대한의생명과학회지 : 제6권 제3호 2000
Korean J. Biomed. Lab. Sci
Vol. 6, No. 3, p.171~179, September, 2000

닭 조직에 따른 Nebulin Isoform 단백질의 특이적 발현

인제대학교 임상병리학과

김 영 희 · 김 정 락†

국문초록: 대부분 척추동물에서 골격근 내 filament들의 길이 조절은 근 수축 기작의 구조를 이해하는데 중요한 단서가 된다. Nebulin은 thin filament의 전체에 걸쳐있는 거대한 단백질로 골격근에만 특이적으로 존재하는 것으로 알려져 왔다. 본 연구에서는 닭의 근육과 비근육 조직에서 nebulin isoform 단백질들을 확인하기 위하여 전기영동과 immunoblot의 방법을 이용하였다. 각 조직의 단백질들은 soluble과 insoluble fraction으로 분리 준비하였다. 실험결과, 닭의 근육과 비근육 조직들에서 조직 특이성을 나타내는 다양한 nebulin isoform 단백질들이 확인되었다. Nebulin은 성계의 골격근에서 500 kDa 정도의 크기로 나타났고, nebulett은 계배와 성계의 심장근에서 107 kDa 정도로 발현되었다. 그리고 계배의 비근육 조직인 뇌에서 380 kDa 정도의 거대 단백질이 확인되었다. 이 단백질은 뇌 조직의 soluble fraction에서 인지되었다. Nebulin isoform 단백질들이 서로 다른 조직에서 발현되는 양상을 보아 서로 다른 독자적인 기능을 가질 것으로 추정된다.

중심 단어: Nebulin isoform, 조직 특이성

서 론

근세포의 분화에 대한 다각적인 연구를 통해 세포막 표면 단백질의 중요성이 인식되었다. 세포막을 이루고 있는 표면 단백질은 인지질에서 분리하는 과정에서 자연상태의 구조가 변형되어 기능을 잃거나 다른 소수성 단백질들과 aggregation이 일어나기 쉬우므로 순수 분리가 매우 곤란하다. 이러한 난점을 해결하기 위해 세포막의 구조와 기능을 연구하는데 단일클론항체가 이용되었다.

단일클론항체를 이용한 표면 단백질의 연구로 근원세포에서 CSAT[29], Thy-1[45], C3-1[41], N-CAM[6], 24.1D5[12], integrinα7[37] 등의 항원이 발견되었고, EGF 수용체와 insulin 수용체의 분리가 가능해져 이들 단백질의 아미노산 서열이 밝혀졌다.

박수정 등[31]은 근원세포를 48시간 배양하여 마우스 (BALB/c)에 면역시켜 hybridoma를 생산한 후 세포융합을 억제하는 단일클론항체를 찾아내었다. 이를 '단일클론항체 3H35'라 명명하였다.

또한 이영주 등[2,3]은 계배의 근세포분화와 연관된 표면 단백질 유전자를 찾기 위하여 단일클론항체 3H35로 닭의 골격근 cDNA library에서 immunoscreening 검색결과 인지된 클론을 'Q1'이라 명명하였다. Q1의 아미노산 분석결과 31개 아미노산의 반복 module과 C-말단에 SH3 도메인을 가지고 있는 새로운 유전자로 밝혀졌다. Q1을 탐침으로 닭의 골격근 cDNA library를 재차 검색하여 크기가 다양한 isoform들을 발견하였고 (Fig. 1), 이들의 아미노산과 DNA 염기 서열을 분석한 결과 이들이 근육 단백질인 nebulin과 상동성이 매우 높은 nebulin isoform들임을 확인하였다[1].

Nebulin은 골격근에만 존재하는 것으로 알려진 거대 단백질로서 근섬유 단백질의 2~3%를 차지하며[5,42] 종, 발생시기 그리고 골격근의 위치에 따라 크기가 600~900 kDa으로 다양하게 나타난다[16,27,43]. Nebulin은 여러 조직의 근절의 길이와 액틴 필라멘트의 길이에 비례하므로 이것이 액틴과 결합하는 것으로 알려져 있다[21,23,40,43]. Nebulin은 super repeat, SH3 도메인, simple repeat의 특징적 구조를 취하고 있으며, super repeat에서 나타나는 다양한 길이의 isoform

*논 문 접 수: 2000년 8월 16일
수정재접수: 2000년 9월 22일
†별책 요청 저자: 김정락
본 논문은 1999 년도 인제대학교 학술연구조성비 보조에 의한 것임.

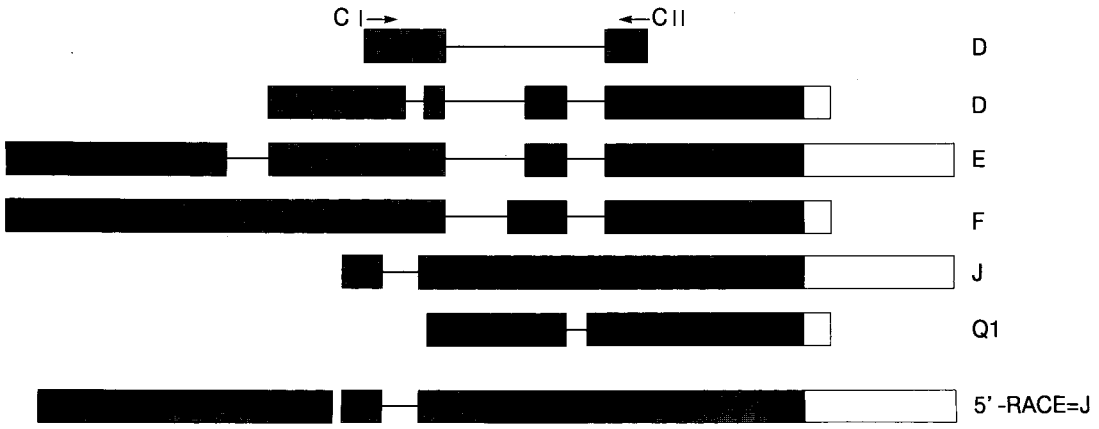

Fig. 1. Schematic diagram of the chicken nebulin isoforms in simple repeat. Chicken nebulin isoform contains simple repeat and SH3 domain

들이 척추동물의 골격근의 발생시기와 근육 조직에 따라 나타나고 있다[13,32,38].

김지희 등[1,2]이 닭과 사람의 다양한 nebulin isoform들을 확인하기 위하여 근육과 비근육 조직에서 다양한 실험을 실시한 결과 닭의 nebulin isoform 6종과 사람의 nebulin isoform 5종을 새로이 발견하여 최초로 비근육 조직에도 nebulin과 같이 31-residue module을 가진 isoform이 존재한다는 사실을 알아내었다.

본 연구에서는 김지희 등[1,2]이 mRNA, genomec DNA를 분석한 nebulin isoform들을 바탕으로 하여 이들의 단백질 발현을 확인해 보고자 닭의 근육 조직인 골격근, 심장근, 내장근과 비근육 조직인 뇌, 간 조직을 비교하였다. 이들 각 조직들을 준비하는 과정에서 soluble fraction과 insoluble fraction으로 구분하여 실험에 이용하였으며, 각 단백질 발현 양상은 전기영동과 immunoblot 분석으로 확인하였다. 전기영동은 Laemmli 방법[25]과 nebulin과 같이 거대한 단백질들을 분석하기 위해 Fairbank 방법[4,34]을 이용하였으며, immunoblot 분석[22]에는 anti-isoform F 항체와 anti-nebulin 항체 (Sigma. N-9891)를 사용하였다.

재료 및 방법

1. Anti-isoform F 항체 제작과 anti-nebulin 항체 준비

김태영 등은 다양한 nebulin isoform들 중 nebulin과 상동성이 가장 높은 F type을 pGEX-4T-3 (Pharmacia Biotech)에 클로닝하여 JM109에서 발현시켰다[2]. 발현된 단백질을 전기영동한 후 분리한 겔을 분쇄하여 생후 6~8주된 마우스 (BALB/c)의 복강에 주사하여 복합클론 anti-isoform F 항체를 제작하였다. 단일클론 anti-nebulin 항체 (Sigma. N-9891)는 상품화된 것을 구입하였다.

2. 단백질 준비

계배의 골격근, 심장근, 내장근, 뇌, 간 조직을 각각 1 g을 1 mM EDTA와 10 μM leupeptin, 0.2 mM PMSF, 1% Triton X-100을 첨가한 PBS 완충 용액 (pH 7.6)으로 균질화하고 100,000×g로 60분간 4℃에서 원심분리하였다.

상층액 (A, soluble fraction)와 침전물을 분리하고, 침전물에 2% SDS와 5% mercaptoethanol, 10% glycerol을 첨가한 150 mM Tris-HCl 완충 용액 (pH 6.8)을 가하여 균질화하고, 수분간 sonication한 후 10,000×g로 20분간 4℃에서 원심분리하여, 상층액 (B, insoluble fraction)만을 분리하였다.

3. 단백질 정량과 전기영동

가용화한 조직의 단백질들은 bicinchoninic acid (BCA) 방법[33]을 이용하여 정량하였다. Laemmli의 방법은 10% acrylamide gel을 이용하였고, 거대 단백질을 분리하기 위한 Fairbank의 방법[4,34]은 2% acrylamide와 0.5% agarose를 혼합한 겔을 이용하였다.

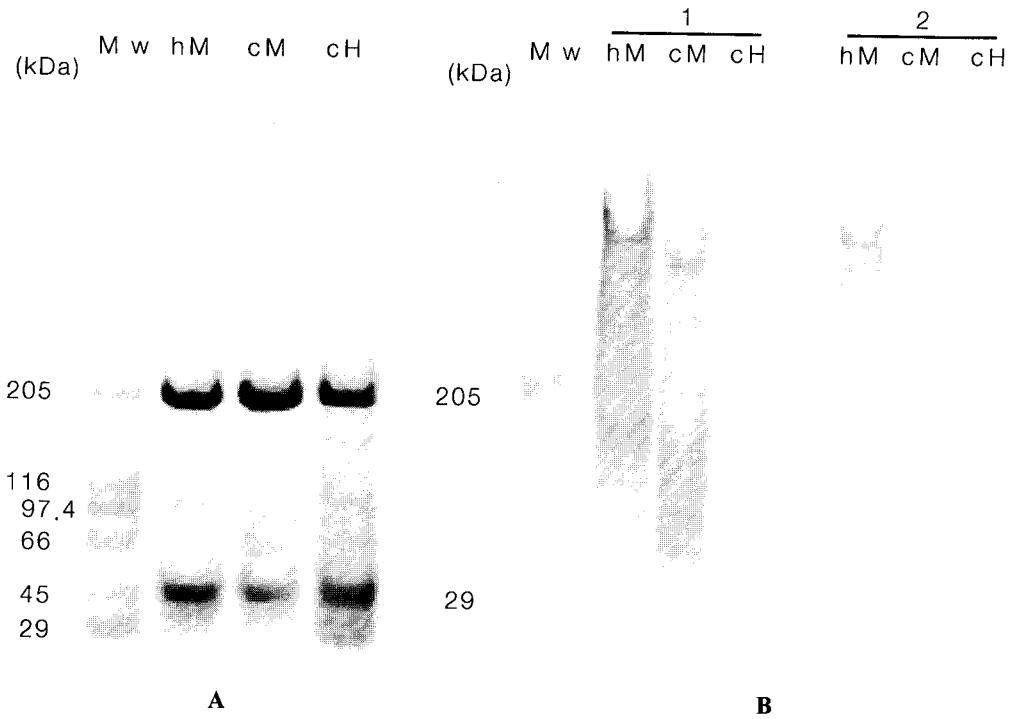

Fig. 2. Detection of nebulin-related proteins with anti-isoform F antibody and anti-nebulin atibody. **(A)** Coomassie Blue-stained SDS-PAGE according to Fairbank's system. **(B)** Immunoblot analysis using anti-isoform F and anti-nebulin antibody. Lane 1 were probed with anti-isoform F antibody, lane 2 were probed with anti-nebulin antibody. Mw, protein high marker; hM, human skeletal muscle; cM, chicken adult skeletal muscle; cH, chicken adult cardiac muscle (heart).

4. Immunoblot 분석

Laemmli와 Fairbank 두 가지 방법으로 전기영동을 시행한 겔은 Kyhse-Anderson의 방법[22]에 따라 immunoblot하여 분석하였다. Alkaline phosphatase conjugate anti-mouse IgG (Sigma, S-3562, 1 mg/ml)를 결합시키고, bromochloroindolyl phosphate (BCIP)와 nitro blue tetrazolium (NBT)를 기질로 발색하였다.

결 과

1. Anti-isoform F 항체와 anti-nebulin 항체를 이용한 단백질 발현 비교

발현 벡터인 pGEX-4T-3 (Pharmacia Biotech)에 simple repeat과 SH3 도메인을 가지고 있는 isoform F의 subfragment를 클로닝하여 만든 복합클론 anti-isoform F 항체와 nebulin의 super repeat에 대한 epitope를 가지고 있는 단일클론항체로 사람의 골격근과 성계의 골격근, 성계의 심장근을 이용해 Fairbank 방법의 전기영동을 실시하고, 각각 immunoblot를 실시했다 (Fig. 2). 그 결과 anti-nebulin 항체는 닭과 사람의 골격근에서 nebulin만을 인지하였고, 심장근에서는 아무런 단백질도 인지하지 않았다. anti-isoform F 항체는 골격근에서 nebulin을 인지했을 뿐만 아니라, 200 kDa 정도의 알려지지 않은 단백질과 심장근에서 107 kDa의 nebulett을 인지하였다.

2. 계배의 단백질 발현 양상

Laemmli 방법으로 anti-isoform F 항체를 이용한 계배의 immunoblot 실험 결과 soluble fraction에서는 골격근, 심장근, 내장근, 뇌, 간 조직에서 45 kDa의 단백질이 공통으로 인지되었다 (Fig. 3). Insoluble fraction에서는 역시 45 kDa의 단백질이 공통적으로 인지되었고, 그 외 골격근에서 205, 170, 150, 140, 120, 110, 37 kDa 등 매우 다양한 단백질들이 인지되었으며, 심장근에서는 107 kDa의 nebulett이 강하게 나타났다 (Fig. 4).

Laemmli 방법으로 확인하기 곤란한 거대 단백질

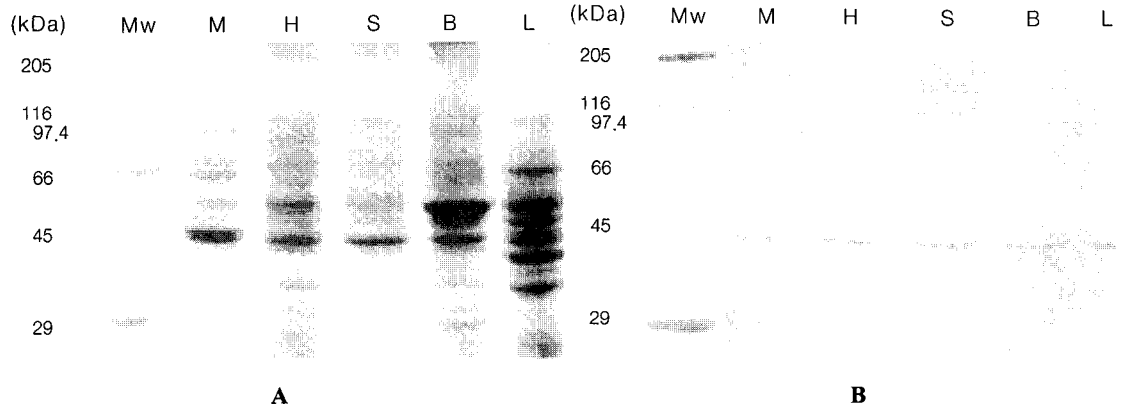

Fig. 3. Tissue distribution of nebulin isoform proteins from solube fraction of chicken embryo analyzed by SDS-PAGE according to Laemmli's system and immunoblot. **(A)** Coomassie Blue-stained SDS-PAGE according to Laemmli's system. **(B)** Immunoblot analysis using anti-isoform F antibody. Mw, protein high marker; M, muscle; H, heart; S, stomarch; B, brain; L, liver.

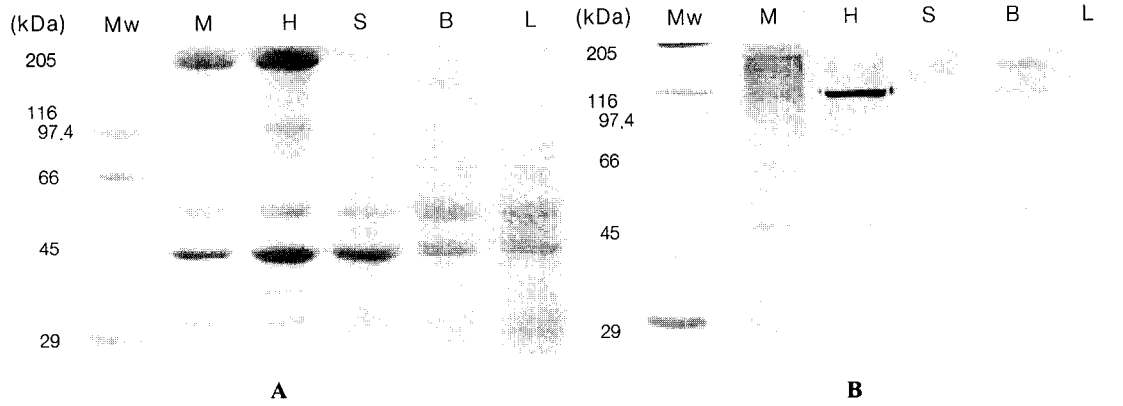

Fig. 4. Tissue distribution of nebulin isoform proteins from insolube fraction of chicken embryo analyzed by SDS-PAGE according to Laemmli's system and immunoblot. **(A)** Coomassie Blue-stained SDS-PAGE according to Laemmli's system. **(B)** Immunoblot analysis using anti-isoform F antibody. Mw, protein high marker; M, muscle; H, heart; S, stomarch; B, brain; L, liver.

들의 분리를 위하여 Fairbank 방법을 실시한 immunoblot 실험 결과 soluble fraction 상에서 특이하게도 비근육 조직인 뇌에서만 380 kDa의 거대 단백질이 인지되었다 (Fig. 5).

Insoluble fraction 상에서는 골격근에서의 205, 128 kDa과 심장근에서의 205 kDa의 단백질과 107 kDa의 nebulett이 인지되었고, 내장근에서는 205 kDa의 단백질이 나타났다 (Fig. 6).

고 찰

김지회 등[1]에 의해 근육에서 처음으로 발견된 nebulin isoform들은 여러 조직에서 다양한 형태로 존재하며 simple repeat에서는 차이를 보이지만, 모두 공통적으로 SH3 도메인을 가지고 있었다. 또한, 이들이 다른 단백질에도 진화 과정에서 유사하게 보존되어 있는 것으로 보아 이들의 기능이 근육의 분화 조절에만 한정된 것이 아니라 일반적인 세포 증식과 분화에 관련된 중요한 역할을 할 수 있으리라 추정되었다[14,24,29,47]. 지금까지 연구된 바에 따르면 SH3 도메인과 결합하는 단백질이 세포 골격에 관여하는 paxillin[35]과 3BP1, 3BP2[5], guanine nucleotide exchange protein (SOS)[8,17,26], Ras GTPase-activating protein (GAP)[19], marcrophage에서의 C-cbl 등으로 알려져 있으며, 이

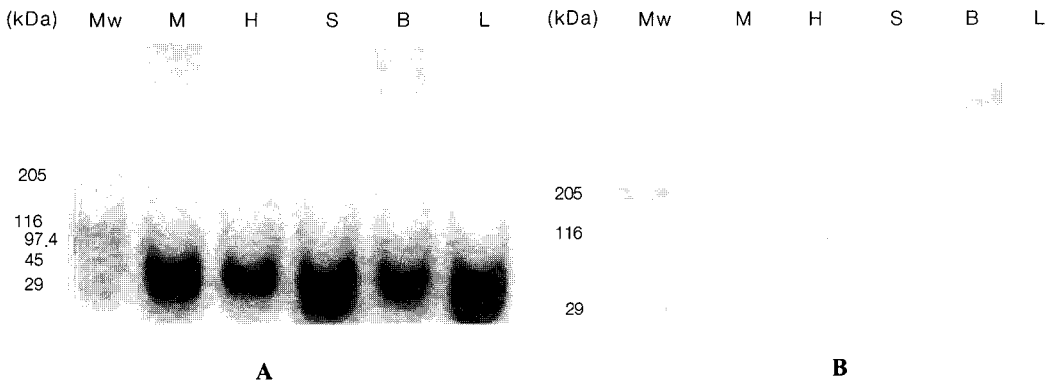

Fig. 5. Tissue distribution of nebulin isoform proteins from solube fraction of chicken embryo analyzed by SDS-PAGE according to Fairbank's system and immunoblot. **(A)** Coomassie Blue-stained SDS-PAGE according to Fairbank's system. **(B)** Immunoblot analysis using anti-isoform F antibody. Mw, protein high marker; M, muscle; H, heart; S, stomarch; B, brain; L, liver.

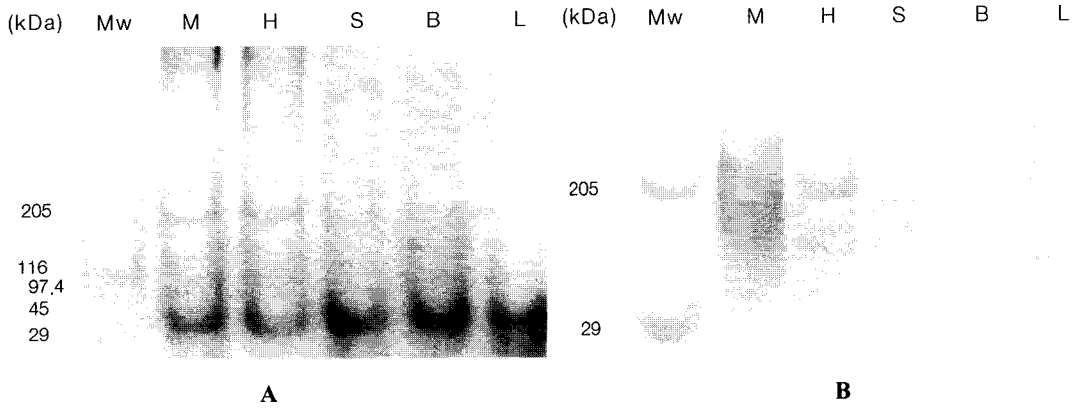

Fig. 6. Tissue distribution of nebulin isoform proteins from insolube fraction of chicken embryo analyzed by SDS-PAGE according to Fairbank's system and immunoblot. **(A)** Coomassie Blue-stained SDS-PAGE according to Fairbank's system. **(B)** Immunoblot analysis using anti-isoform F antibody. Mw, protein high marker; M, muscle; H, heart; S, stomarch; B, brain; L, liver.

들 단백질들은 프롤린이 풍부한 지역을 가지고 있어 이 지역이 SH3 도메인의 결합 부위로 작용한다고 밝혀졌고, 이들 가운데 상당수가 focal adhesion에 관여하는 단백질임이 증명되었다[18,30]. 이미 조사한 nebulin에서 특징적으로 나타나는 반복 module의 양상 역시 focal adhesion 단백질인 p80/85 (37-residue module)[46]와 ankyrin (33-residue module), spectrin (106-residue module)[44], cadherin family 단백질 등에서 흔히 나타나는 것으로 조사되었다.

최근의 연구에서 nebulin과 유사한 단백질인 nebulett와 nebulin-related protein (N-RAP)가 알려지고 사람 nebulett의 전체 cDNA 염기 서열이 분석되었다[10,39]. Nebulett의 open reading frame (3,044 bp)은 109 kDa의 단백질을 발현한다. Nebulett은 nebulin과 함께 C-말단 지역내의 반복 구간이 조직 특이성과 발생 단계에 의존적인 성질을 조절한다고 알려지고 있으며 nebulett은 nebulin C-말단의 100 kDa과 매우 연관성이 높은 도메인 구조를 취하고 있으며, 이 두 단백질의 염기 서열 분석 결과 C-말단에 85%나 상동성을 나타내는 SH3 도메인을 가진다. 또한 N-말단에서 nebulett과 nebulin의 폴리펩타이드는 35-residue의 반복과 잠재적 인산화 지역을 지닌 세린이 풍부한 도메인을 나타낸다.

Focal adhesion 단백질은 세포의 형태와 성장 그

리고 분화와 연관되어 세포와 세포간의 접촉이 일어나는 부위에 위치하는 단백질들로 세포 외 기질(ECM)과 세포 골격, 또는 이들을 서로 연결하는 세포막 사이의 단백질로 세 가지 공간적 위치를 차지하고 있다. 또한 이에 관여하는 ECM으로 fibronectin, collagen 등이 알려져 있으며 세포 골격으로는 구조 단백질인 actin, α-actinin, dystrophin, talin, vinculin, 58 kDa 등의 단백질이 있다[7,20,36]. N-RAP는 최근 골격근내의 C-말단의 절반이 nebulin과 상동적 염기 서열을 지닌 myotendon junction과 심장근 내의 intercalated disks에 밀집한 근 특이 단백질로 밝혀졌으며, sarcolemma를 받치고 있는 단백질 복합체에 myofibril의 말단의 액틴 필라멘트를 연결하는 기능을 수행하리라 추정되고, myofibrillar actin filaments와 세포막을 연결하며, myotendon junction에 집중되어 있는 talin과 vinculin과 함께 구조를 이룰 것으로 추정되었다[10,11].

본 연구에 이용한 복합클론 항체인 anti-isoform F 항체는 단일클론항체 anti-nebulin 항체와 비교한 결과, 단일클론 anti-nebulin 항체가 nebulin의 super repeat 지역을 가지고 있는 골격근의 nebulin만을 인지하는 반면, anti-isoform F 항체는 nebulin (500 kDa) 외에도 simple repeat 지역을 가지고 있는 nebulett (107 kDa)과 알려지지 않은 단백질 (200 kDa)을 인지하는 것을 알 수 있었다. 이제까지의 mRNA와 genomic DNA에서 분석한 바와 마찬가지로 nebulin isoform의 단백질 발현도 역시 다양하게 나타났으며, 발현된 다양한 단백질 중 가장 signal이 강한 것은 심장근에서 나타난 nebulett (107 kDa)이었다. 특히 비근육 조직인 뇌에서 나타난 380 kDa의 거대 단백질이 가장 주목할 만한 결과였고, 이것은 다른 비근육 조직상에서의 nebulin isoform들과 함께 이들의 기능이 골격근 조절에만 국한된 것이 아님을 짐작하게 한다.

본 실험의 결과에서와 같이 다양한 조직에서의 nebulin isoform 단백질의 발현은 이들 기능이 골격근의 근절 조절에만 한정된 것이 아니라 조직에 따라 세포 분열을 조절하는 신호 전달에 관여하거나 세포내 골격 구조 조절에 관여하는 focal adhesion 단백질로 작용할 수 있음을 시사해 주며 이상의 단백질들과 함께 ECM의 기능과 신호 전달 과정에서의 세포 골격 조절 과정을 설명할 수 있을 것으로 기대된다.

참 고 문 헌

1) 김지희 (1999): 비근육 조직에서의 새로운 네뷸린 isoform의 확인. 인제대학교 석사 학위 논문.
2) 김태영 (1997): 골격근 세포 분화와 관련된 myofusin isoform들의 발견과 조직 특이성. 인제대학교 석사 학위 논문.
3) 이영주 (1995): 근원 세포 융합과 관련된 표면 단백질의 유전자에 관한 연구. 인제대학교 석사 학위 논문.
4) Akihito H, Tatsuo I, Ryuichi T and Koui T (1995): Canges in the molecular types of connectin and nebulin during development of chicken skeletal muscle. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1244:** 179-184.
5) Cicchetti P, Ridley AJ and Zheng Y (1995): 3BP-1, and SH3 domain binding protein, has GAP activity for Rac and inhibits growth factor-induced membrane ruffling in fibroblasts. *EMBO J*, **14:** 3127-3135.
6) Covault J, Merlie JP, Goridis C and Sanes JR (1986): Molecular forms of N-CAM and its RNA in developing and denervated skeletal muscle. *J Cell Biol*, **102:** 731-739.
7) 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*, **25:** 159-160.
8) 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 tyrosin kinase signal transduction and transformation. *Nature*, **363:** 45-51.
9) Froehner SC, Murnane AA, Tobler M, Peng HB and Sealock R (1987): A postsynaptic Mr 58,000 (58 K) protein concentrated at acetylcholine receptor rich sites in Torpedo electroplaqes and skeletal muscle. *J Cell Biol*, **104:** 1633-1646.
10) Luo G, Zhang JQ, Tuyet-Phuong N, Herrena AH, Paterson B and Horowits R (1997): Complete cDNA Sequence and Tissue Localization of N-RAP, a Novel Nebulin-Related Protein of Striated Muscle. *Cell Motility and the Cytoskeleton*, **38:** 75-90.
11) Luo G, Herrera AH and Horowits R (1999): Molecular Interactions of N-RAP, a Nebulin-Related Pro-

tein of Striated Muscle Myotendon Junctions and Intercalated Disks. *Biochem*, **38:** 6135-6143.

12) Gower HJ, Moore SE, Dickson G, Elsom VL, Nayak R and Walsh FS (1989): Cloning and characterization of a myoblast cell surface antigen defined by 24.1D5 monoclonal antibod. *Development*, **105:** 723-731.

13) Holmes KC, Popp D, Gebhard W and Kabsch W (1990): Atomic model of the actin filament. *Nature (London)*, **347:** 44-49.

14) Horowits R, Luo G, Zhang JQ and Herrera AH (1996): Nebulin and nebulin-related proteins in striated muscle. *Adv Biophys*, **33:** 143-150.

15) Hu DH, Kimura S and Maruyama K (1989): Huge proteins in vertebrate striated muscle. *Bioed Res*, **10:** 165-171.

16) Hu DH, Kimura S and Maruyama K (1986): Sodium dodecyl sulfate gel electrophoretic studies of connectin-like high molecular weight proteins of various type of vertebrate and invertebrate muscle. *J Biochem (Tokyo)*, **99:** 1485-1492.

17) Hu Q, Milfay D and Williams LT (1995): Binding of NCK to SOS and Activation of ras-dependent gene expression. *Mol and Cell Biol*, **15:** 1169-1174.

18) Knudsen BS, Zheng J and Feller SM (1995): Affinity and specificity requirements for the first Src homology 3 domain of the CRK proteins. *EMBO J*, **10:** 2191-2199.

19) Koch CA, Anderson D and Moran MF (1991): SH2 and SH3 domains: Elements that control interactions of cytoplasmic signaling proteins. *Science*, **25:** 668-674.

20) Kramarcy NR and Sealock R (1990): Dystrophin as a focal adhesion protein. *FEBS Letts*, **274:** 171-174.

21) 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:** 97-107.

22) Kyhse-Anderson J (1997): Protein transfer gels to membrane-semidry method. *Biochem Biophys Methods*, **10:** 203.

23) Labeit S, Gibson T, Lakey A, Leonard K, Zevian M, Knight P, Wardale J and Trinick J (1991): Evidence that nebulin is a protein-luler in muscle thin filaments. *FEBS Lett*, **282:** 313-316.

24) 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.

25) Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bateriophage T4. *Nature*, **227:** 680-685.

26) Li I, Chambard JC and Karin M (1992): Fos and Jun repress transcriptional activation by Myogenin and MyoD: the amino terminus of Jun can mediate repression. *Genes Dev*, **6:** 676-689.

27) Locker RH and Wild DJC (1986): A comparative study of high molecular weight proteins in various types of muscle across the animal kingdom. *J Biochem (Tokyo)*, **99:** 1473-1484.

28) Luo G, Zhang JQ, Nguyen TP, Nguyen T-P, Herrera AH, Paterson B and Horrowits R (1997): Complete cDNA sequence and tissue localizaion of N-RAP, a novel nebulin-related protein of striated muscle. *Cell Motil Cytoskeleton*, **38:** 75-90.

29) Neff NT, Lowry C and Decker C (1982): A monoclonal antibody detaches embryonic skeletal muscle from extracellular matrices. *J Cell Biol*, **95:** 654-666.

30) Odai H, Sasaki K, Iwamatsu A, Hanazono Y, Tanaka T, Mitani K, Yazaki Y and Hirai H (1995): The proto-oncogene product c-Cbl becomes tyrosine phosphorylated by stimulation with GM-CSF or Epo and constitutively binds to the SH3 domain of Grb2/Ash in human hematopoietic cells. *J Biol Chem*, **270:** 10800-10805.

31) Park SJ, Lee YJ, Park HG and Kim C-R (1995): A new gene of protein related to myoblast fusion detected by monoclonal antibody. *Korean J Zool*, **38:** 48-54.

32) Pfuhl M, Winder SJ and Pastore A (1994): Nebulin, a helical actin binding protein. *EMBO J*, **13:** 1782-1789.

33) Smith PK, Krohn RI and Hermanson GT (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analy*, **150:** 76-85.

34) Ryuichi T and Akihito H (1995): Detection of giant myofibrillar proteins connectin and nebulin by electrophoresis in 2% polyacrylamide slab gels strengthened with agarose. *Anal Biochem*, **224:** 28-31.

35) Salgia R, Le JL, Lo SH, Brunkhorst B, Kansas GS,

Sobhany ES, Sun Y, Pisick E, Hallek M, Ernst T, Tantravahi R, Chen LB and Griffin JD (1995): Molecular cloning of human paxillin, a focal adhesion protein phosphorylated by $p210^{BCR/ABL}$. *J Biol Chem*, **270:** 5039-5047.

36) Sealock R, Butler MH and Kramarcy NR (1991): Localization of Dystrophin relative to acetylcholine receptor domains in electric tissue and adult and cultured skeletal muscle. *J Cell Biol*, **113:** 1133-1144.

37) Song WK, Wang W and Foster RF (1992): H36-α7 is a nobel integrin alpha chain that is developmenttally regulated during skeletal myogenesis. *J Cell Biol*, **117:** 643-657.

38) Squire J (1981): The structural basis of muscle contraction. Plenum Press, New York.

39) Stefania M, Karoly T, Bernhard K, Sawa K, Jutta S, Katarina P, Henk G and Labeit S (1998): Characterization of Nebullet and Nebulin and Emerging Concepts of Their Roles for Vertebrate-Discs. *J Mol Biol*, **282:** 111-123.

40) Trinick J (1994): Titin and nebulin protein-rulers in muscle? *Trends Biochem Sci*, **19**: 405-409.

41) Wakshull E and Bayne EK (1983): Characterization of a plasma membrane glycoprotein common to myoblasts, skeletal muscle satellite cells, and glia. *Dev Biol*, **100:** 464-477.

42) Wang K and Williamson C (1980): Identification of a N2 line protein of striated muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, **77:** 3254-3258.

43) 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:** 2199-2212.

44) 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:** 79-93.

45) Williams AF and Gagnon J (1982): Neuronal cell thy-1 glycoprotein: Homology with immunoglobulin. *Science*, **216:** 696-703.

46) Wu H, Reynolds AB, Kanner SB, Vines RR and Parsons JT (1991): Identification and characterization of a novel cytoskeleton-associated $pp60^{src}$ substrate. *Mole and Cellular Biol*, **11:** 5113-5124.

47) Zhang JQ, Luo G, Herrera AH, Paterson B and Horiwits R (1996): cDNA cloning of mouse nebulin, evidence that the nebulin-coding sequence is highly conserved among vertebrates. *Eur J Biochem*, **239:** 835-841.

=Abstract=

Tissue-Specific Expression of Nebulin Isoform Proteins in Chicken

Young-Hee Kim and Chong-Rak Kim†

Department of Medical Laboratory Science, Inje University

The lengths of thick and thin filaments in the sarcomeres of most vertebrate skeletal muscles are precisely regulated and are important structural parameters in understanding muscle contraction. Nebulin is a usually large protein that spans the whole length of thin filaments in the sarcomeres of skeletal muscles. In this paper we used SDS-PAGE and immunoblot to identify nebulin isoform proteins in muscle and non-muscle tissues. We prepared embryonic chicken tissues including skeletal muscle, cardiac muscle, smooth muscle, brain, liver to compare nebulin isoform proteins. The proteins were divided into soluble and insoluble fraction. As a result, we identified tissue specific expression of various nebulin isoform proteins in muscle and non-muscle tissues of chicken. Nebulin was detected in skeletal muscle of adult chicken about 500 kDa. Nebulett was expressed in cardiac muscle of embryonic and adult chicken about 107 kDa. A giant protein with molecular mass of about 380 kDa was identified in brain of non-muscle of chicken. This giant protein was detected in the soluble fraction of chicken embryo. The unequal distribution of the nebulin isoform proteins suggests tissue specific regulation of the isoform expression and indicates a functional specialization of the encoded isoform subtypes.

Key Words: Nebulin isoform, Tissue-Specific expression

[Korean J. Biomed. Lab. Sci., 6(3): 171-179, September, 2000]

†Corresponding author