

# Interaksi AtMEK1-EXGT pada *Arabidopsis thaliana* pada Saat Terjadi Pelukaan

Toto Hadiarto<sup>1</sup> dan Fumio Nanba<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Balai Besar Penelitian dan Pengembangan Bioteknologi dan Sumberdaya Genetik Pertanian, Jl. Tentara Pelajar 3A, Bogor 16111

<sup>2</sup>Research Centre for Environmental Genomics, Kobe University, Jepang

## ABSTRACT

**Interaction of AtMEK1-EXGT in *Arabidopsis thaliana* after Wounding. Toto Hadiarto and Fumio Nanba.** Protein interactions occur within cellular level of stimulated plant cells to relay signals from receptors to production of response. AtMEK1-EXGT interaction had been detected in non-treated *Arabidopsis*. In this research, interaction between AtMEK1, a mitogen-activated protein kinase kinase of *Arabidopsis thaliana*, and EXGT, endoxyloglucan transferase, after the plant was wounded was examined using co-immunoprecipitation and *in vitro* phosphorylation assay. The results demonstrated that EXGT interact with AtMEK1 soon after and 10 minutes after wounding. In addition, AtMEK1 phosphorylation activity increased when increased level of EXGT was incorporated into the reaction mixture. These indicate that EXGT amplifies wound-caused phosphorylation activity of AtMEK1. The results elucidate part of the AtMEK1-AtMEK1-AtMPK4 cascade which is stimulated by wounding. How the complex interaction between EXGT, AtMEK1 and AtMPK4 fits within the cascade is remained to be uncovered.

**Key words:** Endoxyloglucan transferase, AtMEK1, MAPK, wounding.

## PENDAHULUAN

Tanaman akan selalu merasakan stimulus dari lingkungan sekitarnya, seperti pH tanah, suhu udara, cahaya, kondisi air, nutrisi dalam tanah, dan konsentrasi CO<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>. Hal-hal ini berpengaruh terhadap pertumbuhan dan perkembangan tanaman (Alberts *et al.* 2002). Selain itu, pengaruh biotik, seperti serangan jamur dan bakteri juga berakibat pada perubahan tanaman (Pedley dan Martin 2005). Tanaman dapat mengetahui saat-saat mendapat cekaman, kemudian bertahan dengan bereaksi secara tepat terhadap cekaman yang dialami.

Rangsangan yang diperoleh tanaman, pertama kali diterima oleh tanaman melalui reseptor yang berada pada permukaan sel. Reseptor ini melanjutkan sinyal yang diperoleh ke dalam sel tanaman sampai pada respon yang diberikan oleh tanaman. Aliran sinyal ini melibatkan interaksi spesifik dan kompleks antar protein di dalam jaringan tanaman, sehingga meng-

hasilkan respon yang sangat akurat (Nakagami *et al.* 2005).

Salah satu teknik yang digunakan tanaman untuk meneruskan sinyal di dalam sel tanaman adalah sinyal transduksi (Innes 2001), seperti *cascade mitogen-activated protein kinase* (MAPK). MAPK ini terdiri atas tiga komponen pokok, yaitu MAPK kinase kinase (MAPKKK), MAPK kinase (MAPKK), dan MAPK. MAPKKK mengaktifkan MAPKK melalui proses fosforilasi dan MAPKK yang aktif melakukan fosforilasi MAPK (Nakagami *et al.* 2005).

Salah satu MAPKK pada *Arabidopsis* adalah AtMEK1. Penelitian telah dilakukan menggunakan AtMEK1 dengan teknik *two-hybrid assay* untuk mencari enzim atau substrat dari protein tersebut. Penelitian ini berhasil mengidentifikasi endoxyloglucan transferase (EXGT) sebagai protein yang berinteraksi dengan AtMEK1 (Nanba 2006). EXGT (67 kDa) atau disebut juga xyloglucan endotrans-glycosylase (XET) yang termasuk kelompok (famili) enzim dinding sel dan berfungsi memotong bagian utama (*backbone*) dari xyloglucan. Molekul ini merupakan bagian utama dari matriks dinding sel yang menyambungkan dengan molekul substrat lain seperti xyloglucan (Steele *et al.* 2001, Albert *et al.* 2004). EXGT diduga berperan penting dalam proses rekonstruksi dinding sel yang merupakan proses penting dalam pertumbuhan dan perkembangan sel (Okazawa *et al.* 1993).

Tiga teknik yang sering digunakan untuk mengamati interaksi antar protein adalah *two-hybrid assay*, *co-immunoprecipitation assay*, dan *in vitro phosphorylation assay* (Peck 2006). *Two-hybrid assay* mengandalkan pada penggunaan protein umpan yang dikombinasikan dengan protein dari organisme yang digunakan di dalam pustaka sel jamur yang mengandung seluruh gen terekspresi. Pada sel jamur, interaksi protein ditunjukkan dengan warna biru. Warna ini terjadi karena ekspresi gen reporter yang disebabkan oleh interaksi antara protein umpan dan protein dari pustaka protein (Causier dan Davies 2002). Teknik *co-immunoprecipitation* mengacu pada penggunaan antibodi untuk mengendapkan satu jenis protein yang diikuti dengan analisis endapan protein tersebut. Analisis protein dapat dilakukan dengan teknik *Western blotting*

(Sambrook dan Russell 2001), sedangkan *in vitro phosphorylation assay* biasanya dilakukan menggunakan fusi protein pada enzim dan substrat yang secara hipotesis akan berinteraksi.

Penelitian yang dilakukan Nanba (2005) tentang interaksi antara AtMEK1 dengan EXGT merupakan penelitian awal yang menemukan EXGT sebagai protein yang berinteraksi dengan AtMEK1 pada tanaman *Arabidopsis thaliana* yang tidak mendapat cekaman. Kajian lebih lanjut perlu dilakukan untuk memperoleh informasi yang lebih mendalam tentang interaksi antara AtMEK1 dengan EXGT, terutama pada tanaman yang mengalami cekaman, khususnya pelukaan.

Penelitian bertujuan untuk mengetahui interaksi antara EXGT dengan AtMEK1 serta pengaruh EXGT terhadap aktivitas fosforilasi dari AtMEK1 pada AtMPK4 dengan menggunakan teknik *co-immunoprecipitation* dan *in vitro phosphorylation assay*. Informasi yang diperoleh dari hasil penelitian ini diharapkan sangat bermanfaat untuk mengetahui mekanisme selular tanaman pada saat terjadi cekaman pelukaan.

## BAHAN DAN METODE

### Bahan Tanaman

Tanaman *A. thaliana* yang digunakan berumur 7-10 hari sejak penanaman benih pada medium agar 0,9% Gamborg's B5 dalam cawan petri. Sebelum ditanam, benih disterilkan dengan larutan 70% etanol, diikuti dengan larutan 5% sodium hipoklorida yang mengandung 0,1% Tween 20, dan diakhiri dengan pencucian tiga kali dengan air steril. Setelah dipisahkan dari media, kecambah diinkubasi dalam air steril selama 4-8 jam pada suhu ruang. Sebagian tanaman yang digunakan sebagai sampel dilukai, dan sebagian lainnya tidak dilukai sebagai kontrol.

### Pelukaan Tanaman

Pelukaan tanaman dilakukan dengan menjepit bagian tanaman secara acak sebanyak 3-4 kali dengan menggunakan pinset. Setiap pelukaan dilakukan selama satu menit atau 10 menit. Setelah pelukaan, total protein tanaman diekstraksi.

### Ekstraksi Protein

Masing-masing sebanyak 20-30 tanaman yang sudah dilukai dan tanaman kontrol digerus secara terpisah, dengan menambahkan nitrogen cair, sampai menjadi serbuk, diikuti dengan penambahan bufer ekstrak (100 mM Tris-HCl pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM PMSF, 1 mg/ml leupeptin, 10 mM 2-merkaptotanol) pada saat serbuk

mulai mencair. Penambahan bufer ekstrak sebanyak 0,1 ml untuk setiap 1 mg tanaman. Selanjutnya, ekstrak disentrifugasi dengan kecepatan 15.000 rpm selama 15 menit pada suhu 4°C. Setelah sentrifugasi, supernatan dikumpulkan sebagai protein total.

### Kloning dan Pembuatan Protein Fusi

Dua jenis konstruk yang digunakan dalam penelitian ini diperoleh dari Dr. D. Matsuoka, Kobe University, Jepang. Konstruk pertama adalah vektor *pGEX-4T1* yang mengandung gen AtMEK1ac (aktif). Gen AtMEK1ac adalah gen AtMEK1 yang telah dimodifikasi sehingga produk dari gen tersebut adalah protein AtMEK1 yang selalu aktif melakukan fosforilasi. Konstruk kedua adalah vektor *pGEX-4T1* yang mengandung gen AtMPK4kn (kinase negatif). Gen AtMPK4kn adalah gen AtMPK4 yang sudah dimodifikasi sehingga ekspresinya menghasilkan protein AtMPK4 yang tidak aktif atau tidak melakukan fosforilasi. Konstruk vektor *pGEX-4T1* yang mengandung gen EXGT dibuat dengan teknik yang tertera pada Matsuoka *et al.* (2002) dengan memperhatikan situs pemotongannya. *pGEX-4T1* adalah vektor ekspresi yang sudah disisipi gen glutation-S-transferase (GST) pada posisi *upstream* dari gen yang kita kloning (AtMEK1ac, AtMPK4kn atau EXGT). Tiga konstruk tersebut diekspresikan di *Escherichia coli*. Protein fusi (mengandung GST) yang dihasilkan oleh bakteri transforman dipurifikasi sesuai dengan teknik pada Matsuoka *et al.* (2002).

### In Vitro Phosphorylation Assay

Sebanyak 10  $\mu$ l campuran reaksi kinase [50 mM Tris-HCl pH 7,5, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ M ATP, dan 40 kBq ( $\gamma$ -<sup>32</sup>P) ATP] mengandung 0,1  $\mu$ g GST-AtMEK1 *wild type* atau aktif, 1,0  $\mu$ g substrat (GST-AtMPK4kn) dan EXGT dari tanaman dengan konsentrasi 1,0-2,0  $\mu$ g. ATP pada campuran reaksi kinase hanya ditambahkan saat inkubasi pada suhu 30°C selama 20 menit akan segera dimulai. Setelah *assay* ini, pengamatan dilakukan melalui *Western blotting*.

### Co-immunoprecipitation

Dua peptida sintetik yang mengenal bagian terminal karboksil pada EXGT dan AtMEK1 yang telah disiapkan dari penelitian sebelumnya (Nanba 2006, Matsuoka *et al.* 2002) digunakan untuk mengendapkan protein terkait. *Immunoprecipitation* dan *Western blotting* dilakukan seperti pada Matsuoka *et al.* (2002) dengan menggunakan antiserum yang sesuai.

### Western Blotting

*Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) dengan 7,5% gel digunakan

untuk memisahkan protein yang sudah diendapkan dengan antibodi. Hasil dari SDS-PAGE ditransfer ke Imobilon P membran dalam proses *Western blotting* yang dijelaskan oleh Matsuoka *et al.* (2002).

## HASIL DAN PEMBAHASAN

### Interaksi EXGT dan AtMEK1 saat Terjadi Pelukaan

Pada penelitian ini dilakukan analisis dengan melihat interaksi AtMEK1 dan EXGT sesaat dan 10 menit setelah pelukaan, karena aktivitas fosforilasi AtMEK1 paling tinggi pada saat terjadi cekaman pelukaan dan waktunya adalah sesaat setelah pelukaan sampai sekitar 20 menit kemudian (Matsuoka *et al.* 2002, Hadiarto *et al.* 2006, Teige *et al.* 2004). Untuk itu dilakukan *co-immunoprecipitation* dengan menggunakan dua antibodi yang melawan AtMEK1 dan EXGT. *Co-immunoprecipitation* dilakukan dengan mengendapkan AtMEK1 atau EXGT dengan antibodi yang sesuai dan diikuti dengan *Western blotting* menggunakan EXGT (untuk pengendapan dengan AtMEK1) atau AtMEK1 (untuk pengendapan dengan EXGT) sebagai pelacak.

Hasil dari *co-immunoprecipitation* dapat dilihat pada Gambar 1. Sebagai kontrol terhadap antibodi, AtMEK1 atau EXGT masing masing diendapkan dengan anti-EXGT (Gambar 1a kolom C) atau anti-AtMEK1 (Gambar 1b kolom C) secara berurutan, dan diikuti dengan *Western blotting* menggunakan antibodi yang sama.

EXGT pada sampel dapat terdeteksi pada endapan AtMEK1 (Gambar 1a). Hal ini mengindikasikan bahwa pada saat AtMEK1 diendapkan dari protein hasil ekstraksi dari tanaman sesaat setelah pelukaan (Gambar 1a kolom 0) atau 10 menit setelah pelukaan (Gambar 1a kolom 10), EXGT ikut bersama endapan tersebut. Dengan kata lain, AtMEK1 dan EXGT berinteraksi di dalam sampel protein, sehingga pada saat AtMEK1 diendapkan, protein yang terinteraksi (EXGT) ikut ter-

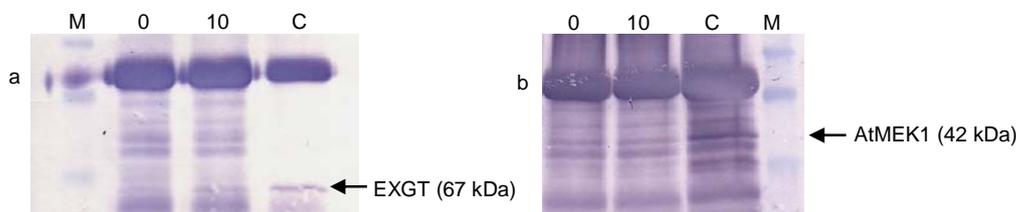
bawa dan terdeteksi oleh antibodi kedua. AtMEK1 juga dapat terdeteksi pada endapan EXGT dalam proses sebaliknya (Gambar 1b).

Interaksi antara AtMEK1 dan EXGT menarik, karena EXGT bukan merupakan substrat dari AtMEK1, yang substratnya masuk dalam kelompok MAPK. Protein kinase memang dapat berinteraksi dengan protein selain substratnya. Contoh dari interaksi antara protein kinase dengan protein yang bukan substratnya adalah MAPK dari mamalia yang dapat menghilangkan aktivitas fosfatase Ppase (Tanoue *et al.* 2000).

Menurut Nanba (2006), interaksi antara AtMEK1 dan EXGT terjadi pada tanaman yang tidak dilukai. Perbedaan jumlah protein yang berinteraksi, yang berhubungan dengan aktivitas fosforilasi AtMEK1 pada tanaman yang dilukai atau tidak dilukai belum dapat diinterpretasikan dari kedua hasil ini, karena metode penelitian yang digunakan berbeda, sehingga, kemungkinan adanya pengaruh EXGT pada aktivitas fosforilasi masih terbuka. Menurut Teige *et al.* (2004), selain cekaman pelukaan, aktivitas fosforilasi AtMEK1 juga dapat meningkat karena cekaman suhu rendah, kekeringan, dan infeksi bakteri atau jamur. Dengan demikian, ada kemungkinan pengaruh interaksi AtMEK1-EXGT itu dapat terjadi akibat cekaman-cekaman tersebut.

### Pengaruh EXGT pada Aktivitas Fosforilasi AtMEK1 pada AtMPK4

Untuk melihat pengaruh EXGT pada aktivitas fosforilasi AtMEK1 interaksi antara AtMEK1 dan EXGT pada tanaman yang tidak dilukai dan dilukai dikonfirmasi dengan *in vitro phosphorylation assay* dengan menggunakan substrat AtMPK4. AtMPK4 digunakan karena substrat ini diaktifkan melalui fosforilasi oleh AtMEK1 setelah tanaman dilukai (Matsuoka *et al.* 2002). Pengaruh EXGT dapat dilihat dengan memasukkan protein GST-EXGT pada campuran reaksi yang mengandung GST-AtMEK1 dan GST-AtMPK4.



**Gambar 1.** Hasil dari *co-immunoprecipitation* untuk mendeteksi interaksi antara AtMEK1 dan EXGT. a = AtMEK1 diendapkan dengan anti-AtMEK1 dan *Western blotting* dengan pelacak anti-EXGT, b = EXGT diendapkan dengan anti-EXGT dan *Western blotting* dengan pelacak anti-AtMEK1, M = protein marker, 0 = total protein diambil dari tanaman sesaat setelah pelukaan, 10 = total protein diambil dari tanaman 10 menit setelah pelukaan, C = kontrol positif menggunakan antibodi yang sama untuk mengendapkan dan *Western blotting*.

Hasil dari *in vitro phosphorylation assay* dapat dilihat pada Gambar 2. AtMEK1 dan EXGT digunakan pada dua konsentrasi yang berbeda untuk melihat pengaruh interaksi pada fosforilasi EXGT. Penurunan konsentrasi AtMEK1 mengakibatkan turunnya jumlah AtMPK4 yang difosforilasi, ditunjukkan oleh turunnya intensitas pita pada separuh bagian kanan hasil otoradiograf (Gambar 2). Hal ini sesuai dengan penjelasan mengenai aktivitas fosforilasi AtMEK1 pada AtMPK4 (Matsuoka *et al.* 2002).

Gambar 2 juga menunjukkan meningkatnya aktivitas AtMEK1 pada AtMPK4 pada saat konsentrasi, dalam hal ini, jumlah protein EXGT dinaikkan. Intensitas pita dengan 0,5  $\mu\text{g}$  EXGT lebih terang dibandingkan dengan intensitas pita pada 0,8  $\mu\text{g}$  EXGT. Intensitas dapat naik dua kali lipat dibandingkan dengan kenaikan jumlah EXGT. Hal ini menunjukkan bahwa peningkatan EXGT menyebabkan fosforilasi AtMPK4 oleh AtMEK1 juga meningkat, sehingga ada indikasi bahwa EXGT membantu AtMEK1 memfosforilasi AtMPK4 secara efisien.

Cara kerja EXGT menaikkan aktivitas fosforilasi AtMEK1 masih belum diketahui. Interaksi EXGT dengan AtMEK1 diduga mengakibatkan struktur AtMEK1 berubah sedemikian rupa, sehingga memungkinkan terjadinya interaksi yang lebih kuat dan stabil antara AtMEK1 dengan AtMPK4 dibandingkan bila EXGT tidak berinteraksi.

Interaksi EXGT dengan AtMEK1 diduga berhubungan dengan fungsi dari kedua protein ini. AtMEK1 terlibat dalam penerusan sinyal saat terjadi cekaman pelukaan (Matsuoka *et al.* 2002, Hadiarto *et al.* 2006, Teige *et al.* 2004) dan EXGT berfungsi dalam rekonstruksi dinding sel (Okazawa *et al.* 1993). Jadi, ke-

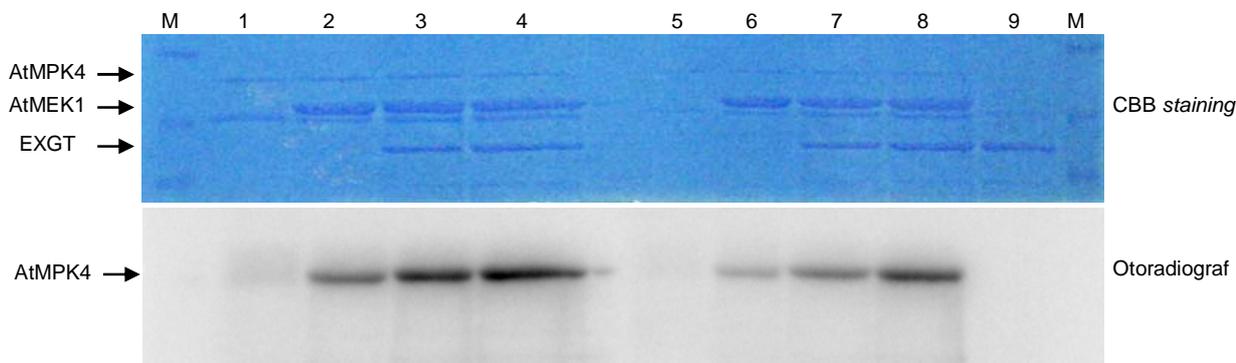
mungkinan mekanisme penerusan sinyal pada tanaman yang luka dapat diilustrasikan pada Gambar 3. Pada saat tanaman mengalami pelukaan, sel-sel tanaman mengenali cekaman tersebut dan meneruskan sinyal melalui AtMEK1. Pada saat yang sama, kemungkinan konsentrasi EXGT yang tidak bekerja akibat pelukaan naik dan mereka berinteraksi dengan AtMEK1 untuk memperkuat aktivitas AtMEK1 pada AtMPK4. Sinyal kemudian dilanjutkan dari AtMPK4 yang terfosforilasi (menjadi aktif) sampai pada target molekul untuk kemudian memperbaiki kerusakan sel.

AtMEK1 diketahui terlibat dalam cekaman pelukaan melalui *cascade* AtMEK1-AtMEK1-AtMPK4 (Hadiarto *et al.* 2006), sehingga, berpengaruhnya EXGT dalam meningkatkan aktivitas AtMEK1 juga akan mempengaruhi *cascade* tersebut meskipun mekanismenya belum terungkap. Selain itu, hasil ini juga menunjukkan kompleksitas MAPK *cascade* yang melibatkan molekul selain protein kinase.

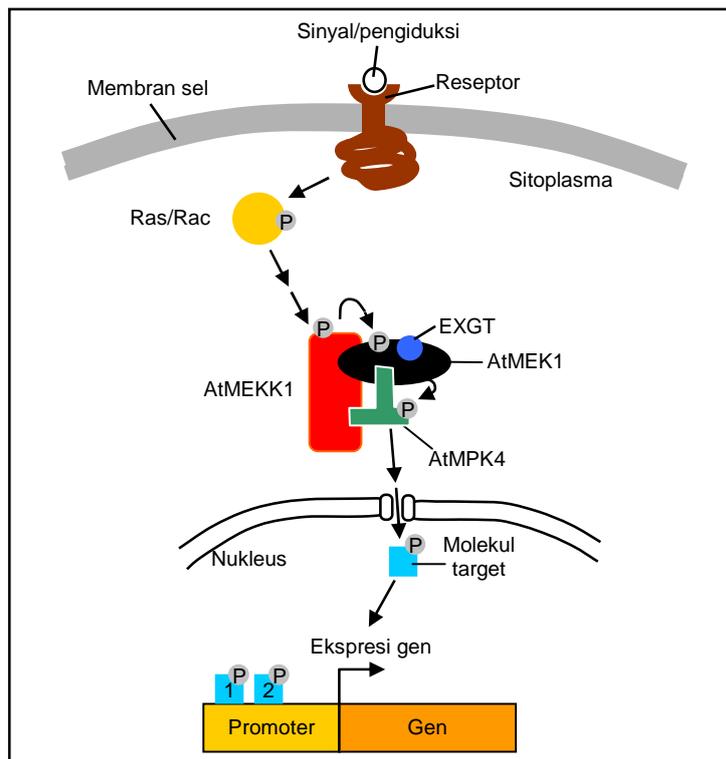
#### KESIMPULAN DAN SARAN

Pada saat terjadi pelukaan, terdapat interaksi antara enzim AtMEK1 dan EXGT. Interaksi ini berpengaruh terhadap aktivitas AtMEK1 dalam proses fosforilasi substrat AtMPK4. Semakin tinggi konsentrasi EXGT yang berinteraksi dengan AtMEK1, aktivitas fosforilasi AtMEK1 semakin meningkat.

Pengaruh EXGT pada aktivitas AtMEK1 dan AtMPK4 diduga berpengaruh terhadap *cascade* AtMEK1-AtMEK1-AtMPK4 yang juga terlibat dalam meneruskan sinyal saat terjadi pelukaan, sehingga proses penerusan sinyal saat terjadi pelukaan sangat kompleks.



**Gambar 2.** Pengaruh konsentrasi EXGT terhadap aktivitas fosforilasi AtMEK1 dengan substrat AtMPK4 menggunakan *in vitro phosphorylation assay*. M = SDS protein marker, 1 = GST-AtMEK1ac (0,1  $\mu\text{g}$ ), 2 = GST-AtMEK1ac (0,1  $\mu\text{g}$ ) + GST-AtMPK4kn (1,0  $\mu\text{g}$ ), 3 = GST-AtMEK1ac (0,1  $\mu\text{g}$ ) + GST-AtMPK4kn (1,0  $\mu\text{g}$ ) + GST-EXGT (0,5  $\mu\text{g}$ ), 4 = GST-AtMEK1ac (0,1  $\mu\text{g}$ ) + GST-AtMPK4kn (1,0  $\mu\text{g}$ ) + GST-EXGT (0,8  $\mu\text{g}$ ), 5 = GST-AtMEK1ac (0,05  $\mu\text{g}$ ), 6 = GST-AtMEK1ac (0,05  $\mu\text{g}$ ) + GST-AtMPK4kn (1,0  $\mu\text{g}$ ), 7 = GST-AtMEK1ac (0,05  $\mu\text{g}$ ) + GST-AtMPK4kn (1,0  $\mu\text{g}$ ) + GST-EXGT (0,5  $\mu\text{g}$ ), 8 = GST-AtMEK1ac (0,05  $\mu\text{g}$ ) + GST-AtMPK4kn (1,0  $\mu\text{g}$ ) + GST-EXGT (0,8  $\mu\text{g}$ ), 9 = GST-EXGT (0,8  $\mu\text{g}$ ).



**Gambar 3.** Ilustrasi mekanisme penerusan sinyal pada AtMEK1-AtMPK4 dan pengaruh EXGT. Saat terjadi pelukaan, molekul EXGT berinteraksi dengan AtMEK1 dan kompleks tersebut menyebabkan terjadinya interaksi antara AtMEK1 dan AtMPK4 yang kuat dan stabil. Interaksi tersebut akan mengaktifkan AtMPK4 dan melanjutkan sinyal sampai pada molekul target yang biasanya adalah faktor transkripsi yang mempengaruhi ekspresi gen-gen tertentu yang berhubungan dengan pelukaan.

Hasil dari penelitian ini menambah pengetahuan tentang proses sinyal transduksi pada tanaman dan, ke depan, dapat dimanfaatkan untuk memperbaiki mekanisme tanaman yang mendapatkan cekaman secara umum.

*Co-immunoprecipitation* pada tanaman kontrol, yang tidak dilukai, dapat digunakan sebagai pembandingan bagi tanaman yang dilukai untuk memperkuat hasil ini, sehingga jumlah EXGT yang berinteraksi dengan AtMEK1 dalam tanaman dapat diperkirakan. Percobaan *in vivo* dapat dilakukan untuk membandingkan dengan hasil percobaan *in vitro*.

#### UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih kepada Dr. Takashi Nanmori dan Dr. Daisuke Matsuoka atas bimbingan, dorongan, dan kritikan yang telah diberikan dalam penelitian ini.

#### DAFTAR PUSTAKA

- Alberts, B., A. Johnson, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, and P. Walter. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland, Madison Avenue NY, USA.
- Albert, M., M. Werner, P. Proksch, S.C. Fry, and R. Kaldenhoff. 2004. The cell wall-modifying xyloglucan endotransglycosylase/hydrolase *LeXTH1* is expressed during the defence reaction of tomato against the plant parasite *Cuscuta reflexa*. *Plant Biol.* 6:402-407.
- Causier, B. and B. Davies. 2002. Analysing protein-protein interactions with the yeast two-hybrid system. *Plant Mol. Biol.* 50:855-870.
- Hadiarto, T., T. Nanmori, D. Matsuoka, T. Iwasaki, K. Sato, Y. Fukami, T. Azuma, and T. Yasuda. 2006. Activation of *Arabidopsis* MAP kinase kinase (AtMEKK1) and induction of AtMEKK1-AtMEK1 pathway by wounding. *Planta* 223:708-713.
- Innes, R.W. 2001. Mapping out the roles of MAP kinases in plant defense. *Trends Plant Sci.* 6(9):392-394.
- Matsuoka, D., T. Nanmori, K. Sato, Y. Fukami, U. Kikkawa and T. Yasuda. 2002. Activation of AtMEK1, an *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinase kinase, *in vitro* and *in vivo*: Analysis of active mutants expressed

- in *E. coli* and generation of the active form in stress response in seedlings. *Plant J.* 29:637-647.
- Nakagami, H., A. Pitzschke, and H. Hirt. 2005.** Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Sci.* 10 (7):339-346.
- Nanba, F. 2006.** Identification of EXGT as interacting protein to AtMEK1, an Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase, by yeast two hybrid system. Thesis Master Program of Kobe University, Kobe, Japan.
- Okazawa, K., R. Sato, T. Nakagawa, K. Asada, I. Kato, E. Tomita, and K. Nishitani. 1993.** Molecular cloning and cDNA sequencing of endoxyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that mediates molecular grafting between matrix polysaccharides in plant cell walls. *J. Biol. Chem.* 268(34):25364-25368.
- Peck, S.C. 2006.** Analysis of protein phosphorylation: Methods and strategies for studying kinases and substrates. *Plant J.* 45:512-522.
- Pedley, K.F. and G.B. Martin. 2005.** Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8:541-547.
- Sambrook, J. and D.W. Russell. 2001.** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual Volume 3.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, Woodbury NY, USA.
- Steele, M. Nancy, Z. Sulova, P. Campbell, J. Braam, V. Farkas, and S.C. Fry. 2001.** Ten isoenzymes of xyloglucan endotransglycosylase from plant cell walls select and cleave the donor substrate stochastically. *Biochem. J.* 355:671-679.
- Tanoue, T., M. Adachi, T. Moriguchi, and E. Nishida. 2000.** A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* 2:110-116.
- Teige, M., E. Scheikl, T. Eulgem, R. Doczi, K. Ichimura, K. Shinozaki, J.L. Dangl, and H. Hirt. 2004.** The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Mol. Cell* 15:141-152.
-