Lo SH, Brunkhorst B, Kansas GS, Sobhany ES, Sun Y, Pisick E, Hallek M and Ernst T (1995): Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by P210BCR/ABL. *J Biol Chem*, **270(10)**: 5039-5047.
- 31) Squire JM (1997): Architecture and function in the muscle sarcomere. *Curr Opin Struct Biol*, **7(2)**: 247-257.
- 32) Trinick J (1994): Titin and nebulin: protein rulers in muscle? *Trends Biochem Sci*, **19(10)**: 405-409.
- 33) Wang K and Williamson C (1980): Identification of a N2 line protein of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77**: 3254-3258.
- 34) Wang K and Wright J (1988): Architecture of the sarcomere matrix of skeletal muscle: immunoelectron microscopic evidence that suggests a set of parallel inextensible nebulin filaments anchored at the Z line. *J Cell Biol*, **107(6 Pt 1)**: 2199-2212.
- 35) Wasenius VM, Saraste M, Salven P, Eramaa M, Holm L and Lehto VP (1989): Primary structure of the brain alpha-spectrin. *J Cell Biol*, **108(1)**: 79-93.
- 36) Weng Z, Thomas SM, Rickles RJ, Taylor JA, Brauer AW, Seidel-Dugan C, Michael WM, Dreyfuss G and Brugge JS (1994): Identification of Src, Fyn, and Lyn SH3-binding proteins: implications for a function of SH3 domains. *Mol Cell Biol*, **14(7)**: 4509-4521.
- 37) White JM and Blobel CP (1989): Cell-to-cell fusion. *Curr Opin Cell Biol*, **1(5)**: 934-939.
- 38) Wu H, Reynolds AB, Kanner SB, Vines RR and Parsons JT (1991): Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated pp60src substrate. *Mol Cell Biol*, **11(10)**: 5113-5124.
- 39) Young P, Ferguson C, Banuelos S and Gautel M (1998): Molecular structure of the sarcomeric Z-disk: two types of titin interactions lead to an asymmetrical sorting of alpha-actinin. *EMBO J*, **17**: 1614-1624.