



REPUBLIK
ÖSTERREICH
Patentamt

(10) Nummer: **AT 410 215 B**

(12)

PATENTSCHRIFT

(21) Anmeldenummer: A 1880/2000
(22) Anmeldetag: 07.11.2000
(42) Beginn der Patentdauer: 15.07.2002
(45) Ausgabetag: 25.03.2003

(51) Int. Cl.⁷: **C12N 9/12**
C12N 15/54, 15/82, C12Q 1/68

(73) Patentinhaber:
ÖSTERREICHISCHES FORSCHUNGSZENTRUM
SEIBERSDORF GESELLSCHAFT M.B.H.
A-1010 WIEN (AT).

(54) REGULIERUNG VON MITOGEN-AKTIVIERTEN PROTEIN-KINASEN (MAPK)

AT 410 215 B

- (57) Beschrieben sind ein Protein mit einer Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Kinase-Aktivität (MAPKK-Aktivität), umfassend
- a) die Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, oder
 - b) ein Fragment der Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, welches mindestens die 11 Kinase-Domänen, wie in Fig. 2A angegeben, aufweist, oder
 - c) eine Aminosäuresequenz mit mindestens 90% Homologie mit der Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, bei Bestimmung mit dem FAST/A-Algorithmus, und wobei das Protein mit der Aminosäuresequenz a), b) oder c) weiters eine aktivierende Aktivität auf die Salz-Stress-induzierte MAP-Kinase (SIMK) aufweist, DNA-Moleküle, die eine für ein solches Protein codierende Region aufweisen, und Pflanzenzellen und Pflanzen, die solche DNA-Moleküle aufweisen.

Die Erfindung betrifft die Regulierung von Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK).

Die Proteinphosphorylierung ist einer der Hauptmechanismen für die Steuerung von Zellfunktionen als Antwort auf äußere Signale. Bei Eukaryonten spielen die Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPKs), eine spezifische Klasse der Serin/Threonin-Protein-Kinasen, eine Rolle bei vielen dieser Prozesse. Ein allgemeines Merkmal der MAPK-Kaskaden ist ihre Zusammensetzung aus drei funktionell verbundenen Protein-Kinasen. Ein MAPK wird phosphoryliert und dadurch durch eine MAPK-Kinase (MAPKK) aktiviert, welche selbst aktiviert wird durch eine andere Serin/Threonin-Protein-Kinase, eine MAPK-Kinase-Kinase. Die MAPKKs sind Kinasen mit einer Doppelspezifität, die MAPKs phosphorylieren und dadurch sowohl am Threonin- als auch am Tyrosin-Rest des TXY-Phosphorylierungs-Motivs aktivieren. Die MAPKs haben eine zweilappige Struktur, in welcher das ATP in der Spalte zwischen den beiden Lappen gebunden ist, und der C-terminale Lappen bindet das Substrat. Die Kristallstruktur von ERK2, einem Säuger-MAPK, ließ auf die erste Erklärung schließen, warum der unike Doppel-Phosphorylierungsvorgang für die Aktivierung dieser Gruppe der Protein-Kinasen notwendig ist (Zhang et al., 1994). Thr183 und Tyr185 von ERK2 sind in einer Schleife enthalten, die die Kinase-Subdomänen VII und VIII verbindet. Während Thr183 an der Oberfläche der Schleife exponiert und daher für das MAPKK-MEK1 zugänglich ist, ist Tyr185 in einer hydrophoben Tasche vergraben. Da beide Reste für die Aktivierung von ERK2 phosphoryliert sein müssen, muss MEK1 zuerst Thr183 phosphorylieren, was zu einer Konformationsänderung von ERK2 führt, wodurch Tyr185 einer nachfolgenden Phosphorylierung zugänglich wird (Canagarajah et al., 1997).

Eine Signalisierung durch MAPK-Kaskaden kann zu einer Vielfalt verschiedener Auswirkungen führen, einschließlich der Differenzierung und Zellteilung (Robinson und Cobb, 1997), doch sind auch MAPK-Reaktionswege an der Antwort auf verschiedene Stressbelastungen beteiligt. Nukleare Ziele der MAPKs können verschiedene Transkriptionsfaktoren, wie Ste12, c-Jun-Elk-1 und c-Myc sein (Karin und Hunter, 1995), doch können Ziele auch andere Protein-Kinasen, wie MAPK-aktivierte Protein-Kinase-2 (Stokoe et al., 1992), Proteine einschließlich des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors und des Ras-exchange-Faktors Sos, und stromaufwärts gelegene Komponenten der MAPK-Kaskade, wie Raf1 und MEK1 (Whitmarsh und Davis, 1996), sein. Obwohl viele MAPK-Kaskaden in Hefe und in Tieren definiert wurden, bleibt ihre Zusammensetzung in Pflanzen unklar.

Im Gegensatz zu Tieren sind Pflanzen festsitzende Organismen. Um Veränderungen in ihrer Umwelt zu überleben, haben Pflanzen komplexe und differenzierte Wahrnehmungs- und Adaptationssysteme entwickelt, die es ihnen ermöglichen, auf viele Stress-Situationen zu reagieren und sich an diese anzupassen. Zu solcherlei Stress zählen abiotische Faktoren, wie Kälte, Trockenheit, Verletzung, UV-Strahlung und osmotischer Stress, und biotische Faktoren, wie Pathogene. Stress-Reaktionen sind durch ein kompliziertes räumliches und zeitliches Muster von Vorgängen charakterisiert, zu denen unmittelbare Frühreaktionen zählen, die innerhalb von Sekunden und Minuten auftreten, und die die Öffnung von Ionen-Kanälen und die Bildung reaktiver Sauerstoff-Zwischenprodukte inkludieren. Auf diese Vorgänge folgt das Einsetzen der Transkriptionsaktivierung bestimmter Gene und die Erzeugung bestimmter Pflanzenhormone, wie Ethylen und Jasmonsäure. Spätreaktionen treten innerhalb von Stunden und Tagen auf und umfassen die Expression von Genen, die verschiedene Stoffwechselbahnen regulieren oder direkt an Stress-Reaktionen beteiligt sind (Somssich und Hahlbrock, 1998; Maleck und Dietrich, 1999).

MAPKs spielen eine wichtige Rolle bei der Vermittlung von Stress-Reaktionen bei Tieren und bei Hefe.

Bei Pflanzen sind mehrere MAPKs bei der Signalisierung von Hormonen, Stress und Zellzyklus- und Entwicklungsereignissen beteiligt. Kürzlich zeigte es sich, das SIMK (durch Salzstress-induzierte MAPK) aktiviert wird, wenn Luzerne(Alfalfa)-Zellen hyperosmotischen Bedingungen ausgesetzt werden.

Es zeigte sich, dass man Mitglieder des "drei-Kinase-Moduls" in Pflanzen finden kann (zur Information vgl. Ligterink und Hirt, 2000). Im Verständnis von Pflanzen-MAPKs wurden beträchtliche Fortschritte gemacht, und eine Vielfalt von Untersuchungen zeigte, dass MAPKs bei mehreren Aspekten der Entwicklung (Wilson et al., 1997), Zellteilung (Banno et al., 1993; Calderini et al., 1998; Bögre et al., 1999) und Hormonwirkung, einschließlich Auxin (Mizoguchi et al., 1994, Abscissinsäure (Knetsch et al., 1996), Gibberellinsäure (Huttly und Phillips, 1995), Ethylen (Kieber et al.,

1993; Chang, 1996, Salicylsäure (Zhang und Klessig, 1997), und Jasmonsäure (Seo et al., 1995, 1999; Stratmann und Ryan, 1997) eine Rolle spielen. MAPKs werden auch durch biotischen und abiotischen Stress, wie Kälte und Trockenheit (Jonak et al., 1996) und Verletzung (Seo et al., 1995, 1999; Usami et al., 1995; Bögre et al., 1997; Zhang und Klessig, 1998) und während einer Pflanzen-Pathogen-Wechselwirkung (Ligterink et al., 1997; Zhang et al., 1998; Romeis et al., 1999) aktiviert.

Bis heute wurden mehrere MAPKKs aus verschiedenen Pflanzen isoliert, einschließlich AtMEK1 (Morris et al., 1997), AtMKK2, AtMKK3, AtMKK4 und AtMKK5 aus Arabidopsis (Ichimura et al., 1998a, 1998b), TMEK1 aus der Tomate (Hackett et al., 1998), NPK2 aus Tabak (Shibata et al., 1995) und ZmMEK1 aus Mais (Hardin und Wolniak, 1998). Trotz der Klonierung dieser Gene ist es noch immer unklar, auf welchem Weg die Kinasen wirken und welche MAPKS durch sie aktiviert werden. Obwohl eine mögliche MAPK-Kaskade durch Zwei-Hybriden-Analyse in Hefe ("yeast two hybrid analysis") und Funktions-Komplementationstests von Hefe-Mutanten (Mizoguchi et al., 1998) definiert wurden, bleibt noch nachzuweisen, ob diese Kinasen eine Kaskade in Pflanzen bilden. Kürzlich wurde eine neue MAPKK durch einen Zwei-Hybriden-Screen mit einer Tabak-MAPK isoliert, doch konnte die rekombinante MAPKK die jeweilige MAPK nicht phosphorylieren oder aktivieren (Liu et al., 2000).

Die MAPKs werden auch durch verschiedenen Stress in Pflanzen aktiviert (Jonak et al., 1999). Die MAPK-Aktivierung gehört zu den ersten, detektierbaren Signalgebungsereignissen. Kürzlich wurde festgestellt, dass der SIMK-MAPK-Weg durch erhöhte Salzkonzentrationen aktiviert wird (Munnik et al., 1999).

Andere Strategien zur Herstellung Salz-tolerierbarer Pflanzen sind beispielsweise in US 5,639,950, US 5,859,337, WO 99/54489 A1, US 5,965,705 und US 4,594,323 beschrieben.

Die US 5,639,950 betrifft eine DNA-Sequenz einschließlich eines bifunktionellen Enzyms (P5CS genannt) mit sowohl gamma-Glutamylkinase- als auch Glutaminsäure-gamma-Semialdehyd-Dehydrogenase-Aktivitäten, die die ersten beiden Schritte in der Prolinproduktion bei Pflanzen katalysieren. Es wurde beschrieben, dass die Aufnahme dieses Gens in Pflanzen die Salz-Toleranz und die Widerstandsfähigkeit der Pflanzen gegen Trockenheit erhöhen.

Die US 5,859,337 beschreibt Nukleinsäuren, die für Polypeptide codieren, welche Pflanzen und andere Organismen tolerant gegen Salz machen. Diese Polynucleotidsequenzen werden "STZ" oder "STO" genannt.

In der WO 99/54489 A1 ist ein Verfahren zum Erhalt von Pflanzen, die gegenüber abiotischem Stress, insbesondere osmotischem Stress, tolerant sind, beschrieben, wobei einer Pflanze die Fähigkeit verliehen wird, der durch Stress induzierten Phosphorylierung Cyclin-abhängiger Kinase (cyclin dependent kinase, CDK)-Proteine entgegenzuwirken.

Die US 5,965,705 betrifft ein Gen, das als CBF1 bezeichnet ist, welches für ein Protein (CBF1) codiert, das an eine Region bindet, die die Expression von Genen reguliert, welche die Toleranz gegenüber Kälte und Dehydrierung bei Pflanzen fördern. Dieses Gen wird zur Transformation von Mikroorganismen verwendet und kann zur Transformation von Pflanzen verwendet werden.

Die US 4,594,323 betrifft mutierte proBA-Regionen, die vorgesehen werden, um osmotisch empfindlichen Wirten eine osmotische Toleranz zu verleihen. Die mutierte DNA-Sequenz kann mindestens ein Enzym im Biosynthese-Weg für eine Aminosäure, die die gewünschte osmotische Toleranz verleiht, überproduzieren.

MAP-Kinasen, ihre Aktivierung in Säugern und Hefe ist z.B. in der US 5,804,427 oder 5,736,381 beschrieben.

Es erweist sich jedoch, dass die MAP-Kinase selbst kein geeignetes Mittel zur Erhöhung der Salz-Stress-Toleranz in Pflanzen ist, daher werden andere Ziele gesucht, um solche gewünschte Wirkungen hervorzurufen.

Es ist eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel und Verfahren zur Verbesserung der Stress-Toleranz, insbesondere der Salz-Toleranz, bei eukaryontischen Zellen, insbesondere bei Pflanzenzellen, vorzusehen.

Diese Aufgabe wird mittels eines Proteins mit einer Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Kinase-Aktivität (MAPKK-Aktivität) gelöst, welches Protein umfasst:

- a) die Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, oder
- b) ein Fragment der Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, welches mindestens die 11

Kinase-Domänen, wie in Fig. 2A angegeben, aufweist, oder

- c) eine Aminosäuresequenz mit mindestens 90% Identität mit mindestens 50 aufeinander folgenden Aminosäureresten der Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, bei Bestimmung mit dem FAST/A-Algorithmus, und

wobei das Protein mit der Aminosäuresequenz a), b) oder c) weiters eine aktivierende Aktivität auf die Salz-Stress-induzierte MAP-Kinase (SIMK) aufweist.

Die Identität bei der Aminosäuresequenz ist vorzugsweise höher als 95%; insbesondere höher als 98%.

Die SIMKK-Aktivität der vorliegenden Proteine ist für SIMK-Proteine spezifisch.

Im Rahmen der vorliegenden Erfindung wurde eine SIK-MAPK-Kinase (SIMK-Kinase; SIMKK) isoliert, sequenziert und charakterisiert. Die Aminosäuresequenz der Alfalfa-SIMKK ist in Fig. 1 veranschaulicht. Die Nukleinsäuresequenz codiert für eine aktive Protein-Kinase, die mit SIMK spezifisch in Wechselwirkung tritt, jedoch nicht mit drei anderen MAPKs, im Zwei-Hybriden-System in Hefe. Die rekombinante SIMKK aktiviert SIMK spezifisch mittels Phosphorylierung sowohl der Threonin- als auch der Tyrosin-Reste in der Aktivierungsschleife von SIMK. Die SIMKK enthält eine putative MAPK-Andockstelle am N-Terminus, der bei Säuger-MAPK-Kinasen, Transkriptionsfaktoren und Phosphatasen konserviert ist. Das Entfernen der MAPK-Andockstelle von SIMKK schränkt die Wechselwirkung mit SIMK teilweise ein, eliminiert sie jedoch nicht vollständig, was zeigt, dass auch andere Domänen von SIMKK bei der MAPK-Bindung eine Rolle spielen. Bei vorübergehenden Expressionstests aktiviert SIMKK spezifisch die SIMK, zwei andere MAP-Kinasen jedoch nicht. Außerdem verbessert die SIMKK die Salz-induzierte Aktivierung von SIMK. Es zeigte sich, dass beim SIMKK-Protein gemäß der vorliegenden Erfindung die SIMK-Proteine auf effiziente Weise gesteuert werden können, und einem Organismus, insbesondere festsitzenden Organismen, wie Pflanzen, eine verbesserte SIMKK-Aktivität verliehen werden kann. Mit dieser verbesserten SIMKK-Aktivität wird die Stress-Toleranz, insbesondere die Salz-Toleranz, bei solchen Organismen deutlich erhöht.

Die Bestimmung der Aktivierungsaktivität des Proteins gemäß der vorliegenden Erfindung kann beispielsweise gemäß den in den Beispielen beschriebenen Aktivitätstests durchgeführt werden. Die SIMKK-Aktivität der vorliegenden Erfindung ist von anderen MAPKK-Aktivitäten, wie beispielsweise in den Beispielen beschrieben, leicht unterscheidbar.

Die Isolierung von SIMKK verschiedener Organismen kann durch Screenen von cDNA-Bibliotheken, insbesondere Zwei-Hybriden-cDNA-Bibliotheken spezifischer Organismen, vorzugsweise Pflanzen, mit SIMK als Sonde, durchgeführt werden. Das Protein gemäß der vorliegenden Erfindung weist eine spezifische Wechselwirkung mit SIMK auf, es wird keine Wechselwirkung mit anderen MAPKs beobachtet.

Bei Tieren kann man die MAPK-Andockstellen in MAPKKs, Phosphatasen und MAPK-Substraten, einschließlich MAPK-aktivierter Protein-Kinase 2 und Transkriptionsfaktoren finden. Das MAPK-Andock-Motiv ist durch eine Anhäufung positiv geladener Aminosäuren außerhalb der katalytischen Domäne charakterisiert (Jacobs et al., 1999). Kürzlich wurden bei Säuger-MAPKs Substrat-Andockstellen, die zwei negativ geladene Aminosäuren bilden, identifiziert (Tanoue et al., 2000). Es zeigte sich, dass wenn Substrate, Aktivatoren und Regulatoren von ERK2 an ihrer MAPK-Andockstelle mutiert wurden, diese Proteine ihre Fähigkeit zu einer Co-Immunpräzipitation mit ERK2 verloren. Der N-terminale nicht-katalytische Teil von SIMKK enthält auch eine putative MAPK-Andockstelle. Eine Wechselwirkung zwischen SIMK und SIMKK in Abwesenheit der Andockstelle war jedoch noch immer möglich, wenn auch in geringerem Maße.

Kürzlich wurde SIPKK, ein Tabak-MAPKK, isoliert und man stellte fest, dass es mit SIPK, einem Tabak-Homolog von SIMK, in Wechselwirkung steht (Liu et al., 2000). SIPK und SIPKK waren im Zwei-Hybriden-System in Hefe in Wechselwirkung, und SIPK war zu einer Co-Immunpräzipitation mit SIPKK aus Bakterienextrakten fähig. Ein GST-Fusionsprotein von SIPKK konnte MBP *in vitro* phosphorylieren, womit gezeigt wurde, dass SIPKK eine funktionelle Protein-Kinase ist. SIPKK konnte jedoch SIPK weder phosphorylieren noch aktivieren, was darauf hindeutet, dass SIPKK nicht der Aktivator von SIPK ist.

Die MAPKs in allen Eukaryonten werden durch einen posttranslationalen Vorgang aktiviert, an dem die Phosphorylierung eines Threonin- und eines Tyrosin-Restes des sogenannten TXY-Motivs zwischen den Subdomänen VII und VIII beteiligt ist. Die Phosphorylierung des TXY-Motivs erfolgt

durch MAPKKs, welche Kinasen mit einer zweifachen Spezifität sind. Unter Verwendung bakteriell exprimierter GST-Fusionsproteine von Alfalfa SIMKK und SIMK kann gezeigt werden, dass SIMKK SIMK sowohl am Threonin- als auch am Tyrosin-Rest des TXY-Motivs phosphoryliert. Weiters zeigte sich, weil zwei andere MAPKs von Alfalfa nicht durch SIMKK phosphoryliert wurden, dass

5 SIMKK eine Protein-Kinase von SIMK mit einer zweifachen Spezifität ist.

SIMK ist eine durch Salz induzierbare MAPK, die auf moderate hyperosmotische Bedingungen reagiert (Munnik et al., 1999). Obwohl SIMK durch Salz-Stress nur wenig aktiviert wurde, führte eine Co-Expression von SIMKK und SIMK zu wesentlich stärkerer SIMK-Aktivierung als jene, die durch SIMKK alleine erreicht worden war. Da die Salinität zu einem der Hauptfaktoren wird, die die

10 landwirtschaftliche Produktivität einschränken, dient die vorliegende Identifizierung der molekularen Mechanismen der Salz-Stress-Signalisierung nicht nur als wichtiger Beitrag zur grundlegenden Wissenschaft, sondern bietet auch neue Wege, die Stress-Toleranz im Allgemeinen und die Salz-Toleranz insbesondere von empfindlichen Nutzpflanzen zu verbessern.

Ein Weg, festsitzenden Organismen eine verbesserte SIMKK-Aktivität gemäß der vorliegenden Erfindung zu verleihen, ist, Organismen genetisch zu manipulieren, wobei die SIMKK-Aktivität mittels transgener Methoden verstärkt wird.

Ein Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft daher ein DNA-Molekül, das eine Region aufweist, die für ein SIMKK-Protein gemäß der vorliegenden Erfindung codiert. Es ist bevorzugt, dass das DNA-Molekül gemäß der vorliegenden Erfindung die Nukleinsäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, aufweist. Es zeigte sich, dass das DNA-Molekül, das die Nukleinsäuresequenz von Position

20 145 bis Position 1251 aufweist, wie in Fig. 1 angegeben, bestimmten (Pflanzen-)Zellen die Fähigkeit verleiht, mit Stress, insbesondere mit höheren Salzkonzentrationen, besser fertig zu werden.

Die DNA-Moleküle gemäß der vorliegenden Erfindung können eine Sequenz-Identität von mindestens 95% mit den oben beschriebenen DNA-Molekülen aufweisen oder alternativ unter stringenten Bedingungen mit solchen DNA-Molekülen hybridisieren. Ein Beispiel für hoch stringente Hybridisierungsbedingungen ist die Anwendung von 6 x SSC und 65°C.

Auch RNA-Moleküle, welche eine Nukleotidsequenz aufweisen, die der Sequenz der DNA-Moleküle gemäß der vorliegenden Erfindung entspricht, stellen einen Aspekt der vorliegenden Erfindung dar. In diesen RNA-Molekülen ist T selbstverständlich immer durch U ersetzt.

Selbstverständlich bilden auch DNA-Moleküle, die die zu den oben beschriebenen DNA-Molekülen komplementäre Sequenz aufweisen, einen Teil der vorliegenden Erfindung. Bei diesen DNA-Molekülen werden SIMKKs verwandter Organismen identifiziert und mittels allgemeiner Methoden der Molekularbiologie isoliert. Die vorliegende Erfindung betrifft daher die Identifizierung und Isolierung von SIMKK-DNAs und -Proteinen, unter Verwendung bekannter SIMKK-Sequenzen, beispielsweise wie in Fig. 1 angegeben. Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch ein Verfahren zur Identifizierung und Isolierung eines DNA- oder RNA-Moleküls gemäß der vorliegenden Erfindung, umfassend die Schritte des

- Bereitstellen einer markierten Nukleinsäure-Sonde, die für ein Protein gemäß Anspruch 1 oder ein konserviertes Fragment davon codiert,
- Bereitstellen einer Bibliothek von Nukleinsäure-Molekülen, die potentiell ein Nukleinsäure-Molekül enthalten, das für ein SIMKK oder Teile davon codiert,
- Identifizieren der SIMKK codierenden Nukleinsäure-Moleküle mit der markierten Nukleinsäure-Sonde, und gegebenenfalls
- Isolieren des SIMKK codierenden Nukleinsäure-Moleküls.

Mit solchen identifizierten und isolierten Nukleinsäure-Molekülen, die mindestens für einen Teil eines SIMKK-Proteins codieren, kann ein Verfahren zur Expression eines SIMKK-Proteins oder von Teilen davon vorgesehen werden, welches umfasst:

- das Bereitstellen eines Nukleinsäure-Moleküls, das durch das erfindungsgemäße Verfahren isoliert worden ist, in einem Expression-Vektor,
- das Transformieren eines geeigneten Wirts mit dem das Nukleinsäure-Molekül enthaltenden Expressions-Vektor, und
- die Expression des SIMKK-Proteins oder von Teilen davon, das (die) von diesem Nukleinsäure-Molekül codiert worden ist (sind), in einem geeigneten Wirt.

Wenn die DNA-Moleküle gemäß der vorliegenden Erfindung auch für ein funktionelles SIMKK-Protein codieren, das eine geeignete Wirkung auf SIMK aufweist, ist es auch möglich, solche DNA-

Moleküle zur Transformation von Pflanzen oder anderer festsitzender Organismen zu verwenden, um bei solchen Organismen eine höhere Stress-Toleranz zu induzieren.

Zu diesem Zweck sieht die vorliegende Erfindung einen Vektor vor, der ein DNA-Molekül gemäß der vorliegenden Erfindung und geeignete Regulierungselemente aufweist, die eine Transkription eines RNA-Moleküls vom DNA-Molekül gemäß der vorliegenden Erfindung zu ermöglichen. Ein "geeignetes Regulierungselement" in der Bedeutung der vorliegenden Erfindung kann vom Fachmann je nach dem zu transformierenden Organismus leicht ausgewählt werden. Wenn beispielsweise die SIMKK-RNA in einer Pflanzenzelle erzeugt werden sollte, sollte der Vektor ein Regulierungselement enthalten, der diese Transkription in dieser ausgewählten Pflanze oder Pflanzenzelle ermöglicht.

Vorzugsweise umfasst der Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung weiters einen Selektionsmarker.

Eine andere bevorzugte Ausführungsform des Vektors gemäß der vorliegenden Erfindung umfasst einen induzierbaren Promotor als Regulierungselement, insbesondere einen Promotor, der durch Salzkonzentration reguliert wird.

Um eine hohe konstitutive Expression eines Transgens in allen Geweben zu erhalten, wurde bisher der 35S-Blumenkohl-Mosaikvirus-Promotor in großem Umfang verwendet (Holmberg N. und Bülow L., 1998, Trends Pl. Sci. 3:61-66). Dieser Promotor hat mehrere Vorteile. Er hat ein breites Wirtsspektrum und kann sowohl in zweikeimblättrigen als auch in einkeimblättrigen Pflanzen verwendet werden und variiert nur wenig zwischen verschiedenen Organen und Entwicklungsstadien (Benfey P. und Chua N., 1990, Science 250:959-966).

Promotoren für die Expression in besonderen Geweben wurden verwendet und inkludieren den Arabidopsis-Promotor aus dem Rubisco-small subunit-Gen AtS1A, welcher nur die Expression in grünen Geweben steuert (Krebbers et al., 1988, Plant Mol. Biol. 11:745-759), oder der Patatin-Typ I-Promotor, welcher ausschließlich die Expression in Kartoffelknollen vermittelt (Rocha-Sosa M. et al., 1989, EMBO J. 8:23-29).

In verschiedenen Untersuchungen wurden auch unterschiedliche Pflanzen-Promotoren verwendet, die durch Trockenheit, Kälte, Salinität oder Sauerstoffmangel induziert werden (Homberg N. und Bülow L., 1998, Trends Pl. Sci. 3:61-66). Zum Beispiel reagiert der Osmotin-Promotor auf Salinität, Trockenheit und das Hormon Abscisinsäure (Raghothama et al., 1993, Plant Mol. Biol. 23:1117-1128), und der Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase-4-Promotor reagiert auf Sauerstoffmangel (Köhler et al., 1996, Plant J. 10:175-183).

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch eine Pflanzenzelle, die dadurch gekennzeichnet ist, dass sie einen Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung aufweist. Infolge der verstärkten SIMKK-Aktivität weist eine solche Pflanze *in vivo* und *in vitro* eine höhere Toleranz für Salz-Stress oder andere Stress-Faktoren auf.

Vorzugsweise sind der Vektor oder zumindest die SIMKK-Codier- und -Betriebssteile desselben stabil in das Genom der Pflanzenzelle integriert. Gemäß der vorliegenden Erfindung unterscheiden sich die Regulierungselemente der SIMKK in einer bestimmten transformierten Pflanze von den Regulierungselementen der "natürlichen" SIMKK in dieser Pflanze, sofern vorhanden. Dies bedeutet, dass die Integration in das Pflanzengenom an einer nicht natürlicherweise vorkommenden Stelle oder mit einem nicht natürlicherweise vorkommenden Regulierungselement durchgeführt wird ("nicht natürlicherweise" bedeutet, nicht natürlicherweise im Wildtyp dieses spezifischen zu transformierenden Organismus vorhanden).

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung weisen die Pflanzenzellen eine Salz-Toleranz von mindestens 150% der Wildtyp-Zellen auf. Salz-Toleranzen von mehr als 200%, vorzugsweise mehr als 300%, insbesondere mehr als 400%, der Wildtyp-Zelle sind mit der vorliegenden Erfindung leicht erreichbar.

Die vorliegende Erfindung betrifft auch eine Pflanze, die mindestens eine Sub-Population von Pflanzenzellen gemäß der vorliegenden Erfindung aufweist. Eine solche Pflanze hat eine höhere Stress-Toleranz als der Wildtyp, wenn sie die Merkmale gemäß der vorliegenden Erfindung in mindestens einer Sub-Population ihrer Zellen enthält. Diese Sub-Population sollte natürlich groß genug sein, um die Stress-Toleranz (Salz-Toleranz) der Pflanze im Ganzen zu verleihen.

Gemäß einem anderen Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren zur Identifizierung und Isolierung von DNA-Molekülen, die für Proteine mit einer SIMKK-Aktivität codieren,

wobei die DNA-Moleküle gemäß der vorliegenden Erfindung als Sonde verwendet werden. Für ein solches Verfahren ist es bevorzugt, ein Fragment beispielsweise der in Fig. 1 gezeigten DNA-Sequenz zum Screenen auf SIMKK-Homologe in anderen Organismen zu verwenden. Eine geeignete Sonde hat eine Länge von etwa 20 bis 100 Nukleinsäure-Positionen und wird aus konservierten Regionen ausgewählt, z.B. der in Fig. 1 fett gedruckten Region.

Eine solche Sonde kann zum Screenen einer Genbibliothek eines ausgewählten Organismus, z.B. einer DNA-Bibliothek oder einer genomischen Bibliothek, und zur Identifizierung von DNA-Molekülen mit offenen Leserahmen, die potentiell für ein SIMKK-Protein codieren, verwendet werden. Um die SIMKK-Aktivität eines solchen Monierten Proteins zu verifizieren, sollte das Protein exprimiert und auf SIMKK-Aktivität getestet werden, beispielsweise mittels des in den Beispielen der vorliegenden Erfindung beschriebenen Verfahrens.

Gemäß einem anderen Aspekt der vorliegenden Erfindung betrifft sie ein Verfahren zur Erhöhung der Salz-Toleranz in Pflanzen durch Transformation einer Pflanze oder einer Pflanzenzelle mit einem Vektor gemäß der vorliegenden Erfindung.

MAPKKs werden gewöhnlich durch spezifische Protein-Kinasen, genannt MAPKK-Kinasen (MAPKKKs), aktiviert. Obwohl MAPKKKs üblicherweise inaktiv sind und eine Aktivierung durch stromaufwärts befindliche Faktoren benötigen, macht eine Deletion einer Regulierungsregion diese Kinasen oft konstitutiv aktiv. Es zeigte sich, dass dies bei Δ NPK1, der N-terminal trunkierten Version der Tabak-MAPKKK-NPK1 der Fall ist, und eine Co-Expression von Δ NPK1 mit spezifischen MAPKs führte zur Aktivierung der MAP-Kinasen in vivo (Kovtun et al., 2000, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 2940-2945). Es sei bemerkt, dass SIMKK eine in dieser Hinsicht unübliche MAPKK ist, insofern als sie keine Aktivierung durch eine stromaufwärts befindliche MAPKKK braucht, um ihr Substrat, die SIMK-MAPK aktivieren zu können (Fig. 8).

Es ist daher auch möglich, die SIMKK-Aktivität bei bestimmten Pflanzen zu verstärken, indem spezifische aktivierende Moleküle, d.h. MAPKKKs, wie Δ NPK1, angewendet werden.

Die vorliegende Erfindung ist in den folgenden Beispielen und in den Figuren genauer beschrieben. Selbstverständlich ist die vorliegende Erfindung nicht auf diese Beispiele und Figuren eingeschränkt.

Fig. 1. zeigt die Nukleotid-Sequenz und die induzierte Aminosäure-Sequenz von SIMKK-cDNA.

Fig. 2. Alfalfa-SIMKK gehört zu einer Unterfamilie von Pflanzen-MAPKKs und hat ein konserviertes MAPK-Andock-Motiv.

(A) Multiple Ausrichtung der abgeleiteten katalytischen Protein-Kern-Sequenzen von Alfalfa-SIMKK mit AtMEK1 (Morris et al., 1997), AtMKK2, AtMKK3, AtMKK4 und AtMKK5 (Ichimura et al., 1998) aus Arabidopsis, TMEK1 (Hackett, 1998) aus Tomate, NPK2 (Shibata et al., 1995) aus Tabak, und ZmMEK1 (Hardin und Wolniak, 1998) aus Mais. Identische Aminosäuren sind durch Punkte angegeben, Lücken sind durch Bindestriche angegeben, und die putativen Phosphorylierungsstellen sind durch Sternchen angegeben. Die 11 katalytischen Sub-Domänen sind durch römische Ziffern über den jeweiligen Regionen angegeben.

(B) Multiple Ausrichtung putativer MAPK-Andockstellen in verschiedenen MAPKKs. Die MAPK-Andockstellen-Konsensus-Sequenz ist K/R-K/R-K/R-X(1-5)-L/I-X-L/I (Jacobs et al., 1999). Zahlen geben den ersten und letzten Rest in jedem Protein und jeder Domäne an. Die putative MAPK-Andockstelle von SIMKK wurde mit den Motiven von Arabidopsis AtMKK2, AtMKK4 und AtMKK5 (Ichimura et al., 1998), Mais ZmMEK1 (Hardin und Wolniak, 1998), *Drosophila melanogaster* MEK (Tsuda et al., 1993), Human-MEK1 (Zheng und Guan, 1993) und JNKK1 (Lin et al. 1995), und *Saccharomyces cerevisiae* Ste7 (Teague et al., 1986) verglichen.

Fig. 3. Zwei-Hybriden-Wechselwirkungstest zwischen Alfalfa-MAPKs und SIMKK.

GAL4-Aktivierungsdomänen-Fusionen wurden mit GAL4-Bindungsdomänen-Fusionen in PJ69-4A co-transformiert und auf eine Wechselwirkung entweder in einem β -Galactosidase (β -gal)-Filter-Abhebttest oder durch Züchtung auf Ade getestet. Die erste Spalte zeigt die GAL4-Bindungsdomänen(BD)-Fusionen, die auf eine Wechselwirkung mit den GAL4-Aktivierungsdomänen(AD)-Fusionen der zweiten Spalte getestet wurden.

Fig. 4. Die N-terminale MAPK-Andockstelle von SIMKK ist für die Wechselwirkung mit SIMK nicht essentiell.

(A) SIMKK und drei trunkierte Versionen von SIMKK wurden für die Analyse der Zwei-Hybriden-Wechselwirkung in Hefe mit SIMK verwendet. Die drei SIMKK-Konstrukte enthielten entweder

die nicht-katalytische, N-terminale (SIMKK-N) oder die katalytische C-terminale (SIMKK-C) Domäne oder eine trunkierte Version von SIMKK, der die N-terminale Domäne fehlte (SIMKK-K).

(B) Zwei-Hybriden-Wechselwirkungstest zwischen SIMK, SIMKK und trunkierten Versionen von SIMKK. Die SIMKK-Konstrukte wurden mit der GAL4-Bindungsdomäne von pGBT9 fusioniert, in PJ69-4A zusammen mit SIMK-pGAD424 transformiert und durch Züchtung von Transformanten auf SD/Ade und SD/His⁺3-AT auf Wechselwirkung mit SIMK getestet. Die erste Spalte zeigt die GAL4-Bindungsdomänen(BD)-Fusionen, die auf eine Wechselwirkung mit den GAL4-Aktivierungsdomänen(AD)-Fusionen in der zweiten Spalte untersucht wurden.

Fig. 5. SIMKK codiert für eine aktive Kinase.

SIMKK wurde in pGEX-3x kloniert und als GST-Fusionsprotein exprimiert. GST wurde als Kontrolle exprimiert. Affinitätsgeereinigte GST oder GST-SIMKK wurde in Anwesenheit von γ -32P-ATP mit basischem Myelinprotein (myelin basic protein, MBP) oder Histon-H1 (H1) inkubiert. Nach SDS-PAGE wurden die Reaktionsprodukte mittels Coomassie-Blue-Färbung (A) oder Autoradiographie (B) analysiert.

Fig. 6. SIMKK phosphoryliert SIMK.

In vitro-Kinase-Tests von GST-SIMKK alleine und Kinase-negativen MAPKs als Substraten. GST-SIMKK wurde in Anwesenheit von γ -32P-ATP alleine oder mit SIMK(K84R), MMK2(K66R) oder MMK3(K69R) inkubiert. Nach SDS-PAGE wurden die Reaktionsprodukte mittels Coomassie-Blue-Färbung (A) oder Autoradiographie (B) analysiert.

Fig. 7. SIMKK phosphoryliert SIMK am Threonin- und Tyrosin-Rest der Aktivierungsschleife.

Zur Phosphorylierungsanalyse wurden Kinase-inaktive MAPKs, SIMK(K84R), MMK2(K66R) und MMK3(K69R) in Anwesenheit von ATP ohne (-) oder mit (+) SIMKK inkubiert. (A) Die Phosphorylierung des TEY-Motivs der MAPKs wurde nachfolgend durch Immunoblotten mit einem pTEpY-Phospho-spezifischen Antikörper analysiert. Die Phosphorylierung des TEY-Motivs von SIMK(K84R) wurde durch (B) Immunoblotten mit einem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper, (C) Immunoblotten mit einem Phosphothreonin-spezifischen Antikörper und (D) Dünnschichtchromatographie der phosphorylierten Aminosäuren analysiert.

Fig. 8. SIMKK führt zu einer spezifischen Aktivierung von SIMK *in vivo*.

Petersilie-Protoplasten wurden mit dem leeren Vektor pSH9 (Bahnen 1 und 4), pSH9-SIMK-HA (Bahn 2), pSH9-SIMK-HA und pRT101-SIMKK (Bahn 3), pSH9-MMK2 (Bahn 5), pSH9-MMK2 und pRT101-SIMKK (Bahn 6), pSH9-MMK3-HA (Bahn 7), pSH9-MMK3-HA und pRT101-SIMKK (Bahn 8) vorübergehend transformiert. SIMK-HA, MMK2, MMK3-HA und SIMKK wurden unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert.

(A) die SIMK-, MMK3- und MMK2-Aktivität wurde aus Proteinextrakten mittels Immunoprecipitation mit einem HA- oder MMK2-Antikörper, gefolgt von einem *in vitro*-Kinase-Test mit basischem Myelin-Protein (MBP) als Substrat bestimmt. (B) Immunoblots der selben Extrakte, wie in (A) beschrieben, wurden entweder mit HA- oder MMK2-Antikörper durchgeführt.

Fig. 9. SIMKK verstärkt die Salz-induzierte Aktivierung von SIMK *in vivo*.

Petersilie-Protoplasten wurden mit dem leeren Vektor pSH9 (Bahn 1), pSH9-SIMK-HA (Bahnen 2 und 3), pSH9-SIMK-HA und pRT101-SIMKK (Bahnen 4 und 5) vorübergehend transformiert. SIMK-HA und SIMKK wurden unter der Kontrolle des 35S-Promotors exprimiert. Die Zellen wurden 10 min lang mit 250 mM NaCl (Bahnen 3 und 5) behandelt. (A) Die SIMK-Aktivität wurde aus Proteinextrakten durch Immunopräzipitation mit einem HA-Antikörper, gefolgt von einem *in vitro*-Kinase-Test mit MBP als Substrat bestimmt. (B) Immunoblots der selben Extrakte wie in (A) beschrieben wurden mit HA-Antikörper durchgeführt.

Beispiele:

Isolierung und Sequenzanalyse von SIMKK

SIMK in dessen gesamter Länge wurde als Sonde zum Screenen einer Hefe-Zwei-Hybriden-cDNA-Expressionsbibliothek, hergestellt aus in Suspension gezüchteten Zellen von Luzerne (*Medicago sativa*) (Hybri-ZAP; Stratagene), verwendet. Hefe-Stamm PJ69-4A (James et al., 1996) wurde mit einer Effizienz von 15.000 Kolonie-bildenden Einheiten pro Mikrogramm der Bibliothek-DNA transformiert, und etwa 150.000 Transformanten wurden direkt auf Wachstum auf SD/Ade-/Leu-/

Trp- gescreent. Plasmide putativ positiver Klone wurden gerettet und in Hefe re-transformiert. Die Transformanten wurden auf Medium, dem Histidin fehlte, das aber 10 mM 3-Aminotriazol (Sd/His⁺+3-At) enthielt und in Medium, dem Adenin fehlte (SD/Ade⁻) ausplattiert. Positive Klone wurden vollständig sequenziert (T7-Sequencing-Set; Pharmacia).

Klonierung von SIMKK, SIMK, MMK2, MMK3, SAMK, SIK-N, SIK-K und SIK-C in pGAD424 und pGBT9

Mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde der offene Leserahmen von SIMKK als SmaI/XhoI-Fragment in pGAD424 (Clontech, Palo Alto, CA) und pGBT9 (Clontech) kloniert, wobei folgende Primer verwendet wurden:

5'-Primer (MEK4x4): TATACCCGGGAATGAGGCCGATTCAGCTTC;

3'-Primer (MEK4x3): TTTCCCGGGCTCGAGGACGAAGAAAGTATGATCTTG.

SIMK und MMK2 wurden als BamHI-Fragment, wie früher beschrieben, kloniert (Jonak et al., 1995). MMK3 wurde als BamHI-Fragment kloniert, wobei die folgenden Primer verwendet wurden:

MMK3 5'-Primer (M14x1): AAAAGGATCCGTAACAGAATAATCATG;

3'-Primer (M14x2): ATATGGATCCGACCATTTGTGCCAAGTC;

SAMK 5'-Primer (MMK4x1): TTTTGGATCCCAATGGCCAGAGTTAACC;

3'-Primer (M17x2): TATGGATCCTTAAGCATACTCAGGATTG;

SIK-N 5'-Primer (MEK4x4);

3'-Primer (MEK4n3): TTTTGGATCCCTTCCGCTTCCGATCCGGTT;

SIK-K 5'-Primer (MEK4k5): TTTTCCCGGGGAGTCAACAGCTAGTGATTC;

3'-Primer (MEK4x3);

SIK-C 5'-Primer (MEK4c5): ATATCCCGGGGACTGCTTCTCCGGAGTTTAGG;

3'-Primer (MEK4x3).

Nach PCR wurden die offenen Leserahmen der Protein-Kinase-Konstrukte vollständig sequenziert.

Klonierung von SIMKK, SIMK, MMK2 und MMK3 in pGEX-3x und Expression als Glutathion-S-Transferase-Fusionsproteine

SIK wurde als SmaVSmal-PCR-Fragment in pGEX-3x (Pharmacia) kloniert, wobei die folgenden Primer verwendet wurden:

5'-Primer (MEK4x1): TATACCCGGGGAGATGAGGCCGATTCAGCTTC;

3'-Primer (MEK4x2): TTTTCCCGGGTACATTGACGAAGAAAG.

SIMK, MMK2 und MMK3 wurden als BamHVBamHI-Fragment in pGEX-3x kloniert, wobei die oben beschriebenen offenen Leserahmen verwendet wurden. Die Expression von Glutathion-S-Transferase(U1ST)-Fusionsproteinen in *Escherichia coli* und die Affinitätsreinigung wurden, wie beschrieben, durchgeführt (Ausubel et al., 1999). Die Proteinkonzentrationen wurden mittels eines Bio-Rad-Detektionssystems bestimmt.

Bei einem Versuch, die aktivierende Kinase von SIMK zu isolieren, wurde der offene Leserahmen von SIMK mit der GAL4-Bindungsdomäne von pGBT9, einem Sonden-Plasmid, fusioniert. Der Hefestamm PJ69-4A wurde mit diesem Plasmid und einer Alfalfa-pGAD424-cDNA-Bibliothek transformiert, wobei die Pflanzenproteine als Fusion mit der GAL4-Aktivierungsdomäne exprimiert wurden. Etwa 150.000 Transformanten wurden durch Plattieren auf selektivem Medium, dem Adenin, Leucin und Tryptophan fehlte, gescreent. Potentiell positive Klone wurden auf falsch-positive Klone durch Plasmid-Rettung (plasmid rescue) (Robzyk und Kassir, 1992) und Retransformation in PJ69-4A getestet. Die Transformanten wurden auf SD/His⁺+3-AT (Medium, dem Histidin fehlt, das aber 10 mM 3-Aminotriazol enthält) und SD/Ade⁻ (Medium, dem Adenin fehlt) ausplattiert. Drei Klone wurden erhalten, die auf Medium wachsen konnten, dem entweder Adenin oder Histidin fehlte. Die Sequenzierung der Inserts der isolierten Plasmide zeigte, dass eine der cDNAs potentiell für ein Protein der MAPKK-Familie codierte und daher SIMKK (oder SIK, als Kurzform) benannt wurde. Wie in Fig. 2A gezeigt, enthält die 1,5-kb cDNA den gesamten offenen Leserahmen von SIMKK (SIK), der für ein Protein von etwa 42 kD codiert. Das Protein enthält die typischen Merkmale der MAPKKs: 11 katalytische Sub-Domänen und 2 putative Phosphorylierungsstellen (durch Sternchen

in Fig. 2A angegeben), die durch die stromaufwärts befindliche Aktivierungs-Kinase aktiviert werden.

Eine Ausrichtung des katalytischen Kerns von SIMKK mit anderen MAPKKs aus Pflanzen zeigt die große Homologie innerhalb dieser Gen-Familie. Die größte Sequenz-Homologie wurde bei AtMKK4 und AtMKK5 aus Arabidopsis beobachtet (Ichimura et al., 1998).

Wie in Fig. 2B gezeigt, enthält der N-Terminus von SIK auch ein DEJL-Motiv - K/RK/R-K/R-X(1-5)-L/I-X-L/I - von welchem bekannt ist, dass es als eine MAPK-Andockstelle bei Säugern wirkt (Jacobs et al., 1999) und das in Tier- und Hefe-MAPKKs konserviert ist. Die MAPK-Andockstelle scheint in mehreren verschiedenen Pflanzen-MAPKKs konserviert zu sein, weil nicht nur SIK, sondern auch Arabidopsis-AtMKK2, -AtMKK4 und -AtMKK5 und Mais- ZmMEK1 ein putatives MAPK-Andockmotiv enthalten.

Hefe-Stämme, Wachstumsbedingungen, Transformation und β -Galaktosidase-Filter-Test

SD-Medium wurde, wie beschrieben (Sherman et al., 1979), hergestellt. Der Hefe-Stamm PJ69-4A (James et al., 1996) wurde zur Selektion auf Ade- oder His-+3-AT verwendet. Der Stamm HF7C (Feilotter et al., 1994) wurde für den β -Galaktosidase-Filter-Test verwendet. Die Transformation von Hefezellen erfolgte, wie beschrieben (Schiestl und Gietz, 1989). Die Filter-Tests wurden, wie beschrieben (Breeder und Nasmyth, 1985), durchgeführt.

In vitro-Mutagenese

Zur Herstellung von Kinase-negativen Versionen Mitogen-aktivierter Protein-Kinasen (MAPKs) wurden die konservierten Lysin-Reste K84, K66 und K69 von SIMK, MMK2 bzw. MMK3 durch *in vitro*-Mutagenese unter Verwendung des Altered Sites-Sets, wie vom Hersteller (Promega) beschrieben, zu Arginin umgeändert. Die folgenden Oligonukleotide wurden für die *in vitro*-Mutagenese-Reaktion synthetisiert:

SIMKLOF: 5' GCATTTGCAATCTTCATAACCGCGACATGTTC 3';

MMK2LOF: 5' GCCAATCTTCCTAATGGCGAC 3'; und

MMK3LOF: 5' CGCCAATCTTCCTTATCGCAACG 3'.

In vitro-Phosphorylierungs-Tests

GST-Fusions-Proteine wurden in verschiedenen Kombinationen 30 min lang bei Raumtemperatur in 20 mM Hepes, pH 7,4, 15 mM MgCl₂, 5 mM EGTA, 1 mM DTT, 10 μ M ATP und 2 μ Ci von γ -³²P-ATP inkubiert. Das Verhältnis von Enzym zu Substrat war 1:5. Das Reaktionsvolumen betrug 20 μ l. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von 5x SDS-Puffer und 5minütiges Erhitzen auf 95°C gestoppt. Die Proben wurden entweder bei -20°C gefroren oder direkt durch SDS-PAGE auf 10% Gelen analysiert.

Protein-Blotten und Immunodetektion der phosphorylierten GST-MAPKs

Nach der Trennung durch SDS-PAGE wurden die Proteine auf Polyvinyliden-Difluorid-Membranen (Millipore, Bedford, MA) durch Tank-Blotten (über Nacht bei 30 mA; Bio-Rad) transferiert. Der Transfer-Puffer enthielt 50 mM Borsäure und 50 mM Tris-Base. Zur Identifizierung phosphorylierter MAPKs wurden die Membranen 5 min lang in TBS-Tween (0,01 M Tris, pH 8, 0,15 M NaCl und 0,05% Tween 20) gewaschen und 20 min lang in TBS-Tween/0,3% fettfreiem Milchpulver blockiert. Nach dreimaligem, je 20minütigem Waschen wurden die Blots 1,5 h lang mit Biotin-konjugiertem Ziegen-anti-Maus- oder Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper (1:1000; Sigma), der in TBS-Tween verdünnt war, inkubiert. Das Waschen erfolgte dreimal, wie oben beschrieben. Danach wurden die Blots in Streptavidin-Meerrettich-Peroxidase-Konjugat (1:500) inkubiert und wiederum gewaschen. Die Färbe-Reaktion erfolgte in einer frisch zubereiteten Lösung von 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma, verdünnt in TBS plus 0,03% Wasserstoffperoxid). Die verwendeten Antikörper waren ein monoklonaler Phospho-MAPK-Antikörper (1:1000; New England Biolabs, Beverly, MA), ein monoklonaler Phosphotyrosin-Antikörper (1:2000; Sigma), und ein polyklonaler Phosphothreonin-Antikörper

(1:1000; Zymed, San Francisco, CA).

Phosphoaminosäure-Analyse

- 5 Nach einer in vitro-Phosphorylierung von Affinitäts-gereinigtem GST-SIMK-Protein mittels GST-SIMK(K84R) in Anwesenheit von ^{32}P - γ -ATP wurde die Umsetzung durch Proteinfällung mit 20% TCA in Anwesenheit von 50 μg BSA gestoppt. Nach erschöpfendem Waschen mit 10% TCA wurden die Proteine unter Argon mit 6 N HCl bei 110°C 1 h lang hydrolysiert. Das HCl wurde durch Abdampfen unter Vakuum und aufeinander folgende Waschungen mit Wasser eliminiert. Die Aminosäuren wurden in Chromatographie-Lösungsmittel (Isobuttersäure-0,5 M NH_4OH 5:3 (v/v)) re-suspendiert, und die Phosphoaminosäurezusammensetzung wurde durch Autoradiographie nach eindimensionaler Chromatographie auf Celluloseplatten wieder gelöst.

Vorübergehende Expressions-Tests

- 15 Die offenen Leserahmen von SIMK und MMK3 wurden an das C-terminale Dreifach-Haemagglutinin(HA)-Epitop fusioniert und als NcoI/BamHI-Fragment in PSH9 (Holtorf et al., 1995) kloniert. Die offenen Leserahmen von SIK und MMK2 wurden als XhoI/XbaI- und EcoRVKpnI-Fragmente in pRT101 kloniert (Töpfer et al., 1987).
- 20 Versuche betreffend eine vorübergehende Expression und Co-Transformation wurden mit Protoplasten aus in Suspension gezüchteten Petersilie-Zellen durchgeführt. Die Protoplasten wurden wie beschrieben (Dangl, 1987) hergestellt. Fünfzehn bis 30 fg von Plasmid-DNA wurden für die Co-Transformationen verwendet; ein 35S- β -Glucuronidase-Reporter-Konstrukt (Holtorf et al., 1995) wurde verwendet, um die Transformationseffizienz zu evaluieren. Die Versuche wurden mindestens dreimal mit Proben von verschiedenen Protoplasten-Präparationen durchgeführt.

Immunokinase-Tests

- 30 Extrakte wurden aus transformierten Protoplasten 12 bis 16 Stunden nach der Transformation hergestellt. Die Proteinextrakte wurden, wie beschrieben (Jonak et al., 1996), hergestellt. Protoplasten-Extrakte, die 150 μg Gesamtprotein enthielten, wurden entweder mit 5 μl HA-Antikörper (BABCO, Richmond, CA) oder mit 2 AL von MMK2-Antikörper (5 fg von Protein A-gereinigtem Antikörper) (Jonak et al., 1996) und 20 μl Protein G- oder Protein A-Sepharose-Kügelchen (suspendiert in 50 mM Tris, pH 7,4, 250 mM NaCl, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, 0,1% Tween 20, 5 mM NaF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Leupeptin und 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Aprotinin) 2 h lang bei 4°C immunpräzipitiert. Die Kügelchen wurden dreimal mit Puffer I (20 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 100 mM NaCl und 1 % Triton X-100), einmal mit dem selben Puffer, der jedoch 1 M NaCl enthielt, und einmal mit Kinase-Puffer (20 mM Hepes, pH 7,5, 15 mM MgCl_2 , 5 mM EGTA und 1 mM DTT) gewaschen. Die Kinase-Umsetzungen der immunpräzipitierten Proteine wurden in 10 μl Kinase-Puffer, enthaltend 1 mg/ml basisches Myelin-Protein, 0,1 mM ATP und 2 μCi γ - ^{32}P -ATP durchgeführt. Die Protein-Kinase-Umsetzungen wurden 30 min lang bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Reaktionen wurden durch Zugabe von SDS-Proben-Puffer gestoppt. Die Phosphorylierung von basischem Myelin-Protein wurde durch Autoradiographie nach SDS-PAGE analysiert.
- 40 Das Immunoblotten von Protoplasten-Extrakten, enthaltend SIMK-HA, MMK2 und MMK3-HA, erfolgte entweder mit HA-Antikörper, wie vom Hersteller (BABCO) empfohlen, oder mit MMK2-Antikörper, wie beschrieben (Jonak et al., 1996).

SIMKK geht eine spezifische Wechselwirkung mit SIMK ein

- 50 Um festzustellen, ob die Wechselwirkung zwischen SIMKK und SIMK spezifisch ist, wurde getestet, ob SIMKK mit drei anderen Alfa-MAPKs, MMK2 (Jonak et al., 1995), MMK3 (Bögre et al., 1999) und SAMK (Jonak et al., 1996) in Wechselwirkung treten kann. Zu diesem Zweck wurden die offenen Leserahmen von MMK2, MMK3 und SAMK mit der GAL4-Bindungsdomäne von pGBT9 fusioniert und in den Hefe-Stamm PJ69-4A, der bereits SIMKK-pGAD424 enthielt, transformiert. Die Kolonien wurden auf Wachstum auf Ade⁻ und auf eine Wechselwirkung in einem

β -Galactosidase-Filter-Abhebungs-Test getestet. SIMK-pGBT9 wurde als positive Kontrolle verwendet, und der leere Vektor pGAD424 wurde als negative Kontrolle verwendet. Wie in Fig. 3 gezeigt, konnten nur mit SIMK-pGBT9 und SIMKK-pGAD424 co-transformierte Zellen auf Ade⁻ wachsen und zeigten eine Wechselwirkung im β -Galactosidase-Filter-Abhebungs-Test.

Die N-terminale MAPK-Andock-Stelle von SIMKK ist hilfreich, ist jedoch nicht essentiell für eine Wechselwirkung mit SIMK

Es zeigte sich, dass der nicht-katalytische N-Terminus des *Xenopus* MAPKK XMEK für die Wechselwirkung mit dem jeweiligen Frosch-MAPK wichtig ist (Fukuda et al., 1997). Die Andock-Stellen für ERK/MEK und JNK/JNKK-Wechselwirkung wurden definiert (Xia et al., 1998; Jacobs et al., 1999). Eines dieser Wechselwirkungs-Motive ist das sogenannte DEJL-Motiv, welches man auch im N-Terminus von SIMKK (Fig. 2B) findet. Um zu untersuchen, ob das DEJL-Motiv von SIMKK für die Wechselwirkung mit SIMK wichtig ist, wurden drei trunkierte Formen von SIMKK durch Polymerase-Kettenreaktion erzeugt (Fig. 4A). Die drei verschiedenen SIMKK-Konstrukte enthielten entweder die nicht-katalytische N-terminale (SIMKK-N) oder die C-terminale (SIMKK-C) Domäne, oder eine trunkierte Version von SIMKK, der die N-terminale nicht-katalytische Domäne (SIMKK-K) fehlte. Die SIMKK-Konstrukte wurden mit der GAL4-Bindungsdomäne von pGBT9 fusioniert und danach in PJ69-4A zusammen mit SIMK-pGAD424 transformiert. Die SIMKK-Konstrukte wurden auf eine Wechselwirkung mit SIMK getestet, indem Transformanten auf Ade⁻ und His⁺+3-AT-Platten gezüchtet wurden. SIMKK in dessen gesamter Länge wurde als positive Kontrolle verwendet, und der leere Vektor pGAD424 wurde als negative Kontrolle verwendet. Zusätzlich wurden auch SIMKK-N, SIMKK-K und SIMKK-C mit der GAL4-Bindungsdomäne fusioniert und in Kombination mit dem leeren Vektor pGAD424 auf Autoaktivierung getestet. PJ69-4A-Zellen, die mit SIMKK-pGBT9- und SIMK-pGAD424 co-transformiert worden waren, konnten auf Ade⁻ oder His⁺+3-AT wachsen. Dagegen konnten PJ69-4A-Zellen, die mit SIMK-pGAD424 und entweder SIMKK-N-pGBT9 oder SIMKK-C-pGBT9 transformiert worden waren, unter diesen Bedingungen nicht wachsen. Andererseits konnten PJ69-4A-Zellen, die mit SIMK-pGAD424 transformiert worden waren, und die N-terminal trunkierte SIMKK (SIMKK-K) noch immer auf His⁺+3-AT wachsen, sie verloren jedoch ihre Fähigkeit, auf Ade⁻ zu wachsen (Fig. 4B). Diese Ergebnisse zeigen an, dass die N-terminale Verlängerung von SIMKK alleine nicht für eine Wechselwirkung mit SIMK ausreicht. Da jedoch die Deletion des N-Terminus von SIMKK die Wechselwirkung mit SIMK verringert, trägt der N-Terminus noch immer zur Wechselwirkung von SIMKK mit SIMK bei.

SIMKK codiert für eine funktionelle Protein-Kinase

Um zu beweisen, dass SIMKK für eine funktionelle Protein-Kinase codiert, wurde der offene Leserahmen von SIMKK in pGEX-3x cloniert, und ein bakteriell exprimiertes Glutathion-S-Transferase(GST)-SIMKK-Fusionsprotein wurde erzeugt. Das Affinitäts-gereinigte GST-SIMKK-Protein (Fig. 5B) wurde für einen *in vitro*-Kinase-Test zusammen mit dem basischen Myelin-Protein (MBP) und Histon-H1 als Substrate (Fig. 5A) verwendet. SIMKK konnte autophosphorylieren (Fig. 5B) und phosphorylierte sowohl MBP als auch Histon-H1, obwohl es MBP bevorzugte (Fig. 5B). Um die Möglichkeit auszuschließen, dass kontaminierende Protein-Kinasen in der Affinitäts-gereinigten GST-SIMKK-Fraktion vorhanden waren, wurde auch Affinitäts-gereinigtes GST hergestellt, wies jedoch weder eine Autophosphorylierung (Fig. 5B) noch eine Protein-Kinase-Aktivität gegenüber MBP oder Histon-H1 (Fig. 5B) auf. Diese Daten zeigen, dass SIMKK für eine aktive Protein-Kinase codiert, die MBP phosphorylieren kann.

SIMKK phosphoryliert SIMK *in vitro*

Um zu bestimmen, ob SIMKK SIMK als Substrat *in vitro* erkennt, wurde der offene Leserahmen von SIMK in pGEX-3x kloniert und als GST-Fusions-Protein in *Escherichia coli* exprimiert.

Wenn Affinitäts-gereinigtes GST-SIMK-Protein mit GST-SIMKK in Anwesenheit von γ -³²P-ATP inkubiert wurde, wurde ein Anstieg des mit ³²P markierten SIMK beobachtet (Daten nicht angegeben), was anzeigt, dass SIMKK SIMK *in vitro* phosphorylieren kann. Um zwischen einer SIMK-

Autophosphorylierung und einer Markierung durch SIMKK zu unterscheiden, wurde eine Kinase-negative Form von SIMK durch *in vitro*-Mutagenese erzeugt, wobei der Lysin-Rest K84 durch Arginin ersetzt wurde. MMK2 und MMK3, zwei andere MAPKs aus Alfalfa, wurden ebenso an den Positionen K66 bzw. K69 mutiert. Die offenen Leserahmen von SIMK(K84R), MMK2(K66R) und MMK3(K69R) wurden in pGEX-3x cloniert und als GST-Fusionsproteine exprimiert (Fig. 6A). Das Affinitäts-gereinigte GST-SIMK(K84R), GST-MMK2(K66R) und GST-MMK3(K69R) wurden zuerst auf ihre Kinase-Aktivitäten mit MBP als Substrat getestet. Im Gegensatz zu den Wildtyp-GST-Fusions-Proteinen von SIMK, MMK2 und MMK3 (Jonak et al., 1995), zeigten die mutierten Versionen dieser Kinasen keine Autophosphorylierung und keine Phosphorylierung von MBP (Daten nicht angegeben). Bei Verwendung als Substrat für *in vitro*-Kinase-Tests mit SIMKK stellte sich heraus, dass SIMKK GST-SIMK(K84R) stark phosphoryliert und in geringerem Ausmaß auch GST-MMK2(K66R) (Fig. 6B).

SIMKK phosphoryliert SIMK sowohl am Threonin- als auch am Tyrosin-Rest der Aktivierungsschleife

MAPKKs sind Protein-Kinasen mit einer zweifachen Spezifität, die MAPKs durch Phosphorylierung sowohl des Threonin- als auch des Tyrosin-Restes des TXY-Motivs in der Aktivierungsschleife zwischen den Subdomänen VII und VIII aktiviert. Um festzustellen, ob SIMKK als Kinase mit einer zweifachen Spezifität wirkt und ob diese Phosphorylierung für SIMK spezifisch ist, wurde eine Reihe von Immunoblot-Versuchen mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt.

Zur Phosphorylierungsanalyse der MAPKs wurden die Kinase-negativen GST-Fusions-Proteine von SIMK, MMK2 und MMK3 mit oder ohne GST-SIMKK inkubiert. Die Phosphorylierung des TXY-Motivs wurde danach durch Immunoblotten der MAPKs mit einem Satz von drei Antikörpern analysiert. Der monoklonale pTEpY-spezifische Antikörper erkennt selektiv nur jene MAPKs, die phosphorylierte Threonin- und Tyrosin-Reste am TEY-Motiv der Aktivierungsschleife tragen. Nach der Inkubation von SIMK(K84R), MMK2(K66R) und MMK3(K69R) in Abwesenheit von SIMKK detektierte der pTEpY-Antikörper kein Signal (Fig. 7A), was die Unfähigkeit der mutierten Kinasen zu einer Autophosphorylierung am TEY-Motiv demonstriert. Nach Inkubation der MAPKs mit SIMKK wurde der pTEpY-Antikörper ausschließlich an SIMK(K84R) gefunden (Fig. 7B). Diese Daten zeigen, dass SIMKK eine Kinase mit einer zweifachen Spezifität ist, die spezifisch das TEY-Motiv von SIMK phosphoryliert.

Um nachzuweisen, dass die Phosphorylierung von SIMK durch SIMKK sowohl an Tyrosin- als auch an Threonin-Resten stattfindet, wurde phosphoryliertes GST-SIMK(K84R) durch Immunoblot-Analyse entweder mit einem Phosphotyrosin- oder einem Phosphothreonin-Antikörper analysiert. Anstiege sowohl der Tyrosin- (Fig. 7B) als auch der Threonin- (Fig. 7C) -Phosphorylierung von GST-SIMK(K84R) wurden nach Inkubation mit SIMKK beobachtet. Eindimensionale Phosphopeptid-Analyse zeigte auch, dass SIMKK SIMK(K84R) sowohl am Threonin als auch am Tyrosin phosphoryliert (Fig. 7D), was bestätigt, dass SIMKK als Protein-Kinase von SIMK mit Doppel-Spezifität wirkt.

***In vivo*-Aktivierung von SIMK, jedoch nicht von MMK2- oder MMK3, durch SIMKK**

Um zu bestimmen, ob SIMKK SIMK *in vivo* aktivieren kann, wurden SIMK und SIMKK in Protoplasten der Petersilie co-exprimiert. Proteinextrakte aus transformierten Protoplasten wurden hergestellt, und SIMK-Haemagglutinin (HA) wurde mit einem anti-HA-Antikörper immunpräzipitiert. Die SIMK-Aktivität wurde durch *in vitro*-Kinase-Tests mit MBP als Substrat bestimmt. Bei Zellen, die nur mit dem Vektor transformiert wurden, konnte der HA-Antikörper keine MBP-Kinase-Aktivität ausfällen (Fig. 8A, Bahn 1). Ektopisch exprimiertes SIMK alleine zeigte eine relativ geringe Kinase-Aktivität (Fig. 8A, Bahn 2). Dagegen wurde eine mehrfach höhere SIMK-Aktivität erhalten, wenn Zellen sowohl mit SIMK als auch mit SIMKK co-transformiert wurden (Fig. 8A, Bahn 3). Um zu bestimmen, ob SIMKK ein spezifischer Aktivator für SIMK ist, wurden die Versuche mit MMK2 (Fig. 8A, Bahnen 5 und 6) und MMK3 (Fig. 8A, Bahnen 7 und 8) wiederholt. Im Gegensatz zu den SIMK-Ergebnissen wurden keine Anstiege der MMK2- oder MMK3-Aktivität nach Co-Transformation mit SIMKK beobachtet (Fig. 8A, Bahnen 6 bzw. 8). Die Unterschiede in den SIMK-, MMK2-

und MMK3-Kinase-Aktivitäten waren nicht auf verschiedene Protein-Mengen zurückzuführen, wie durch Immunoblotten der Protein-Extrakte mit entweder HA- oder MMK2-Antikörper gezeigt (Fig. 8B), was darauf hinweist, dass SIMKK ein spezifischer Aktivator von SIMK, aber nicht für andere MAPKKs, ist.

SIMKK verstärkt die Salz-induzierte Aktivierung von SIMK

SIMK ist eine Salz-induzierbare MAPK, die durch moderate hyperosmotische Stress-Bedingungen aktiviert wird. Die Behandlung von Zellen mit NaCl mit einer Konzentration von 250 mM führt zur SIMK-Aktivierung, mit einem Maximum bei etwa 10 min (Munnik et al., 1999). Um zu bestimmen, ob möglicherweise SIMKK bei der Vermittlung der SIMK-Aktivierung durch Salz eine Rolle spielt, wurden Petersilie-Zellen vorübergehend mit leerem Vektor (Fig. 9, Bahn 1), SIMK-HA-Expressionsvektor alleine (Fig. 9, Bahnen 2 und 3) oder Expressionsvektoren von SIMK-HA und SIMKK (Fig. 9, Bahnen 4 und 5) transferiert. Nach Immunpräzipitation von SIMK mit HA-Antikörper wurde die SIMK-Kinase-Aktivität durch *in vitro*-Kinase-Tests unter Verwendung von MBP als Substrat bestimmt. Wenn es alleine exprimiert wurde, zeigte SIMK nur eine sehr geringe Kinase-Aktivität (Fig. 9A, Bahn 2) und wurde durch Salz-Stress-Behandlung nur geringfügig induziert (Fig. 9A, Bahn 3). Obwohl SIMK durch Co-Expression mit SIMKK aktiviert werden konnte (Fig. 9A, Bahn 4), verstärkte der Salz-Stress diese Aktivierung beträchtlich (Fig. 9A, Bahn 5). Wie durch Immunoblotten der Protein-Extrakte mit HA-Antikörper gezeigt (Fig. 9B), lagen ähnliche SIMK-Protein-Mengen in den Zellenextrakten vor und können die Unterschiede in SIMK-Aktivitäten, die bei den Immunokinase-Tests beobachtet wurden, nicht erklären. Insgesamt zeigen diese Daten, dass SIMKK bei der Vermittlung der Salz-induzierten Aktivierung von SIMK eine Rolle spielt.

LITERATURSTELLEN

Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidmann, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1999). *Current Protocols in Molecular Biology*. (New York: John Wiley & Sons).

Banno, H., Hirano, K., Nakamura, T., Irie, K., Nomoto, S., Matsumoto, K., and Machida, Y. (1993). NPK1, a tobacco gene that encodes a protein with a domain homologous to yeast BCK1, STE11 and BYR2 protein kinases. *Mol. Cell. Biol.* 13, 4745-4752.

Benfey, P., and Chua, N. (1990). The cauliflower mosaic virus 35S promoter combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250, 959-966.

Bögre, L., Ligterink, W., Meskiene, I., Barker, P.J., Heberle-Bors, E., Huskisson, N.S., and Hirt, H. (1997). Wounding induces the rapid and transient activation of a specific MAP kinase pathway. *Plant Cell* 9, 75-83.

Bögre, L., Calderini, O., Binarova, P., Mattauch, M., Till, S., Kiegerl, S., Jonak, C., Pollaschek, C., Barker, P., Huskisson, N.S., Hirt, H., and Heberle-Bors, E. (1999). A MAP kinase is activated late in plant mitosis and becomes localized to the plane of cell division. *Plant Cell* 11, 101-114.

Breeden, L., and Nasmyth, K. (1985). Regulation of the yeast HO gene. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 50, 643-650.

Calderini, O., Bogre, L., Vicente, O., Binarova, P., Heberle-Bors, E., and Wilson, C. (1998). A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *J. Cell Sci.* 111, 3091-3100.

Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H., and Goldsmith, E.J. (1997). Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell* 90, 859-869.

Chang, C. (1996). The ethylene signal transduction pathway in *Arabidopsis*: an emerging paradigm? *Trends Biochem. Sci.* 21, 129-133.

Dangl, J.L., Hauffe, K.D., Lipphardt, S., Hahlbrock, K., and Scheel, D. (1987). Parsley protoplasts retain differential responsiveness to UV light and fungal elicitor. *EMBO J.* 6, 2551-2556.

Feilotter, H.E., Hannon, G.J., Ruddell, C.J., and Beach, D. (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* 22, 1502-1503.

Fukuda, M., Gotoh, I., Adachi, M., Gotoh, Y., and Nishida, E. (1997). A novel regulatory mechanism in the mitogen-activated protein (MAP) kinase cascade: Role of nuclear export signal

of MAP kinase kinase. *J. Biol. Chem.* 272, 32642-32648.

Hackett, R.M., Oh, S.A., Morris, P.C., und Grierson, D. (1998). A tomato MAP kinase kinase gene differentially regulated during fruit development, leaf senescence, and wounding. *Plant Physiol.* 117, 1526-1531.

5 **Hardin, S.C., und Wolniak, S.M.** (1998). Molecular cloning and characterization of maize ZmMEK1, a protein kinase with a catalytic domain homologous to mitogen- and stress-activated protein kinase kinases. *Planta* 206, 577-584.

Holmber, N., und Bülow, L. (1998). Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends PL Sci.* 3, 61-66.

10 **Holtorf, S., Apel, K., und Bohlmann, H.** (1995). Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 29, 637-646.

Huttly, A., und Phillips, A.L. (1995). Gibberellin-regulated expression in oat aleurone cells of two kineses that show homology to MAP kinase and a ribosomal protein kinase. *Plant Mol. Biol.* 27, 1043-1052.

15 **Ichimura, K., Mizoguchi, T., Hayashida, N., Seki, M., und Shinozaki, K.** (1998a). Molecular cloning and characterization of three cDNAs encoding putative mitogen-activated protein kinase kinases (MAPKKs) in *Arabidopsis thaliana*. *DNA Res.* 5, 341-348.

20 **Ichimura, K., Mizoguchi, T., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K., und Shinozaki, K.** (1998b). Isolation of ATMEKK1 (a MAP kinase kinase kinase)-interacting proteins and analysis of a MAP kinase cascade in *Arabidopsis*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 253, 532-543.

25 **Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J., und Kornfeld, K.** (1999). Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev.* 13, 163-175.

James, P., Halladay, J., und Craig, E.A. (1996). Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. *Genetics* 144, 1425-1436.

Jonak, C., Kiegerl, S., Lloyd, C., Chan, J., und Hirt, H. (1995). MMK2, a novel alfalfa MAP kinase, specifically complements the yeast MPK1 function. *Mol. Gen. Genet.* 248, 686-694.

30 **Jonak, C., Kiegerl, S., Ligterink, W., Barker, P.J., Huskisson, N.S., und Hirt, H.** (1996). Stress signaling in plants: A mitogen-activated protein kinase pathway is activated by cold and drought. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 11274-11279.

Jonak, C., Ligterink, W., und Hirt, H. (1999). MAP kinases in plant signal transduction. *Cell. Mol. Life Sci.* 55, 204-213.

35 **Karin, M., und Hunter, T.** (1995). Transcriptional control by protein phosphorylation: Signal transmission from the cell surface to the nucleus. *Curr. Biol.* 5, 747-757.

Kieber, J.J., Rothenberg, M., Roman, G., Feldmann, K.A., und Ecker, J.R. (1993). CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell* 72, 427-441.

40 **Knetsch, M.L.W., Wang, M., Snaar-Jagalska, B.E., und Heimovaara-Dijkstra, S.** (1996). Absciscic acid induces mitogen-activated protein kinase activation in barley aleurone protoplasts. *Plant Cell* 8, 1061-1067.

Köhler et al. (1996). A promoter for strong and ubiquitous anaerobic gene expression in tobacco. *Plant J.* 10, 175-183.

45 **Kovtun, Y., Chiu, W.-L., Tena, G., und Sheen, J.** (2000). Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 2940-2945.

Krebbers, E. et al. (1988). Four genes in two diverged subfamilies encode the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit polypeptides of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol. Biol.* 11, 745-759.

50 **Ligterink, W., und Hirt, H.** (2000). MAP kinase pathways in plants: versatile signaling tools. *Int. Rev. Cytol.*, in Druck.

Ligterink, W., Kroj, T., zur Nieden, U., Hirt, H., und Scheel, D. (1997). Receptor-mediated activation of a MAP kinase in pathogen defense of plants. *Science* 276, 2054-2057.

55 **Lin, A., Minden, A., Martinetto, H., Claret, F.X., Lange-Carter, C., Mercurio, F., Johnson,**

G.L., und Karin, M. (1995). Identification of a dual specificity kinase that activates the Jun kinases and p38-Mpk2. *Science* 268, 286-290.

Liu, Y., Zhang, S., und Klessig, D.F. (2000). Molecular cloning and characterization of a tobacco MAP kinase kinase that interacts with SIPK. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 13, 118-124.

Maleck, K., und Dietrich, R.A. (1999). Defense on multiple fronts: How do plants cope with diverse enemies? *Trends Plant Sci.* 4, 215-219.

Mizoguchi, T., Gotoh, Y., Nishida, E., Yamaguchi-Shinozaki, K., Hayashida, N., Iwasaki, T., Kamada, H., und Shinozaki, K. (1994). Characterization of two cDNAs that encode MAP kinase homologues in *Arabidopsis thaliana* and analysis of the possible role of auxin in activating such kinase activities in cultured cells. *Plant J.* 5, 111-122.

Mizoguchi, T., Ichimura, K., Irie, K., Morris, P., Giraudat, J., Matsumoto, K., und Shinozaki, K. (1998). Identification of a possible MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana* based on pairwise yeast two-hybrid analysis and functional complementation tests of yeast mutants. *FEBS Lett.* 437, 56-60.

Morris, P.C., Guerrier, D., Leung, J., und Giraudat, J. (1997). Cloning and characterisation of MEK1, an *Arabidopsis* gene encoding a homologue of MAP kinase kinase. *Plant Mol. Biol.* 35, 1057-1064.

Munnik, T., Ligterink, W., Meskiene, I., Calderini, O., Beyerly, J., Musgrave, A., und Hirt, H. (1999). Distinct osmo-sensing protein kinase pathways are involved in signalling moderate and severe hyper-osmotic stress. *Plant J.* 20, 381-388.

Raghothama et al., (1993). Analysis of an osmotically regulated pathogenesis-related osmotin gene promoter. *Plant Mol. Biol.* 23, 1117-1128.

Robinson, M.J., und Cobb, M.H. (1997). Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.* 9, 180-186.

Robzyk, K., und Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Res.* 20, 3790.

Rocha-Sosa, M. et al. (1989). Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J.* 8, 23-29.

Romeis, T., Piedras, P., Zhang, S., Klessig, D.F., Hirt, H., und Jones, J.D. (1999). Rapid Avr9- and Cf-9-dependent activation of MAP kinases in tobacco cell cultures and leaves: Convergence of resistance gene, elicitor, wound, and salicylate responses. *Plant Cell* 11, 273-287.

Schiestl, R.H., und Gietz, R.D. (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr. Genet.* 16, 339-346.

Seo, S., Okamoto, M., Seto, H., Ishizuka, K., Sano, H., und Ohashi, Y. (1995). Tobacco MAP kinase: A possible mediator in wound signal transduction pathways. *Science* 270, 1988-1992.

Seo, S., Sano, H., und Ohashi, Y. (1999). Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11, 289-298.

Sherman, F., Fink, G.R., und Hicks, J.B. (1979). *Methods in Yeast Genetics.* (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press).

Shibata, W., Banno, H., Ito, Y., Hirano, K., Irie, K., Usami, S., Machida, C., und Machida, Y. (1995). A tobacco protein kinase, NPK2, has a domain homologous to a domain found in activators of mitogen-activated protein kinases (MAPKKs). *Mol. Gen. Genet.* 246, 401-410.

Somssich, I.E., und Hahlbrock, K. (1998). Pathogen defence in plants: A paradigm of biological complexity. *Trends Plant Sci.* 3, 86-90.

Stokoe, D., Campbell, D.G., Nakielny, S., Hidaka, H., Leever, S.J., Marshall, C., und Cohen, P. (1992). MAPKAP kinase-2: A novel protein kinase activated by mitogen-activated protein kinase. *EMBO J.* 11, 3985-3994.

Stratmann, J.W., und Ryan, C.A. (1997). Myelin basic protein kinase activity in tomato leaves is induced systemically by wounding and increases in response to systemin and oligosaccharide elicitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 11085-11089.

Tanoue, T., Adachi, M., Moriguchi, T., und Nishida, E. (2000). A conserved docking motif in MAP kinases common to substrates, activators and regulators. *Nat. Cell Biol.* 2, 110-116.

Teague, M.A., Chaleff, D.T., und Errede, B. (1986). Nucleotide sequence of the yeast regulatory gene STE7 predicts a protein homologous to protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 83, 7371-7375.

Töpfer, R., Matzeit, V., Gronenborn, B., Schell, J., und Steinbiss, H.-H. (1987). A set of plant expression vectors for transcriptional and translational fusions. *Nucleic Acids Res.* 15, 5890.

Tsuda, L., Inoue, Y.H., Yoo, M.A., Mizuno, M., Hata, M., Lim, Y.M., Adachi-Yamada, T., Ryo, H., Masamune, Y., und Nishida, Y. (1993). A protein kinase similar to MAP kinase activator acts downstream of the raf kinase in *Drosophila*. *Cell* 72, 407-414.

Usami, S., Banno, H., Ito, Y., Nishihama, R., und Machida, Y. (1995). Cutting activates a 46-kilodalton protein kinase in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 8660-8664.

Whitmarsh, A.J., und Davis, R.J. (1996). Transcription factor AP-1 regulation by mitogen-activated protein kinase signal transduction pathways. *J. Mol. Med.* 74, 589-607.

Wilson, C., Voronin, V., Touraev, A., Vicente, O., und Heberle-Bors, E. (1997). A developmentally regulated MAP kinase activated by hydration in tobacco pollen. *Plant Cell* 9, 2093-2100.

Xia, Y., Wu, Z., Su, B., Murray, B., und Karin, M. (1998). JNKK1 organizes a MAP kinase module through specific and sequential interactions with upstream and downstream components mediated by its amino-terminal extension. *Genes Dev.* 12, 3369-3381.

Zhang, F., Strand, A., Robbins, D., Cobb, M.H., und Goldsmith, E.J. (1994). Atomic structure of the MAP kinase ERK2 at 2.3 Å resolution. *Nature* 367, 704-711.

Zhang, S., und Klessig, D.F. (1997). Salicylic acid activates a 48-kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9, 809-824.

US 5,977,422

Zhang, S., und Klessig, D.F. (1998). The tobacco wounding-activated mitogen-activated protein kinase is encoded by SIPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 7225-7230.

Zhang, S., Du, H., und Klessig, D.F. (1998). Activation of the tobacco SIP kinase by both a cell wall-derived carbohydrate elicitor and purified proteinaceous elicitors from *Phytophthora* spp. *Plant Cell* 10, 435-450.

Zheng, C.F., und Guan, K.L. (1993). Cloning and characterization of two distinct human extracellular signal-regulated kinase activator kinases, MEK1 and MEK2. *J. Biol. Chem.* 268, 11435-11439.

PATENTANSPRÜCHE:

1. Protein mit einer Mitogen-aktivierten Protein-Kinase-Kinase-Aktivität (MAPKK-Aktivität), gekennzeichnet durch
 - a) die Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, oder
 - b) ein Fragment der Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, welches mindestens die 11 Kinase-Domänen, wie in Fig. 2A angegeben, aufweist, oder
 - c) eine Aminosäuresequenz mit mindestens 90% Identität mit der Aminosäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, bei Bestimmung mit dem FAST/A-Algorithmus, und wobei das Protein mit der Aminosäuresequenz a), b) oder c) weiters eine aktivierende Aktivität auf die Salz-Stress-induzierte MAP-Kinase (SIMK) aufweist.
2. DNA-Molekül, gekennzeichnet durch eine Region, die für ein Protein nach Anspruch 1 codiert.
3. DNA-Molekül nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es die Nukleinsäuresequenz, wie in Fig. 1 angegeben, aufweist.
4. DNA-Molekül nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, dass es die Nukleinsäuresequenz von Position 145 bis Position 1251, wie in Fig. 1 angegeben, aufweist.
5. DNA-Molekül mit einer Sequenz-Identität von mindestens 95% mit dem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 2 bis 4.
6. DNA-Molekül, das unter stringenten Bedingungen an das DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 2 bis 4 hybridisiert.
7. DNA-Molekül mit der komplementären Sequenz zu einem DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 2 bis 6.
8. Vektor, gekennzeichnet durch ein DNA-Molekül nach einem der Ansprüche 2 bis 7 und Regulierungselemente, die eine Transkription eines RNA-Moleküls von diesem DNA-Molekül gemäß einem der Ansprüche 2 bis 7 ermöglichen.

9. Vektor nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass er ein Regulierungselement aufweist, das die Transkription in einer Pflanze oder in einer Pflanzenzelle ermöglicht.
10. Vektor nach Anspruch 8 oder 9, dadurch gekennzeichnet, dass er weiters einen Selektionsmarker aufweist.
- 5 11. Vektor nach einem der Ansprüche 8 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Regulierungselement ein induzierbarer Promotor, insbesondere ein durch Salzkonzentration regulierter Promotor, ist.
12. Pflanzenzelle, dadurch gekennzeichnet, dass sie einen Vektor nach einem der Ansprüche 8 bis 11 aufweist.
- 10 13. Pflanzenzelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass sie den Vektor integriert in das Genom der Pflanzenzelle aufweist.
14. Pflanzenzelle nach Anspruch 12 oder 13, dadurch gekennzeichnet, dass sie eine Salztoleranz von mindestens 150% der Wildtyp-Zelle aufweist.
15. Pflanze dadurch gekennzeichnet, dass sie mindestens eine Sub-Population von Pflanzenzellen nach einem der Ansprüche 12 bis 14 aufweist.
- 15 16. RNA-Molekül, gekennzeichnet durch eine Nukleotid-Sequenz entsprechend der Sequenz des DNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 2 bis 7.
17. Verfahren zum Identifizieren und Isolieren eines DNA- oder RNA-Moleküls nach einem der Ansprüche 2 bis 7 und 16, gekennzeichnet durch Schritte:
20
 - Bereitstellen einer markierten Nukleinsäure-Sonde, die für ein Protein nach Anspruch 1 oder ein konserviertes Fragment davon codiert,
 - Bereitstellen einer Bibliothek von Nukleinsäure-Molekülen, die potentiell ein Nukleinsäuremolekül enthält, das für eine SIMKK oder Teile davon codiert,
 - Identifizieren des für die SIMKK codierenden Nukleinsäure-Moleküls mit der markierten
25 Nukleinsäure-Sonde, und gegebenenfalls
 - Isolieren des für die SIMKK codierenden Nukleinsäure-Moleküls.
18. Verfahren zur Expression eines SIMKK-Proteins oder eines Teiles davon, welches gekennzeichnet ist durch :
30
 - Bereitstellen eines Nukleinsäure-Moleküls, das durch das Verfahren nach Anspruch 17 isoliert worden ist, in einem Expressionsvektor,
 - Transformieren eines geeigneten Wirts mit dem das Nukleinsäure-Molekül enthaltenden Expressionsvektor,
 - Expression des SIMKK-Proteins oder von Teilen davon, das (die) vom Nukleinsäure-Molekül codiert ist (sind), in diesem geeigneten Wirt.

HIEZU 6 BLATT ZEICHNUNGEN

CTATTCACTACTCACATCACCATGCTTTCTTTCTTCATTCATATACTTATTATTATTAT 60
TAATTTTTTAATCAATCAATCTAAACTCATATACTTTTATTTCATTTTATTCTTCATATTT 120
TCTTTCATTTGAGAAAGAAATGAGATGAGGCCGATTTCAGCTTCCACCACCAACGCCACC 180
M R P I Q L P P P T A T
GGCTCAGCCACCGCTCCGGTTCACCAACAACAACAACAGCCGCCCTCAACGCCGC 240
G S A T A S G S P N N N N N S R P Q R R
CGCAAAGATCATCTAACTCTACCGCTTCCACAGCGTGACACAAACCTCGCTGTACCACTG 300
R K D H L T L P L P Q R D T N L A V P L
CCGCTGCCACCGTCCGGTGGCAGCGGTGGAAGCGGTGGTGGAGGAAACGGAAGCGGTAGC 360
P L P P S G G S G G S G G G G N G S G S
GGAGGAGCGAGTCAACAGCTAGTGATTCTTTTCCGAGCTAGAAAGATTGAACCGGATC 420
G G A S Q Q L V I P F S E L E R L N R I
GGAAGCGGAAGTGGAGGAACGGTTTACAAAGTAGTTACAAAATCAACGGTTCGTGCTTAT 480
G S G S G G T V Y K V V H K I N G R A Y
GCTTTGAAGGTGATATACGGACATCACGAGGAATCAGTTTCGTTCGTTCAGATCCATCGTGAA 540
A L K V I Y G H H E E S V R R Q I H R E
ATCCAGATCTTCCGTGATGTTGATGATGTTAACGTGGTCAAGTGTTCATGAGATGTACGAT 600
I Q I L R D V D D V N V V K C H E M Y D
CACAACGCTGAGATTCAGGTTTTGCTTGAGTACATGGACGGTGGATCTCTCGAAGGGAAA 660
H N A E I Q V L L E Y M D G G S L E G K
CATATTCCTCAGGAAAATCAACTCGCTGACGTGGCACGTTCAGATCCTCCGTGGACTCGCC 720
H I P Q E N Q L A D V A R Q I L R G L A
TATCTCCACCGTTCGTTCATCGTTTCATCGTATATCAAACCTTCGAATCTGTTGATAAAT 780
Y L H R R H I V H R D I K P S N L L I N
TCACGGAAACAGGTGAAGATCGCTGATTTTGGTGTAGGAAGAATTCTGAATCAAACGATG 840
S R K Q V K I A D F G V G R I L N Q T M
GATCCGTGTAATTCATCGGTAGGAACAATTGCTTACATGTCACCGGAGAGGATAAACACT 900
D P C N S S V G T I A Y M S P E R I N T
GATATCAACGATGGACAATATGATGCATACGCCGGTGATATATGGAGTTTAGGCGTGAGT 960
D I N D G Q Y D A Y A G D I W S L G V S
ATATTGGAGTTTTATATGGGAAGGTTTCCATTTGCGGTTGGTAGACAAGGTGATTGGGCG 1020
I L E F Y M G R F P F A V G R Q G D W A
AGTTTGATGTGTGCAATTTGTATGTCACAACCACCAGAAGCTCCAACGACTGCTTCTCCG 1080
S L M C A I C M S Q P P E A P T T A S P
GAGTTTAGGGATTTTCGTTTCGAGGTGTTTGACAGAGAGACCCGTCGAGGAGATGGACTGCT 1140
E F R D F V S R C L Q R D P S R R W T A
TCGAGGTTGCTTTTCATCCTTTTCTTGTGAGAAATGGTTCTAATCATAATCAGAGTCCT 1200
S R L L S H P F L V R N G S N H N Q S P
CCAAATATGCATCAGTTACTTCTCCACCACCAAGATCACTTCTTCTTAGTTTCGTCAAT 1260
P N M H Q L L P P P P R S L S S
GTAATTTTTGTTGTTTTTTTTTTTTTAATTATTATTATTATTACTATTTTCAAAGATG 1320
AACTGAATTGGTAGCATCAGATGCTGATTGCAGATTGCTGGTTTCAATCACTATTTACAT 1380
GAATCTAGAACTTTTATTTTGGTCATCTTTATTATTATGAATGAATGAACAAAATGTA 1440
ATCCAATGCTTATGCTTCTTTATTATTGCTTAAAAATTATCATGCTTATGTTCTTTpolyA..1495

Fig.1

I		II		III		IV		
SIK:NRIGSGSGT VYKVVH KINGRAYAL KVIYGH HEESVRRQIHREIQILRDVDDVNVVKCHE--MYDHN-AEIQVL								160
AtMKK4:	A.....	I.RPSS	L.....N.....	T.....C.....	E.....NHP	F.Q.	-G.....	153
AtMKK5:	A.....	I.TPTS	PF.....N.....	DT.....C.....	E.....S.....	HP.....D.....	F.....G.....	144
AtMEK1:	KV.....K.....	S.N.QL	K.....LTQOFF	QLNT	TC.A.SQ	LR.NLSSQCPYL	S.YQS-F.HN--GLVSI	142
AtMKK2:	KV.....K.....	S.V.QL	Q.....WT.QFF	QLNID	AI.KA.AQ	LR.NQSSQCPYL	S.YQS-F.DN--GA.SLI	144
TMEK1:	KV.....K.....	N.I.RL	Q.....WT.QFF	QMNID	MRKH.AQ	LR.NQSSQCPYL	S.YQS-F.FDN--GA.SLI	144
NPK2:	GA.....ASSV	QRAI	IP.H.II	K.NIFEK	KRQQLL-T	RT.CEAPCCQGLVEFYGAF	TPDSGQ.SIA	159
AtMKK3:	GA.....ASSV	QRAI	IP.H.II	K.NIFEK	KRQQLL-T	RT.CEAPCHEGLVDFHGAF	SPDSGQ.SIA	159
ZmMEK1:	QV.....K.....	V.QL	R.....WV.TLF	G.QMNIQ	K.VQ	LR.NQATQSPHI	M.QS-F.HN--GV.YLV	145
V		Via		Vib		VII		
SIK:LEYMDGGSLEG-----KHIPQENQLADVARQILRGLAYLHRRHIVHRDIKPSNLLINSRKQVKIADFGVGRILN								229
AtMKK4:	F.....	K.....A.VWK	Q.....LS.....	S.....S.....	A.N.....	S.....A		220
AtMKK5:	F.....	Q.....A.W	QE.....LS.....	S.....S.....	A.N.....	S.....A		213
AtMEK1:	F.....	ADLLKKVGVK	M.S	ICK.V.....C.I	E.R.I.....L.....	H.GE.....T.....	SK.....T	216
AtMKK2:	ADFLKSV	A.DSY	S.IFR	V.Q.....I.....D.....	I.....L.....	H.GE.....T.....	STVMT	218
TMEK1:	ADFLKSV	A.DSY	S.IFR	V.Q.....I.....D.....	I.....L.....	H.GE.....T.....	STVMT	218
NPK2:	ADIIVK	S.....AI	SPM.QKL	N.....S.....CV	L.....A.....V	LKGE.....T.....	ISAG.E	233
AtMKK3:	N.....	ADILKVT	K.....PV	SSLFHKL	Q.....S.....GV	L.....A.....L	LKGE.....T.....	ISAG.E 233
ZmMEK1:	R.....	ADIVKQV	T.L.PY	VLCK.V	E.....Q.....VI	V	RKGE.....T.....	SAV.A 219
VIII		IX						
SIK:QTMDCPNSSVGTIA YMSPERINTDINDGQYDAYAG--DIWSLGVSI LEFYMG RFPFAVGRQGDWAS----LHC								305
AtMKK4:	L.Q	K.....G.....	L.....P	S.....				296
AtMKK5:	L.H	R.....G.....	V.....					289
AtMEK1:	S.SSLA	.F.....YP	S.SGG	DYKS.....LVL	CAT.K.YTPPEHKKGW	--SVYE.VD		282
AtMKK2:	N.AGLA	.TF.....YN	V.NKYGN	--KS.....V.....	CAT.K.Y.PPN	EETWT-SVFE		284
TMEK1:	S.SGLA	.TF.....YN	S.GAYD	--KS.....L.L	CAT.H.YKPPE	.EGW-VNVYE		284
NPK2:	SSIAM	.ATF.....VT	EN	SYPA.....LALF	CGT.E.YTANE	----PVN		293
AtMKK3:	NS.AM	.ATF.....VT	RN	S.SYPA	LALF	CGT.E.YTANE	----PVN	293
ZmMEK1:	SSIGQRDTF	YN	A.....S	STYD.--KS.....L	AAI.....YIPSE	.EGWL-SFYE		284
X		XI						
SIK:AICMSQPPEAPT T-ASPEFRDFVSRCLQRDP SRRTASRLLSHPFLV								349
AtMKK4:	A.....	H.I.C.....	E.GK	RS.MQ	Q.....IL			340
AtMKK5:	A.....	Q.....H.....	C.....S.....	PK.....S.QQ	Q.....IL			333
AtMEK1:	VENP	C.....	SNLF.....CS	I.Q.V.K.....RD	KS.KE.....E.K.VK			329
AtMKK2:	VDQP	AL	SGNF.....LSS	I.T.....K.NS	SS.KE.ME.....N			331
TMEK1:	T.VDQPE	C.....	DQF.....Q	CS.I.A.V	KHQD.LS.ND	M.....IT		331
NPK2:	Q.LDDPS	LSG-HEF	CS	IDA.....KKN	DD.L.EQ	IT		340
AtMKK3:	Q.LDDPS	TP.KQEF	CS	IDA.....K	DA.P.DQ	IT		340
ZmMEK1:	VDQP	S.....	ADQF.....CS	I.S.I.K	AQ	MS.....E.N		331

Fig 2A

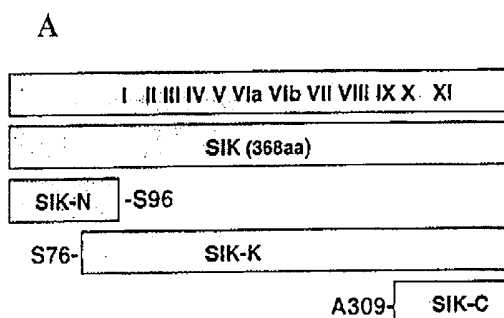
Fig.2A

SIK	28	QRRRKDHLT-LPLPQ	43
AtMKK2	1	M-KKGGFSNNLKLAI	14
AtMKK4	17	RPRRRPDILT-LPLPQ	30
AtMKK5	17	RLKRRPDLS-LPLPH	30
ZmMEK1	1	MKGKKPVKE-LKLTV	14
hMEK1	1	MPKKKPTP-LQLNP	13
dMEK	1	MSKNKLN-LVLPP	12
Ste7	7	LQRRNLKG-LNLNL	19
hJNKK1	38	QGRKA-LKLN	48

Fig.2B

BD-Fusion	AD-Fusion	β -gal-Filter Test	Wachstum auf Ade ⁻
SIMK	SIK	blau	
MMK2	SIK	weiß	
MMK3	SIK	weiß	
SAMK	SIK	weiß	
SIK	SIK	weiß	
SIK	pGAD424	weiß	
SIMK	pGAD424	weiß	
pGBT9	SIK	weiß	
pGBT9	SIMK	weiß	

Fig. 3



B

BD-Fusion	AD-Fusion	Wachstum auf Ade ⁻	Wachstum auf His ⁷ +3AT
SIK	SIMK		
SIK-N	SIMK		
SIK-K	SIMK		
SIK-C	SIMK		
SIK	pGAD424		
SIK-N	pGAD424		
SIK-K	pGAD424		
SIK-C	pGAD424		

Fig. 4

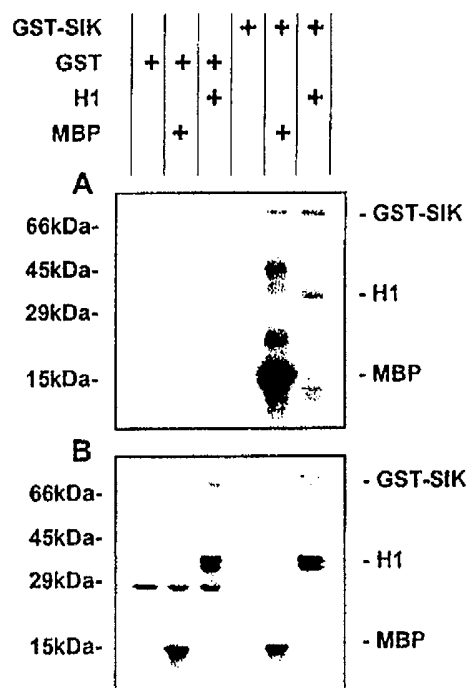


Fig.5

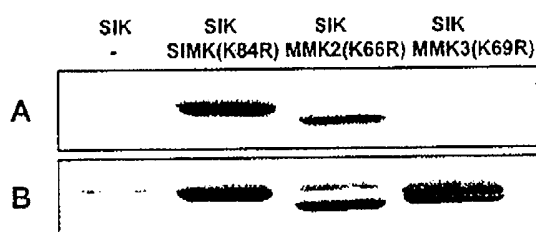


Fig.6

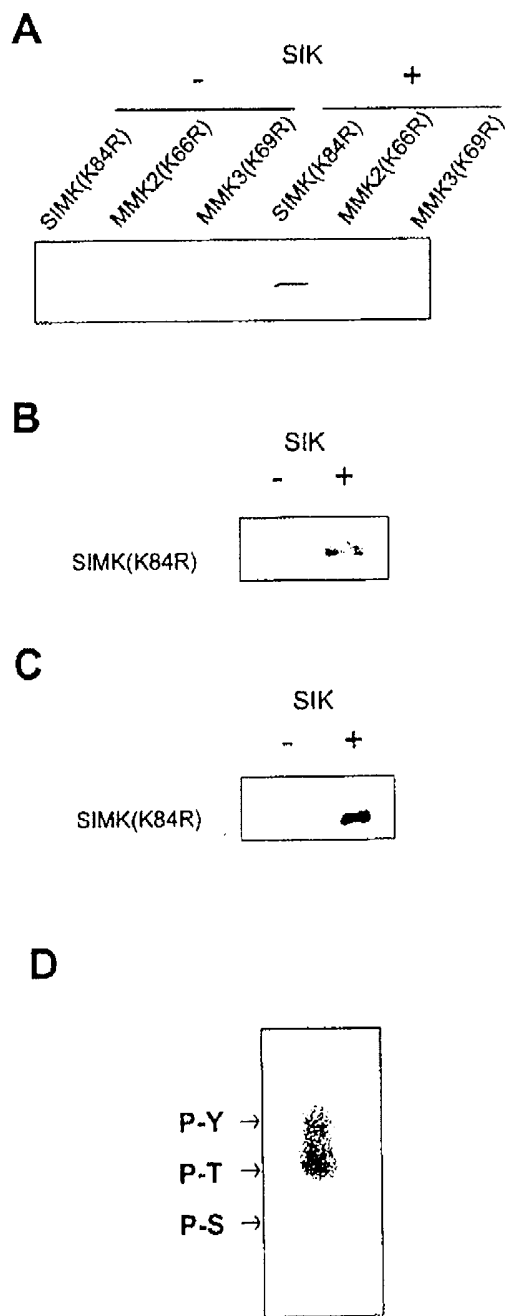


Fig.7

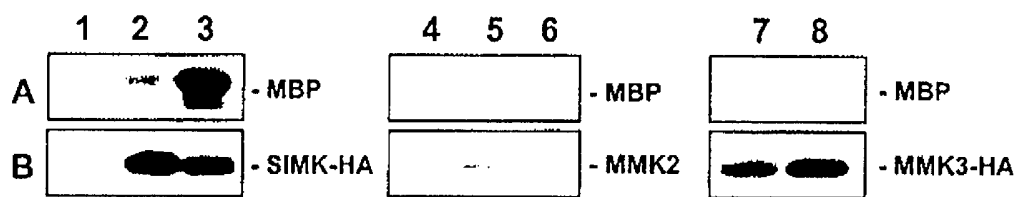


Fig.8

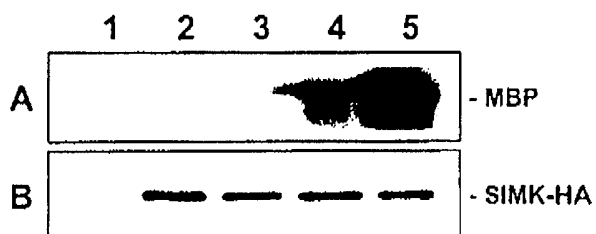


Fig.9