

## Ізолювання, аналіз експресії та хромосомне картування нового гена кінази людини MLK4

С. М. Кваша<sup>1, 2</sup>, А. І. Протопопов<sup>2, 3</sup>, Е. Р. Забаровський<sup>2, 3, 4</sup>,  
А. В. Риндич<sup>1</sup>, В. І. Кашуба<sup>1, 2, 3</sup>

<sup>1</sup> Інститут молекулярної біології і генетики НАН України  
Вул. Академіка Заболотного, 150, Київ, 03143, Україна

<sup>2</sup> Центр геномних досліджень, Каролінський інститут  
Стокгольм, 171 77, Швеція

<sup>3</sup> Мікробіологічний та пухлинний центр, Каролінський інститут  
Стокгольм, 171 77, Швеція

<sup>4</sup> Інститут молекулярної біології ім. В. А. Енгельгардта  
Вул. Вавілова, 32, Москва, 117984, Росія

---

*Ідентифіковано новий ген людини MLK4. Отримано дві альтернативні форми сплайсингу цього гена, MLK4 $\alpha$  та MLK4 $\beta$ . Експресію гена виявлено в підшлунковій залозі, нирках, печінці, легенях, мозку, серці та плаценті. Ген картовано до хромосомної ділянки 1q42. Аналіз виведеної амінокислотної послідовності MLK4 виявив високий рівень гомології до представників родини MLK, які відіграють значну роль у шляхах сигнальної трансдукції.*

---

Вступ. Еукаріотичні клітини використовують різноманітні сигнальні шляхи для відповіді на зміни в зовнішньому середовищі. Серед них особливе місце займають шляхи, у реалізації яких беруть участь кінази, що належать до родини MAPK (mitogen-activated protein kinases). Шляхи сигнальної трансдукції у клітинах ссавців складаються з MAPK (mitogen-activated protein kinases), MAPKK (mitogen-activated protein kinase kinase) та MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) [1]. Передача сигналу досягається за допомогою послідовного фосфорилування та активації компонентів цих шляхів [2]. Для ссавців відомо щонайменше три незалежних шляхи сигнальної трансдукції, які включають ERK (extracellular signal-regulated kinase), JNK/SAPK (c-Jun N-terminal kinase/stress activated protein kinases) та p38. Шлях ERK регулює клітинну проліферацію, клітинну диференціацію та процеси розвитку [3]. Шляхи JNK/SAPK і p38 регулюють відповідь клітин на стрес та апоптоз [4].

Члени родини MLK (mixed lineage kinase) беруть участь в активації шляхів сигнальної трансдукції. Головною характерною ознакою представників цієї родини є те, що каталітичному домену білків, які відповідають цим генам, притаманні властивості серин/треонінових і тирозінових кіназ, тобто ці кінази здатні фосфорилувати і тирозин, і треонін субстратного протеїну. На додаток, члени родини MLK, як правило, мають у своєму складі N-термінальний домен SH3 (за винятком DLK та LZK), домен DLZ, основний домен та мотив CRIB (за винятком DLK та LZK). У родині MLK виділено дві підродини. До першої належать MLK1, MLK2 та MLK3. Представники цієї підродини містять консервативний кіназний каталітичний домен з більш ніж 70 % ідентичності. До другої підродини відносять DLK та LZK. Представники її містять дуже консервативний кіназний каталітичний домен з ідентичністю, більшою за 90 %. Рівень гомології між кіназними каталітичними доменами DLK, LZK та MLK1, MLK2, MLK3 досягає лише 36 %.

Було показано, що всі перевірені члени родини MLK (MLK2, MLK3, DLK, LZK) функціонують як MAPKKK. Так, LZK активує шлях JNK/SAPK [5],

DLK та MLK3 активують шляхи JNK/SAPK та p38 [6,7], MLK2 активує шляхи JNK/SAPK, ERK та p38 [8].

Мета цієї роботи полягала в ідентифікації нового гена MLK4, визначенні рівня його експресії в різних тканинах та хромосомної локалізації.

**Матеріали і методи.** Створення *NotI*-«зв'язуючих» бібліотек. Для створення бібліотек *NotI*-«зв'язуючих» клонів геному ДНК з клітинної лінії CBMI-Ral-Sto було рестриковано за допомогою *BamHI* та лігвано саму на себе за допомогою T4-ДНК-лігази при низькій концентрації ДНК. Для елімінації нелігованих лінійних молекул «липкі» кінці було частково добудовано за допомогою фрагмента Кльонова ДНК-полімерази I у присутності лише аденіну та гуаніну.

Далі ДНК було рестриковано за допомогою *NotI* і лігвано з векторами  $\lambda$ SK17 та  $\lambda$ SK22. Щоб перетворити бібліотеку в плазмідну форму,  $\lambda$ ДНК було рестриковано за допомогою *Sall*, лігвано саму на себе та трансформовано в DK1 клітини *Escherichia coli* [9].

Ферменти, які були застосовані для створення бібліотеки, отримано від фірми «Boehringer» (Німеччина). Всі молекулярно-біологічні та мікробіологічні методи було використано, як описано в роботі [10].

**Молекулярне клонування гена MLK4 людини.** Для ампліфікації фрагмента гена MLK4 (630—1734 п. н.) з серцевого пула кДНК (набір реактивів «Marathon ready cDNA» («Clontech», США)) було застосовано праймери КІНБ (5'-GCTGGAGCTG-AAGGAGCTCATCG-3') та КІНС (5'-GGGCTTC-TCTGGTTTAGCTGGAA-3').

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) було виконано з 2,5 мкл кДНК з набору реактивів «Marathon ready cDNA» («Clontech»), 3 мкл буфера 3 з набору реактивів «Expand long template PCR system» («Boehringer»), 3 мкл 2 мМ dNTP, 1 мкл кожного з 10 мМ праймерів та 0,5 мкл Long polymerase з набору реактивів «Expand long template PCR system» («Boehringer») у 50 мкл. Цикли ПЛР були наступними: 40 циклів з 30-с денатурацією при температурі 95 °C та 4-хв елонгацією при 68 °C. ПЛР розпочинали з денатурації протягом 2 хв при 95 °C. В усіх експериментах було використано машину ПЛР Gene Amp PCR System 2400 («Perkin Elmer», США).

Продукт ПЛР елюювали з агарозного гелю за допомогою набору реактивів «QIAquick gel extraction kit» («Qiagen», Німеччина) та клонували, застосовуючи набір реактивів «ТОРО TA cloning kit for sequencing» («Invitrogen», США). Плазмідну ДНК ізолювали за допомогою набору реактивів

«GFX micro plasmid prep kit» («AmershamPharmaciaBiotech», Швеція). Секвенування виконували з використанням набору реактивів «ABI Prism Big-Dye terminator cycle sequencing ready reaction kit» («Perkin Elmer») та секвенатора ABI 310 Sequencer згідно з протоколом виробника.

Для виконання 3'-RACE використовували набір реактивів «Marathon ready cDNA» («Clontech»), два специфічних для MLK4 праймери КІНД (5'-CAAGCTCATGAAAGAATGCTGGCAACAAG-3') та КІНЕ (5'-CAGTTGACTGCTATTGAGGGGGCAGTGAT-3') з двома універсальними праймерами AP1 та AP2 згідно з протоколом виробника.

Для отримання 3'-кінця гена MLK4 $\beta$  застосували праймери КІНД (5'-CAAGCTCATGAAAGAATGCTGGCAACAAG-3') та КІНФ (5'-CAGTTGACTGCTATTGAGGGGGCAGTGAT-3').

Для визначення 5'-кінця гена MLK4 $\beta$  було використано праймери КІНА (5'-CAGGGCCTGGGCACGACCATG-3') та КІНГ (5'-CGAACTCCAGCACCAGGCAGAGGT-3').

ПЛР виконували, як описано вище.

**Визначення експресії та хромосомної локалізації гена MLK4.** Для визначення рівня експресії гена MLK4 у різних тканинах використовували Нозерн-блот гібридизацію з MTN фільтром («Clontech») та ПЛР з нормалізованою по G3PDH кДНК з різних тканин («Clontech»). Фільтр було передгібридизовано та гібридизовано у розчині, який містив 50 % формаміду, 5 × розчин Денхардта, 5 × SSC, 0,5 % SDS, 100 мкг денатурованої ДНК сперми лосося на 1 мл розчину, протягом 14—16 год при температурі 42 °C. Зондами для Нозерн-блот гібридизації слугували [<sup>32</sup>P]-мічені 3'-кінці MLK4 $\alpha$  (1970—3910 п. н.) та MLK4 $\beta$  (2087—4667 п. н.). Після гібридизації фільтр відмивали протягом 20 хв при кімнатній температурі у розчині, який містив 2 × SSC та 0,1 % SDS, та протягом 20 хв при 50 °C у розчині, який містив 0,2 × SSC та 0,1 % SDS. Для детекції гібридизаційних сигналів використовували рентгенівську плівку («Kodak», США).

Нормалізовану по G3PDH кДНК з різних тканин («Clontech») було використано з праймерами КІНД та КІНЗА (5'-GGCCAGGTCGCATCACCAA-3') для MLK4 $\alpha$  і праймерами КІНФ та КІНІ (5'-GGATAAGACCTCTCTCCGATGGCAACAGTC-3') для MLK4 $\beta$ . Для ампліфікації фрагмента гена для MLK4 $\alpha$ , MLK4 $\beta$  та G3PDH було застосовано 40, 30 та 20 циклів ПЛР відповідно. ПЛР було виконано, як описано вище.

Для флюоресцентної гібридизації *in situ* застосовано нормальні метафазні хромосоми [11]. Проаналізовано 60 клітин на стадії метафази.

Результати і обговорення. *Ізолювання гена MLK4. NotI-«зв'язуючий» клон NR5-DM9* (Реєстраційний номер у GenBank AJ311799) виявив 87 % ідентичності протягом 63 п. н. до гена MLK3 людини (mixed lineage kinase 3) (Реєстраційний номер у GenBank NM\_002419) і 83 % ідентичності протягом 87 п. н. до гена MLK1 людини (Реєстраційний номер у GenBank AF251442). BLASTN аналіз показав, що *NotI-«зв'язуючий» клон NR5-DM9* є ідентичним до частини РАС клону RP5-862P8 (Реєстраційний номер у GenBank AL133380). Зважаючи на подібність між РАС клоном RP5-862P8 і геном людини MLK3, були використані праймери КІНБ і КІНС та отримано частину гена MLK4 (630—1734 п. н.) з серцевого пула кДНК (набір реактивів «Marathon ready cDNA» («Clontech»)) (рис. 1, 2).

Для одержання 3'-кінця гена використовували 3'-RACE з набором реактивів «Marathon ready cDNA» (серце). Один специфічний продукт гена MLK4α розміром 2300 п. н. отримано за допомогою специфічних праймерів КІНД і КІНЕ та універсальних праймерів AP1 і AP2 («Clontech»). Цей продукт елюювали з гелю і клонували. Три клони було секвеновано. Аналіз нуклеотидної послідовності показав, що 3'-кінець гена MLK4α містить ланцюжок полі(А), який складається з 30 аденинових нуклеотидів. Типовий сайт поліаденілювання передує ланцюжку полі(А) і знаходиться на відстані 18 п. н. від нього (рис. 1, 2).

Для отримання ймовірного першого кодону ATG(Met) використано праймери КІНА і КІНГ, які створено з урахуванням нуклеотидної послідовності РАС клону RP5-862P8 і відомої 5'-частини гена MLK4. Аналіз нуклеотидної послідовності продукту ПЛР, отриманого з серцевого пула кДНК («Marathon ready cDNA», «Clontech») показав, що перший кодон ATG(Met) знаходиться на відстані 262 п. н. від 5'-кінця отриманого продукту ПЛР. Першому кодонові ATG(Met) передує стоп-кодон, який розташований на відстані 118 п. н. від 5'-кінця отриманого продукту ПЛР і знаходиться в тій же рамці зчитування (+1), що й перший кодон ATG. Перший кодон ATG знаходиться в межах нуклеотидної послідовності CCCATGG, що відповідає моделі Ко-зака [12] (рис. 1, 2).

Пошук у базах даних EMBL та EST з нуклеотидною послідовністю гена MLK4α виявив клон EST AW408639, який мав іншу форму сплайсингу, ніж MLK4α, в останньому шостому екзоні. Використовуючи нуклеотидні послідовності клона РАС RP5-862P8, гена MLK3 і декількох клонів EST (AL135711, BE867187), розташованих нижче від 3'-кінця гена MLK4α на клоні РАС RP5-862P8,

1	CGG GGC CGG GGC AGG ACC AAG GGG GGA GGT GGC CGG CGG GGT GGC GGA	48
49	CGG CGG CGG GGC GGC AGG AGG GGG GGC GGC AGG GGC GGC GGA GGC TGG	96
97	ACC CTT TGG GCA GCT AGC CCG TGA TCT CCG CCG TTA CCG AIC GCG ATT	144
145	CCF ACC CCG TGG CCT TCC CCG GGC GGC GGC GGC CAC ACC GGC GGA GGA	192
193	TCC GCG CCG GGC GGC GGG GGG GCT GGG CCG ACC TTC CCG CAC CCG	240
1	M A L R G A A G A	9
241	CCT CCC GGC GCA GCT GGC CCC AIG GCT TTG CCG GGC GGC GGA GGC	288
10	T D T P V S S A G G A P G G S A	25
289	ACC GAC ACC CCG GAG TCC TCG CCG CCG GGA CAC CCG GGC GGC TGA GCG	336
26	S S S S T S S G G S A S A G A G	41
337	TCC TCG TCG TCC ACC TCC TCG GGC GGC TCG GCG TCG GCG GCG GCG GCG	384
42	L W A A L Y D Y E A R G E D E L	57
385	CGG TGG GCG GCG CAC TAC GAC AAC GAG GCT CCG GGC GAG GAC GAG CCG	432
58	S L R R G Q L V E V L S Q D A A	73
433	ACC CCG CCG CCG GGC GGC GGG GGG GCT TGG TGG CCG GGC GGC GGC GGC	480
74	V S G D E G W W A G Q V Q R R L	89
481	CGG TGG GGC GGC GGC GGC TGG TGG GCA GGC CCG GGG CCG CCG GGC CCG	528
90	G I F F A N Y V A F C R P A A S	105
529	GCC AIC TAC CCG GGC AAC GAC GAG GCT TCC TCC GGC GGC GGC GGC GGC	576
106	P A P P P S R P S S C P V H V A F	121
577	CCC GCG CCG CCG CCG TCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG GGC GGC GGC TTC	624
122	E R L E L K E L I G A G G G F G Q	137
625	GAG CCG CCG GAG CCG AAG GAG CAC AIC GGC CCG GGC GGC TTC GGG CAG	672
138	V Y R A T W Q G Q E V A V K A A	153
673	GAT TCC CCG CCG ACC TCG CCG GGC CCG GAG CCG GGC GGC GGC GGC GGC	720
154	R Q D P E Q D A A A A A E S V R	169
721	CAG CAG GAC CCG GAG CAG GAG CCG GCG CCG CCG CCG GAG ACC GAG CCG	768
170	R E A R L E F A M L R H P N I I E	185
769	CGC GGC CCG CCG CCG TTC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG AIC AIC GAG	816
186	L R G V C L Q Q P H L T C L V L E	201
817	CAG CCG CCG GAG TCC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG GAG CAG	864
202	F A R G G A L N R A L A A A W A	217
865	TCC GGC CCG GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC GGC	912
218	A P D P R A P G P R R A R R I P	233
913	GCC CCG GAC CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	960
234	P H V L V H W A V Q I A R G M L	249
961	CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	1008
250	Y L H E E A F V P I L H R D L K	265
1009	TCC CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	1056
266	S S N I L L L E I E H D D I C	281
1057	TCC AAG ACC ATT TTG CTA CTA GAG AIC GAT GAT GAT GAT GAT GAT GAT	1104
282	N K T L K I T D F G L A R E W H	297
1105	MIT AAA ACT TGG AAG AIT ACA GAT TTT GGG TGG GCA AGG EWA TGG CAG	1152
298	R T T K M S T A G T Y W M A P	313
1153	AGG ACC ACC AAA AIG AGC ACA GCA GGC ACC TTT GGC TGG AIG GGC CCG	1200
314	E V I K S S L E F S K G S D I W S	329
1201	GAA GAG AIC AAG TCT TCC TTG TTT TCC AAG GGA AEC GAG AIC TGG AGC	1248
330	C G V L L W E L L T G E V P Y R	345
1249	TEF GAG GAG CAG CAG TGG GAA CAG CAG ACC GCA GAA GIC CCG TTT CCG	1296
346	G I D G L A V A Y G V A V N K L	361
1297	GCC AIT GAT GGC CAC GAG GCT TTT GGG GAA GCA GIC AIT AAA CAC	1344
362	T L P I P S T C P E F A K L I	377
1345	ACT TTG CCG AIT CCA TCC ACC TCC CTT GAG CCG TTT GAC AIC CAC AIG	1392
378	K E C W Q Q D P H I R P F A L	393
1393	AAA GAA TCC TGG GAA CAA CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG CCG	1440
394	I L E Q L T A I E G A V M T E M	409
1441	AIT CAC GAA CAG TGG AIT CCG AIT GAG GGG GCA GIG AIG AIT GAG AIG	1488
410	P Q E S F H S M Q D D W K L E J	425
1489	CCT CAC GAA TCT TTT CTT TCC AIG CAA GAT GAC TGG AAA CTA GAA AIT	1536
426	D O M N D E L A	441
1537	CAG CAA AIG TTT GAT GAG TGG AAG ACA AAG GAA AAG GAG CAG CAG AIC	1584
442	R T L T F L A	457
1585	CGG GAA GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	1632
458	V L	473
1633	GAG CAG CAA AAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	1680
474	V L	489
1681	GAG CAG GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	1728
480	R * P * K * V * K * K * R * K * G * K * F * K * R * S * R * L	505
1729	AGC ACC AAG GAA AAG AAG AAG AAG GGC AAG TTT AAG AAG AAG CAG CAG	1776
506	K L K D G H R I S L P R S D F Q H	521
1777	AGC CAC AAA GAT GAA CAG AIC AAT TTA CTT TCA GAT TTT CAG CAG CAG	1824
522	K L T V Q A S P N L D K R R S L	537
1825	AGG AIA ACC GAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG CAG	1872
538	N S S S S F P S P T M M P R	553
1873	AAC AAC AAC AAT TCC AAT CCG CCG AAC ACC CCA AIG AIG CCG CCA	1920
554	L R A T Q C E L S A L P G L L	569
1921	CAC CCA GGC AIA CAG TAT GAG CTT TCT GCA CAG CAA CCG GAG CAC CAG	1968
570	C *	571
1969	TAT TAA CTT CAC TCC TTT CAC TTG ACT TGG AIT CAA AIT GAG CAG AIG	2016

Рис. 1. Нуклеотидна та виведена амінокислотна послідовність MLK4α. Кінзний каталітичний домен виділено сірим кольором; домен SH3 підкреслено чорним кольором; домен DLZ позначено пунктиром; основний домен виділений зірочками; мотив CRIB підкреслено хвилястою лінією

були створені праймери КІНД (знаходиться на спільній частині MLK4α і AW408639) та КІНФ (знаходиться в межах клонів EST AL135711 та BE867187). За допомогою цих праймерів одержано

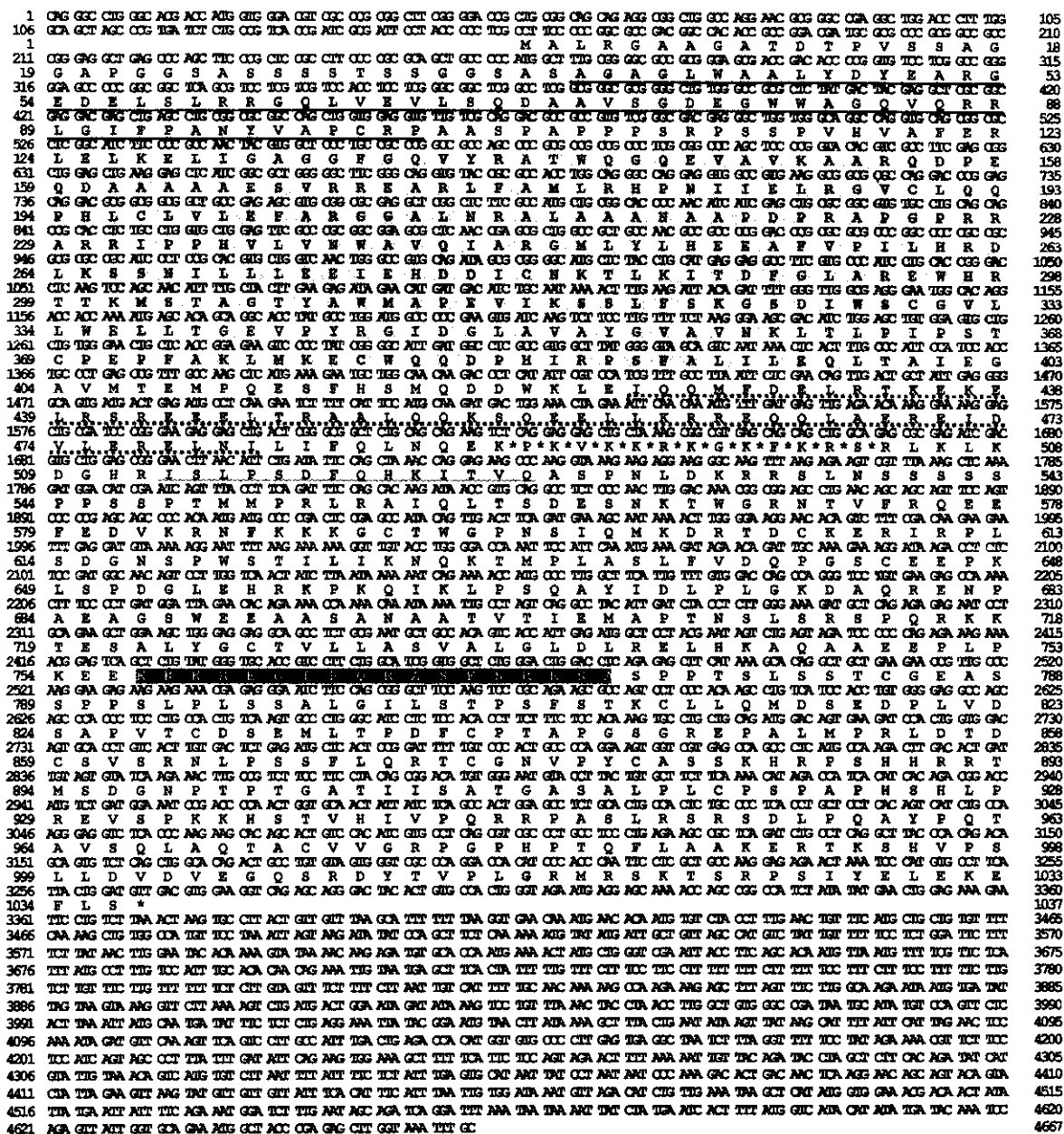


Рис. 2. Нуклеотидна та виведена амінокислотна послідовності MLK4β. Кіназний каталітичний домен виділено сірим кольором; домен SH3 підкреслено чорним кольором; домен DLZ позначено пунктиром; основний домен виділений зірочками; мотив CRIB підкреслено хвилястою лінією; сигнал ядерної локалізації показано чорним кольором

3'-кінець гена MLK4β з серцевих тканин. Ген MLK4β має на чотири екзони більше і на 466 амінокислотних залишків довшу відкриту рамку зчитування, ніж MLK4α (рис. 1, 2).

Аналіз нуклеотидної послідовності показав, що MLK4α і MLK4β складаються з 6 і 10 екзонів відповідно.

Таким чином, існують дві альтернативні форми сплайсингу MLK4, MLK4α і MLK4β. Отримана нуклеотидна послідовність для MLK4α і MLK4β складається з 3910 і 4667 п. н. відповідно. Обидві форми мають однаковий 5'-кінець (1—1936 п. н.). 5'-Нетрансльована ділянка складається з 261 п. н. і містить стоп-кодон у позиції 118 п. н. у тій же

рамці зчитування, що й перший кодон ATG (Met). Відкрита рамка зчитування для *MLK4α* і *MLK4β* включає 1710 і 3108 п. н. відповідно. 3'-Нетрансльована ділянка містить 1938 п. н. для *MLK4α* і 1297 п. н. для *MLK4β*. Ланцюжок полі(A) з типовим сайтом поліаденілювання ідентифіковано тільки для *MLK4α* (рис. 1, 2).

Аналіз експресії та хромосомне картування гена *MLK4*. За допомогою Нозерн-блот гібридизації для *MLK4β* виявлено один транскрипт на рівні 7 тис. п. н. у підшлунковій залозі та нирках. Для *MLK4α* Нозерн-блот гібридизація не виявила специфічного сигналу. Тому було використано ПЛР з нормалізованою по *G3PDH* кДНК («Clontech»), внаслідок чого показано, що *MLK4α* і *MLK4β* мають однаковий спектр експресії. Найвищий рівень експресії *MLK4α* і *MLK4β* виявлено в підшлунковій залозі, нирках, печінці, легенях, мозку. Рівень експресії в серці та плаценті був значно меншим (рис. 3).

*NotI*-«зв'язуючий» клон NR5-DM9, який відповідає гену *MLK4*, картовано до хромосомної смуги 1q42 з використанням FISH. Декілька хвороб було асоційовано з цією ділянкою, включаючи рак простати [13] та карциному нирок [14].

Виведена амінокислотна послідовність *MLK4α* та *MLK4β*. Гени *MLK4α* і *MLK4β* кодують потенційний білок розміром 570 та 1036 амінокислотних залишків з молекулярною масою 62,9 та 113,8 кДа відповідно. Обидва потенційних білки мають однаковий N-кінець (1—558 амінокислотних залишків), який містить кіназний каталітичний домен (124—401), домен SH3 (Src homology 3), домен DLZ (double leucine zipper) (425—481), основний домен (490—504) та мотив CRIB (Cdc-42/Rac interactive binding) (513—526) (рис. 1, 2).

Кіназний каталітичний домен *MLK4* (124—401 амінокислотний залишок) є гібридом між кіназними каталітичними доменами серин/треонінових та тирозинових кіназ, що вказує на приналежність *MLK4* до родини MLK (mixed lineage kinase). Виведена амінокислотна послідовність кіназного каталітичного домену *MLK4* виявляє найбільшу гомологію до кіназного каталітичного домену *MLK3* (Реєстраційний номер у GenBank NP\_002410) з 72 % ідентичності, *MLK1* (Реєстраційний номер у GenBank AAG44591) з 71 % ідентичності, *MLK2* (Реєстраційний номер у GenBank Q02779) з 69 % ідентичності. Каталітичний домен *MLK4* містить усі 11 консервативних каталітичних субдоменів, які були описані авторами роботи [15].

На відміну від *MLK4α*, *MLK4β* також включає сигнал ядерної локалізації та багату на пролін ділянку.

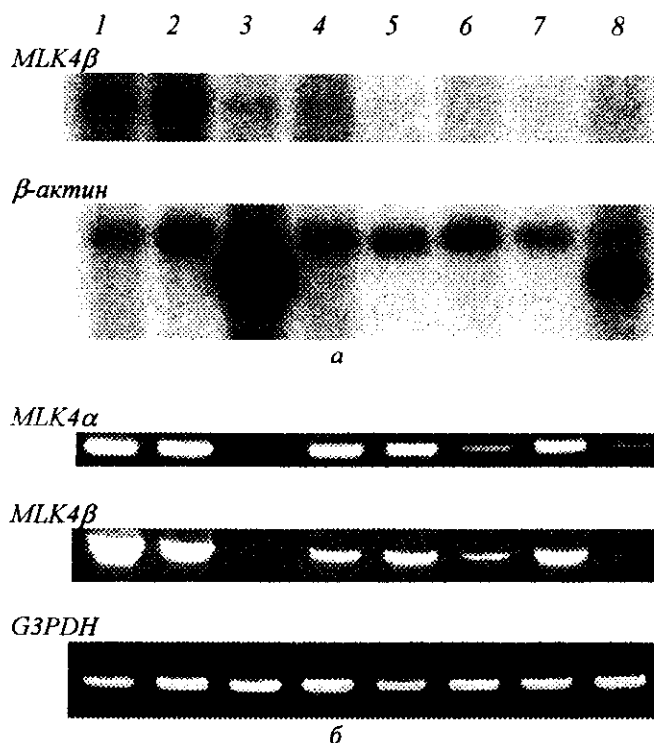


Рис. 3. Радиоавтограф Нозерн-блот гібридизації генів *MLK4β* та  $\beta$ -актину людини (а), а також результати полімеразної ланцюгової реакції з нормалізованою по *G3PDH* кДНК («Clontech», США) для генів *MLK4α*, *MLK4β* і *G3PDH* (б). MTN фільтр («Clontech») містив 2 мкг мРНК з наступних тканин: 1 — підшлункова залоза; 2 — нирки; 3 — скелетні м'язи; 4 — печінка; 5 — легені; 6 — плацента; 7 — мозок; 8 — серце. Нумерація тканин, кДНК з яких використано для ПЛР, відповідає нумерації тканин, мРНК з яких було використано для Нозерн-блот гібридизації

Подальша робота необхідна для визначення функціонального значення продуктів генів *MLK4α* та *MLK4β*. Виведена амінокислотна послідовність кіназного каталітичного домену *MLK4* виявила значну гомологію до кіназного каталітичного домену *MLK1*, *MLK2* та *MLK3*. Відомо, що всі перевірені члени цієї родини (*DLK*, *LZK*, *MLK2*, *MLK3*) функціонують як MAPKKK (mitogen-activated protein kinase kinase kinase) та відіграють важливу роль в активації таких шляхів сигнальної трансдукції, як JNK/SAPK, ERK та p38 [5—7, 16]. Хіраї та співавт. запропонували усі члени родини MLK класифікувати як MAPKKK [8]. Тому нами припущено, що новий член родини MLK, *MLK4*, також функціонує як MAPKKK у шляхах сигнальної трансдукції.

Таким чином, у результаті цієї роботи ідентифіковано новий член родини MLK, MLK4, показано рівень експресії цього гена в різних тканинах та визначено його хромосомну локалізацію.

S. M. Kvasha, A. I. Protopopov, E. R. Zabarovsky, A. V. Rynditch, V. I. Kashuba

Isolation, expression analysis and chromosomal mapping of a novel human kinase gene MLK4

#### Summary

We have identified a novel human gene MLK4. Two alternatively spliced forms of MLK4, named MLK4 $\alpha$  and MLK4 $\beta$ , have been isolated. The expression of MLK4 has been detected in pancreas, kidney, liver, lung, brain, placenta and heart. The gene has been mapped to chromosomal band 1q42. The predicted amino acid sequence of MLK4 is highly related to the amino acid sequence of the members of MLK family, which play an important role in the signal transduction pathways.

C. M. Кваша, А. И. Протопопов, Е. Р. Забаровский, А. В. Рындич, В. И. Кашуба

Изолирование, анализ экспрессии и хромосомное картирование нового гена киназы человека MLK4

#### Резюме

Идентифицирован новый ген человека MLK4. Получены две альтернативные формы сплайсинга этого гена, MLK4 $\alpha$  и MLK4 $\beta$ . Экспрессия гена детектирована в поджелудочной железе, почках, печени, легких, мозге, сердце и плаценте. Ген картирован к хромосомной области 1q42. Анализ выведенной аминокислотной последовательности MLK4 выявил высокий уровень гомологии к представителям семейства MLK, которые играют важную роль в путях сигнальной трансдукции.

#### ПЕРЕЛІК ЛІТЕРАТУРИ

- Schaeffer H. J., Weber M. J. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messenger // *Mol. Cell. Biol.*—1999.—19, N 4.—P. 2435—2444.
- Yasuda J., Whitmarsh A. J., Cavanagh J., Sharma M., Davis R. The JIP group of mitogen-activated protein kinase scaffold proteins // *Mol. Cell. Biol.*—1999.—19, N 10.—P. 7245—7254.
- Treisman R. Regulation of transcription by MAP kinase cascades // *Curr. Opin. Cell. Biol.*—1996.—8, N 2.—P. 205—215.
- Robinson M. J., Cobb M. H. Mitogen-activated protein kinase pathways // *Curr. Opin. Cell. Biol.*—1997.—9, N 2.—P. 180—186.
- Sakuma H., Ikeda A., Oka S., Kozutsumi Y., Zanetta J. P., Kawasaki T. Molecular cloning and functional expression of a cDNA encoding a new member of mixed lineage protein kinase

from human brain // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 45.—P. 28622—28629.

- Fan G., Merritt S. E., Kortenjann M., Shaw P. E., Holzman L. B. Dual leucine zipper-bearing kinase (DLK) activates p46SAPK and p38mapk but not ERK2 // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 40.—P. 24788—24793.
- Rana A., Gallo K., Godowski P., Hirai S., Ohno S., Zon L., Kyriakis J. M., Avruch J. The mixed lineage kinase SPRK phosphorylates and activates the stress-activated protein kinase activator, SEK-1 // *J. Biol. Chem.*—1996.—271, N 32.—P. 19025—19028.
- Hirai S., Katoh M., Terada M., Kyriakis J. M., Zon L. I., Rana A., Avruch J., Ohno S. MST/MLK2, a member of the mixed lineage kinase family, directly phosphorylates and activates SEK1, an activator of c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase // *J. Biol. Chem.*—1997.—272, N 24.—P. 15167—15173.
- Zabarovsky E. R., Allikmets R., Kholodnyuk I., Zabarovska V. I., Paulsson N., Bannikov V. M., Kashuba V. I., Dean M., Kisselev L. L., Klein G. Construction of representative NotI linking libraries specific for the total human genome and for human chromosome 3 // *Genomics.*—1994.—20.—P. 312—316.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual.*—New York: Cold Spring Harbour Lab. press, 1989.
- Protopopov A. I., Gizatullin R. Z., Vorobieva N. V., Protopopova M. V., Kiss C., Kashuba V. I., Klein G., Kisselev L. L., Grafodatsky A. S., Zabarovsky E. R. High resolution FISH mapping of 50 NotI linking clones homologous to genes and cDNAs on human chromosome 3 // *Chromosome Res.*—1996.—4.—P. 443—447.
- Kozak M. An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs // *Nucl. Acids Res.*—1987.—15, N 20.—P. 8125—8148.
- Berthon P., Valeri A., Cohen-Akenine A., Drelon E., Paiss T., Wöhr G., Latil A., Millaseau P., Mellah I., Cohen N., Blanche H., Bellane-Chantelot C. Predisposing gene for early-onset prostate cancer, localized on chromosome 1q42.2-43 // *Amer. J. Hum. Genet.*—1998.—62.—P. 1416—1424.
- Launonen V., Vierimaa O., Kiuru M., Isola J., Roth S., Pukkala E., Sistonen P., Herva R., Aaltonen L. A. Inherited susceptibility to uterine leiomyomas and renal cell cancer // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—2001.—98, N 6.—P. 3387—3392.
- Hanks S. K., Quinn A. M., Hunter T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains // *Science.*—1988.—241.—P. 42—52.
- Merritt S. E., Mata M., Nihalani D., Zhu C., Hu X., Holzman L. B. The mixed lineage kinase DLK utilizes MKK7 and not MKK4 as substrate // *J. Biol. Chem.*—1999.—274, N 15.—P. 10195—10202.

УДК 577.113.5

Надійшла до редакції 14.12.2000