

# Charakterisierung der Abscisinsäure-abhängigen Regulation pflanzlicher Aquaporine

Jan Röder

Vollständiger Abdruck der von der TUM School of Life Sciences der Technischen Universität München zur Erlangung eines  
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)  
genehmigten Dissertation.

Vorsitz: Prof. Dr. Gerd Patrick Bienert

Prüfer der Dissertation:

1. Prof. Dr. Erwin Grill
2. Prof. Dr. Kay Heinrich Schneitz

Die Dissertation wurde am 31.01.2024 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die TUM School of Life Sciences am 15.05.2024 angenommen.



**We all make choices, but in the end our choices make us.**



# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	1
Abbildungsverzeichnis .....	5
Tabellenverzeichnis .....	8
Abkürzungsverzeichnis .....	9
Zusammenfassung .....	12
Summary .....	14
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Biotischer und abiotischer Stress in Pflanzen .....</b>	<b>16</b>
<b>1.2 Regulation des Wasserhaushalts und Wassernutzeffizienz .....</b>	<b>16</b>
<b>1.3 Abscisinsäure .....</b>	<b>18</b>
<b>1.3.1 Abscisinsäure-Signaltransduktion .....</b>	<b>19</b>
<b>1.3.2 Aktivierung von SnRK2s durch osmotischen Stress und ABA .....</b>	<b>21</b>
<b>1.4 MAP3-Kinasen .....</b>	<b>22</b>
<b>1.4.1 RAF-Kinasen .....</b>	<b>23</b>
<b>1.4.2 RAF-Kinasen im Ethylen-Signalweg .....</b>	<b>23</b>
<b>1.5 Aquaporine .....</b>	<b>24</b>
<b>1.5.1 Aufbau, Selektivität und Regulation von Aquaporinen .....</b>	<b>25</b>
<b>1.6 Regulation der Wasserleitfähigkeit .....</b>	<b>27</b>
<b>1.7 Zielsetzung der Arbeit .....</b>	<b>28</b>
<b>2 Ergebnisse .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1 Analyse von RAF-Kinasen im ABA-Signalweg .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.1 Aktivierung von SnRK2s durch RAFs .....</b>	<b>30</b>
<b>2.1.2 RAFs mindern den inhibitorischen Effekt von PP2Cs auf SnRK2s ...</b>	<b>41</b>
<b>2.1.3 Analyse von RAFs auf ABA-Antwort und -Signaltransduktion .....</b>	<b>45</b>
<b>2.2 Charakterisierung der Interaktion von ABA- und Ethylen-Signalweg .....</b>	<b>54</b>

<b>2.3 Analyse verschiedener ABA-Analoga auf ABA-Antwort und die ABA-Signaltransduktion.....</b>	<b>56</b>
<b>2.4 Analyse pflanzlicher Aquaporine in Hefe.....</b>	<b>60</b>
<b>2.4.1 Lokalisations- und Expressionsanalyse von PIP2;1 in Hefe .....</b>	<b>60</b>
<b>2.4.2 Charakterisierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeiten verschiedener pflanzlicher Aquaporine in Hefe.....</b>	<b>61</b>
<b>2.4.3 Heteromerisierungsanalyse von PIP2;1 .....</b>	<b>67</b>
<b>2.5 Analyse von Aquaporinen im ABA-Signalweg .....</b>	<b>69</b>
<b>2.5.1 Steigerung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von Aquaporinen durch SnRK2s .</b>	<b>69</b>
<b>2.5.2 Analyse möglicher Phosphorylierungsstellen von PIP2;1 durch SnRK2.4.....</b>	<b>74</b>
<b>2.5.2.1 Mutantanalyse von Serin 121 im B-loop .....</b>	<b>74</b>
<b>2.5.2.2 Analyse des C-Terminus .....</b>	<b>76</b>
<b>2.5.2.3 Analyse des N-Terminus .....</b>	<b>78</b>
<b>2.5.2.4 Analyse des D-loops.....</b>	<b>81</b>
<b>2.5.3 Analyse des Einflusses von RAFs auf SnRK2s und PIP2;1.....</b>	<b>86</b>
<b>2.5.4 Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung von PP2Cs auf PIP2;1 .....</b>	<b>91</b>
<b>3 Diskussion .....</b>	<b>94</b>
<b>3.1 Hefe als Modellsystem für die Regulation pflanzlicher Aquaporine im ABA-Signalweg .....</b>	<b>94</b>
<b>3.2 Analyse der Phosphorylierungsstelle von PIP2;1 durch SnRK2.4 .....</b>	<b>101</b>
<b>3.3 Einfluss von RAFs auf den ABA-Signalweg .....</b>	<b>107</b>
<b>3.4 Potential von ABA-Analoga .....</b>	<b>111</b>
<b>3.5 Zusammenhang des ABA- und Ethylen-Signalwegs .....</b>	<b>112</b>
<b>4 Material und Methoden .....</b>	<b>117</b>
<b>4.1 Chemikalien .....</b>	<b>117</b>
<b>4.2 Geräte.....</b>	<b>117</b>

4.3 Software und Datenbanken .....	118
4.4 Oligonukleotide .....	120
4.5 Verwendete Organismen .....	120
4.6 Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen.....	121
4.6.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> .....	121
4.6.2 Kultivierung von <i>S. cerevisiae</i> .....	122
4.6.3 Kultivierung von <i>A. thaliana</i> .....	124
4.7 Arbeiten mit DNA .....	124
4.7.1 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> .....	124
4.7.2 Golden-Gate-Klonierung.....	124
4.7.3 Cut-Ligation .....	125
4.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	126
4.7.5 Restriktionsanalyse von DNA.....	126
4.7.6 Agarose-Gelelektrophorese.....	127
4.7.7 Zielgerichtete Mutagenese (SDM) .....	127
4.8 Arbeiten mit Hefe .....	128
4.8.1 Transformation von Hefezellen .....	128
4.8.2 Luciferase-Assay .....	129
4.8.3 H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> -Wachstumsassay .....	130
4.8.4 Stopped-Flow-Spektrophotometrie von Hefe-Sphäroplasten.....	130
4.9 Arbeiten mit Proteinen.....	131
4.9.1 Proteinexpression Hefe .....	131
4.9.2 SDS-PAGE.....	132
4.9.3 Coomassie-Färbung.....	132
4.9.4 Western Blot .....	133
4.10 Arbeiten mit Protoplasten .....	134
4.10.1 Isolierung von Protoplasten .....	134
4.10.2 Transfektion von Protoplasten.....	135

<b>5</b>	<b>Anhang</b> .....	138
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	145
<b>7</b>	<b>Danksagung</b> .....	159



## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1-1 Vereinfachter ABA-Signalweg. ....	20
Abbildung 1-2 Phylogenetischer Stammbaum von B2-, B3- und B4-RAFTs. ....	22
Abbildung 1-3 Übersicht der Aquaporinfamilie in Arabidopsis. ....	25
Abbildung 1-4 3D-Struktur von SoPIP2;1. ....	26
Abbildung 2-1 Aufbau des synthetischen Luciferasereporters. ....	31
Abbildung 2-2 Aktivierung von SnRK2s durch B2-RAF-like kinases. ....	32
Abbildung 2-3 Aktivierung von SnRK2s durch B3-RAF-like kinases. ....	34
Abbildung 2-4 Aktivierung von SnRK2s durch B4-RAF-like kinases. ....	35
Abbildung 2-5 Aktivierung des ABA-Signalwegs in Hefe durch RAF3. ....	37
Abbildung 2-6 In vivo Analyse von RAF3 und SnRK2s in Arabidopsis Protoplasten. ....	39
Abbildung 2-7 Aktivierung des ABA-Signalwegs in Hefe durch RAF24. ....	40
Abbildung 2-8 Wirkung von RAFTs auf den inhibitorischen Effekt von ABI1. ....	41
Abbildung 2-9 Inhibierung der Reporterinduktion von PP2Cs durch RAF3 aktivierte SnRK2s. ....	43
Abbildung 2-10 In vivo Analyse von RAF3 auf HAB1 und SnRK2s in Arabidopsis Protoplasten. ....	44
Abbildung 2-11 Regulation des ABA-Signalwegs bei RAF3 aktivierten SnRK2s. ....	45
Abbildung 2-12 In vivo Analyse von RAF3 und SnRK2s in Arabidopsis Protoplasten. ....	47
Abbildung 2-13 Einfluss von RAF3 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2s der Untergruppe I. ....	48
Abbildung 2-14 Einfluss von RAF3 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2s der Untergruppe II. ....	49
Abbildung 2-15 Einfluss von RAF3 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2s der Untergruppe III. ....	51
Abbildung 2-16 Einfluss von RAF24 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2.4 und SnRK2.6. ....	52
Abbildung 2-17 Einfluss von RAF24 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2s der Untergruppe II. ....	53
Abbildung 2-18 Effekt von RAFTs, ETRs und Ethefon auf SnRK2s. ....	55

<b>Abbildung 2-19 Induktion des ABA-Signalwegs durch verschiedene Liganden in Hefe.....</b>	<b>57</b>
<b>Abbildung 2-20 Rezeptorkomplex-abhängige Aktivierung des ABA-Signalwegs durch Titration von ABA und CCPs in Hefe. ....</b>	<b>59</b>
<b>Abbildung 2-21: Lokalisation und Expression von PIP2;1 in Hefe.....</b>	<b>61</b>
<b>Abbildung 2-22 Hefewachstumsassay auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. ....</b>	<b>63</b>
<b>Abbildung 2-23: Hefewachstumsassay verschiedener Aquaporine. ....</b>	<b>64</b>
<b>Abbildung 2-24 Lokalisation verschiedener PIP2s in Hefe.....</b>	<b>66</b>
<b>Abbildung 2-25 Einfluss der Koexpression von PIP2;1 auf verschiedene PIP exprimierende Hefen. ....</b>	<b>68</b>
<b>Abbildung 2-26 Einfluss verschiedener SnRK2-Kinasen auf PIP2;1. ....</b>	<b>70</b>
<b>Abbildung 2-27 Einfluss von SnRK2.4 auf das Hefewachstum von PIP2s.....</b>	<b>71</b>
<b>Abbildung 2-28 Einfluss von SnRK2s auf das Hefewachstum von PIPs.....</b>	<b>72</b>
<b>Abbildung 2-29 Einfluss von SnRK2s auf das Hefewachstum von TIP1;1.....</b>	<b>73</b>
<b>Abbildung 2-30 Einfluss verschiedener Mutationen von PIP2;1 S121 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.....</b>	<b>75</b>
<b>Abbildung 2-31 Einfluss verschiedener Mutationen des C-Terminus von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.....</b>	<b>77</b>
<b>Abbildung 2-32 Einfluss verschiedener Mutationen des N-Terminus von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.....</b>	<b>79</b>
<b>Abbildung 2-33 Einfluss verschiedener Mutationen des N-Terminus von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.....</b>	<b>80</b>
<b>Abbildung 2-34 Einfluss verschiedener Mutationen des D-loops von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.....</b>	<b>82</b>
<b>Abbildung 2-35 Einfluss verschiedener Mutationen des D-loops von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.....</b>	<b>84</b>
<b>Abbildung 2-36 Einfluss multipler Mutationen von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum. ....</b>	<b>85</b>
<b>Abbildung 2-37 Einfluss von RAF3 auf das Hefewachstum von PIP2;1 und SnRK2s exprimierenden Hefen .....</b>	<b>87</b>
<b>Abbildung 2-38 Einfluss von RAF24 auf das Hefewachstum von PIP2;1 und SnRK2s exprimierenden Hefen .....</b>	<b>88</b>

---

<b>Abbildung 2-39 SnRK2- und PIP2;1-vermittelter Wassertransport in Hefe-Sphäroplasten.....</b>	<b>90</b>
<b>Abbildung 2-40 Einfluss von PP2Cs auf das Hefewachstum von PIP2;1 und SnRK2.4 exprimierenden Hefen .....</b>	<b>91</b>
<b>Abbildung 2-41 Einfluss von RCARs auf das Hefewachstum von PIP2;1, SnRK2.4 und ABI1 exprimierenden Hefen .....</b>	<b>92</b>
<b>Abbildung 3-1 Schematische Darstellung der Regulation von PIP2;1 durch den ABA-Signalweg in Hefe.....</b>	<b>100</b>
<b>Abbildung 3-2 Schematische Darstellung der eingeführten Mutationen des Aquaporins PIP2;1.....</b>	<b>105</b>
<b>Abbildung 3-3 Schematische Darstellung der Kristallstruktur von SoPIP2;1.</b>	<b>106</b>
<b>Abbildung 3-4 Darstellung eines möglichen Schließmechanismus von PIP2;1 .....</b>	<b>107</b>
<b>Abbildung 3-5 Schematische Darstellung der Wirkungsweise der verschiedenen RAFs auf die Untergruppen von SnRK2s .....</b>	<b>108</b>
<b>Abbildung 3-6 Zusammenhang des ABA- und Ethylen-Signalwegs.....</b>	<b>113</b>

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 4-1 Geräteliste.....</b>	<b>117</b>
<b>Tabelle 4-2 Verwendete Organismen .....</b>	<b>120</b>
<b>Tabelle 4-3 Verwendete Antibiotika.....</b>	<b>122</b>
<b>Tabelle 4-4 Ansatz Cut-Ligation .....</b>	<b>125</b>
<b>Tabelle 4-5 PCR-Ansatz.....</b>	<b>126</b>
<b>Tabelle 4-6 PCR-Protokoll.....</b>	<b>126</b>
<b>Tabelle 4-7 Ansatz Restriktionsanalyse.....</b>	<b>127</b>
<b>Tabelle 4-8 SDM-Ansatz .....</b>	<b>128</b>
<b>Tabelle 4-9 SDM-Protokoll .....</b>	<b>128</b>
<b>Tabelle 4-10 Ansatz Hefetransformation .....</b>	<b>129</b>
<b>Tabelle 4-11 Ansatz SDS-Gele .....</b>	<b>132</b>
<b>Tabelle 5-1 Verwendete Oligonukleotide .....</b>	<b>138</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Alanin
<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	Abscisinsäure
Abb.	Abbildung
ABF	<i>ABRE binding factor</i>
ABI1	<i>ABA-INSENSITIVE 1</i>
ABRE	<i>abscisic acid-responsive elements</i>
bp	Basenpaare
bzip	<i>basic leucine zipper transcription factors</i>
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
Cd <sup>2+</sup>	Cadmium
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
Col-0	Columbia-0
CTR1	<i>constitutive triple response 1</i>
D	Asparaginsäure
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
for.	<i>forward</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ER	endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
EtOH	Ethanol
ETR1	<i>Ethylene Receptor 1</i>
ETR-HK	ETR-Histidinkinase
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GUS	β-Glucuronidase
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid

---

kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LUC	Luciferase
EV/LV	<i>empty vector</i> /Leervektor
M/m	Mol/molar
MAP3K/MAPKKK	<i>mitogen activated protein kinase kinase kinases</i>
mg	Milligramm
MEK	<i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
min	Minute(n)
MIP	<i>major intrinsic protein</i>
ml	Milliliter
mQ H <sub>2</sub> O	Reinstwasser
NIP	<i>Nodulin26-like intrinsic proteins</i>
nm	Nanometer
NPA	Asparagin-Prolin-Alanin
OST	<i>Open stomata 1</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIP	<i>plasma membrane intrinsic proteins</i>
PP2C	Typ 2C Proteinphosphatasen
<i>P.patens</i>	<i>Physcomitrella patens</i>
PYL	<i>Pyrabactin Resistant-Like</i>
PYR	<i>Pyrabactin Resistant</i>
RAF	<i>rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RAFTs	<i>RAF-like protein kinases</i>
RCAR	<i>regulatory component of ABA receptor</i>
rev.	reverse
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde(n)
S	Serin
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>Synthetic dropout</i>
SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i> , Natriumdodecylsulfat

SLAC1	<i>SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1</i>
SnRK2	<i>Sucrose non-fermenting 1 (SNF1)-Related Proteinkinases 2</i>
SIP	<i>small basic intrinsic proteins</i>
T	Threonin
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TIP	<i>tonoplast intrinsic protein</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i>
V	Volt
WUE	Wassernutzeffizienz
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

## Zusammenfassung

Durch das durch Trockenstress gebildete Phytohormon Abscisinsäure (ABA) und die dadurch ausgelösten Anpassungen, wie Stomataschluss, Wasserleitfähigkeit und Gentranskription, wird der Wasserfluss innerhalb der Pflanze reguliert. Die primär am ABA-Signalweg beteiligten Komponenten bestehen aus vierzehn Rezeptoren (RCARs), neun inhibitorischen Phosphatasen (PP2Cs), zehn aktivierenden Kinasen (SnRK2s) und vier Transkriptionsfaktoren (ABFs). Aufgrund der funktionalen Redundanz der am ABA-Signalweg beteiligten Proteinfamilien ist eine Analyse der Wirkung einzelner Komponenten auf bestimmte Zielproteine, wie Aquaporine, in der Modellpflanze *Arabidopsis* schwierig. Deshalb wurde in dieser Arbeit der heterologe Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäcker- bzw. Bierhefe) benutzt, um die Wirkung einzelner Komponenten des ABA-Signalwegs auf ein einzelnes Zielprotein, ohne den Hintergrund des pflanzlichen Proteoms, zu analysieren und so die ABA-abhängige Regulation von Aquaporinen bzw. deren Regulationsmechanismen aufzuklären.

So konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass nicht nur das bereits bekannte OST1 (*Open Stomata 1*) einen positiven regulatorischen Effekt auf das prototypische Aquaporin PIP2;1 zeigt, sondern ebenfalls vier weitere SnRK2s, die in Hefe aktiv sind. Weiterhin konnte nach vorheriger Aktivierung der in Hefe inaktiven SnRK2s durch MAP3Ks eine Stimulation von PIP2;1 durch alle zehn SnRK2s aus *Arabidopsis* festgestellt werden. Auch andere Proteine der Aquaporinfamilie konnten durch SnRK2-Kinasen stimuliert werden. Der aktivierende Effekt der Kinasen konnte weiterhin durch Proteine der Familie der PP2Cs inhibiert werden. Durch die zusätzliche Expression von ABA-Rezeptoren kam es weiterhin für RCAR3 und RCAR4, welche bereits ohne ABA aktiv sind und PP2Cs binden und inhibieren können, wieder zu einer erhöhten Steigerung der Leitfähigkeit von durch SnRK2s stimuliertem PIP2;1. Hierdurch konnte eine Regulation von Aquaporinen durch die gesamte ABA-Signalkaskade gezeigt und so die Rolle von ABA bzw. Trockenstress in der Regulation von Aquaporinen bestätigt werden.

Die Frage, an welcher Aminosäure Aquaporine durch SnRK2s phosphoryliert werden konnte auch in dieser Arbeit nicht eindeutig gelöst werden. Hier wurde eine detaillierte Analyse von vermeintlichen regulatorischen Stellen des N- und C-terminus, sowie des B- und D-loops des Proteins durch phosphomimetische und phosphoablative



Mutationen in Hefe durchgeführt, wobei keine der getesteten Modifikationen zu einem konstitutiv aktivem Aquaporin geführt hat und diese weiterhin durch SnRK2-Kinasen aktivierbar waren. Vermutlich spielt das in heterologen Organismen nicht analysierbare Serin 121 in Kombination mit anderen Modifikationen eine entscheidende Rolle bei der Öffnung bzw. Schließung des Kanals.

Weiterhin wurde die Aktivierung von SnRK2s durch die kürzlich im ABA-Signalweg neu entdeckten MAP3Ks durch die Analyse der Gruppe der *B3-* bzw. *B4-RAF like kinases* gezeigt. So konnten SnRK2s, die in Hefe bislang nicht aktiv waren, durch die Koexpression von 13 von 18 RAF-Proteinen aktiviert werden. Durch die zusätzliche Expression von PP2Cs bzw. RCARs wurden unterschiedliche Effekte von RAF3 bzw. RAF24 auf die verschiedenen Untergruppen an SnRK2s deutlich. So konnten durch RAF3 aktivierte SnRK2s der Untergruppe III nicht mehr durch PP2Cs bzw. durch ABA in Kombination mit RCARs reguliert werden. Durch das B4-RAF RAF24 konnte dieser Effekt hingegen nur auf SnRK2s der Untergruppe I festgestellt werden, was eine Spezifität der unterschiedlichen RAFs auf verschiedene SnRK2-Untergruppen aufzeigt.

Das durch den Ethylen-Rezeptor ETR1 (*Ethylene Receptor 1*) stimulierte RAF1 bzw. CTR1 (*Constitutive Triple Response 1*) konnte die Aktivität von SnRK2s weiter steigern, wodurch erneut eine Konnektivität des ABA- und Ethylen-Signalwegs durch die direkte Interaktion von Komponenten der jeweiligen Signalwege bestätigt werden konnte.

Die in dieser Studie getesteten ABA-Analoga konnten in Hefe mit verschiedenen Rezeptorkomplexen interagieren und somit die ABA-Antwort auslösen, wenn auch mit meist geringerer Effizienz als das natürlich vorkommende Phytohormon.

## Summary

The water flow within the plant is regulated by the phytohormone abscisic acid (ABA), which is produced by drought stress and results in adaptations such as stomata closing, water conductivity and gene transcription. The primary components involved in the ABA signaling pathway consist of fourteen receptors (RCARs), nine inhibitory phosphatases (PP2Cs), ten activating kinases (SnRK2s) and four transcription factors (ABFs). Due to the functional redundancy of the protein families involved in the ABA signaling pathway, an analysis of the effect of individual components on specific target proteins, such as aquaporins, in the model plant *Arabidopsis* is difficult. Therefore, in this work, the heterologous model organism *Saccharomyces cerevisiae* (baker's or brewer's yeast) was used to analyse the effect of individual components of the ABA signaling pathway on a single target protein, without the background of the plant proteome, to clarify the ABA-dependent regulation of aquaporins and their regulatory mechanisms.

This study showed that in addition to the already known OST1 (*Open Stomata 1*) having a positive regulatory effect on the prototypical aquaporin PIP2;1 also four other SnRK2s that are active in yeast show this effect. Furthermore, after previous activation of the in yeast inactive SnRK2s by MAP3Ks, stimulation of PIP2;1 by all ten SnRK2s from *Arabidopsis* was detected. Other proteins of the aquaporin family could also be stimulated by SnRK2 kinases. The activating effect of the kinases could further be inhibited by proteins of the PP2C family. The additional expression of ABA receptors, RCAR3 and RCAR4, which are already active without ABA and can bind and inhibit PP2Cs, led again to an increase in the conductivity of SnRK2 stimulated PIP2;1. This showed the regulation of aquaporins by the entire ABA signaling cascade and thus confirmed the role of ABA or drought stress in the regulation of aquaporins.

The question which amino acids of aquaporins are phosphorylated by SnRK2s could not be clearly solved in this work either. Here, a detailed analysis of putative regulatory sites of the N- and C-terminus, as well as the B- and D-loops of the protein was carried out by phosphomimetic and phosphoablative mutations in yeast, whereby none of the tested modifications led to a constitutively active aquaporin which could further be activated by SnRK2 kinases. It is assumed that serine 121, which cannot be analysed in heterologous organisms, probably plays a crucial role in the opening and closing of the channel in combination with other modifications.

Furthermore, the activation of SnRK2s by the recently discovered MAP3Ks in the ABA signaling pathway was demonstrated by the analysis of the group of *B3- and B4-RAF like kinases*. SnRK2s, which were previously not active in yeast, could be activated by co-expression of 13 of 18 RAF members. The additional expression of PP2Cs or RCARs revealed different effects of RAF3 or RAF24 on the different subgroups of SnRK2s. SnRK2s of subgroup III activated by RAF3 could no longer be regulated by PP2Cs or by ABA in combination with RCARs. Regarding B4-RAF RAF24, this effect could only be detected on SnRK2s of subgroup I, which shows the specificity of RAFs on different SnRK2 subgroups.

RAF1 or CTR1 (*Constitutive Triple Repsonse 1*) stimulated by the ethylene receptor ETR1 (*Ethylene Receptor 1*) was able to further increase the activity of SnRK2s, once again confirming the connectivity of the ABA and ethylene signaling pathways through the direct interaction of components of the respective signaling pathways.

The ABA analogs tested in this study were able to interact with various receptor complexes in yeast and thus trigger the ABA response, although usually with lower efficiency than the naturally occurring phytohormone.

# 1 Einleitung

## 1.1 Biotischer und abiotischer Stress in Pflanzen

Als sessile Organismen müssen sich Pflanzen zum Teil ständig wechselnden Umwelteinflüssen anpassen um das bestmögliche Wachstum zu garantieren. Dazu reagieren sie mit morphologischen, physiologischen und biochemischen Anpassungen auf diverse Stressfaktoren, die sonst zu einer Stressreaktion und damit zu einer Beeinträchtigung des Wachstums oder der Vermehrungsfähigkeit führen, was reduzierte Ernteerträge und Qualitätsminderung zur Folge haben kann (Wang et al. 2001). Grundsätzlich wird zwischen biotischen und abiotischen Stressfaktoren unterschieden. Während biotische Stressfaktoren, wie Pathogene und Fressfeinde, nur einen geringen Einfluss auf den Ertrag haben, führen abiotische Stressoren, wie Trockenheit, Hitze, Frost und Salzstress zu Ernteverlusten von über 50% (Boyer 1982).

Um den Bedarf an Nahrung der Weltbevölkerung zu gewährleisten, müssen die Erträge bis 2050 jedoch um 50% gesteigert werden (Tilman et al. 2002). Zusätzlich zu den zunehmenden abiotischen Stressfaktoren erschweren die globale Wasserknappheit, sowie die zunehmende Versalzung von Böden und Wasser eine mögliche Verbesserung des Pflanzenwachstums und Ertragssteigerung, weshalb es ein Hauptaugenmerk der aktuellen Forschung ist, die pflanzlichen abiotischen Stressreaktionen besser zu verstehen und dadurch stresstolerante Pflanzen zu generieren.

## 1.2 Regulation des Wasserhaushalts und Wassernutzeffizienz

Durch die limitierte Wasserverfügbarkeit und die geringe Wassernutzungseffizienz (WUE) von Pflanzen, stellt Wasser den wichtigsten und limitierenden Faktor im Hinblick auf Ertrag und Ertragssicherheit dar (Boyer 1982). Die Wassernutzungseffizienz beschreibt den Zusammenhang von Pflanzenproduktivität zu Wasserverbrauch. Eine Steigerung der WUE ohne eine mögliche Einschränkung des Wachstums der Pflanze würde zu einer Ertragssteigerung bei gleichbleibender Wassernutzung führen und scheint durch Manipulation von Proteinen, welche in der Stressantwort beteiligt sind, möglich zu sein (Yang et al. 2016).

Pflanzen benötigen um zu wachsen, zusätzlich zu Wasser, drei weitere grundlegende Ressourcen: Licht, Nährstoffe und eine Kohlenstoffquelle. Wasser und Nährstoffe werden aus der unmittelbaren Umgebung über das Wurzelnetzwerk aufgenommen. Atmosphärisches Kohlenstoffdioxid ( $\text{CO}_2$ ) dient als Kohlenstoffquelle für die Photosynthese und wird über die pflanzlichen Spaltöffnungen, sogenannte Stomata, welche sich meist in der unteren Epidermis der Blätter befinden, direkt aus der Atmosphäre absorbiert. Das Stoma wird von zwei benachbarten Schließzellen gebildet und reguliert den Gasaustausch mit der Umgebungsluft (Zhao and Sack 1999) durch die partiellen Gasdruckunterschiede, die im Inneren der Pflanzen im Vergleich zur Umgebungsluft herrschen (Farquhar et al. 1989). Bei diesem Prozess verliert die Pflanze jedoch gleichzeitig Wasserdampf im Austausch für Kohlenstoffdioxid, weshalb dieser Prozess strikt reguliert werden muss. Das Öffnen und Schließen der Stomata wird über das Volumen der Schließzellen reguliert (Raschke 1975). Hierbei strömen Wasser und Ionen in die Schließzellen hinein, bzw. aus diesen heraus (MacRobbie 1998). Bei der Regulierung des Öffnungsgrades der Pore spielen unter anderem pathogene Effektormoleküle, wie flg22, Bestandteil bakterieller Flagellen, oder Chitin, Hauptbestandteil der Zellwand von Pilzen, welche bei Detektion die Stomata schließen und so ein Eindringen der Pathogene verhindern, eine Rolle. Weiterhin wichtig sind auch pflanzliche Hormone, wie Abscisinsäure (ABA), welche bei Trockenstress gebildet wird und ebenfalls zur Schließung der Stomata führt, um einen zu großen Wasserverlust durch Verdunstung über die Pore zu verhindern (Kim et al. 2010, Murata et al. 2015).

Wasser kann durch verschiedene Mechanismen innerhalb der Pflanze transportiert werden. Beim lateralen Transport durch pflanzliches Gewebe unterscheidet man zwischen dem Weg innerhalb des Cytoplasmas über Plasmodesmata (symplastisch), innerhalb der Zellwände um den Apoplasten (apoplastisch) und dem Weg über Zellmembranen durch Wasserkanäle so genannte Aquaporine (transzellulär). Beim Langstreckentransport strömt das Wasser nach der Aufnahme über das Wurzelnetzwerk durch das Wasserleitgewebe (Xylem) der Wurzeln und des Sprosses in die Blätter (Steudle and Peterson 1998, Javot et al. 2003).

Um ihren Wasserhaushalt aufrecht zu halten und dem Wasserverlust durch Verdunstung bei der  $\text{CO}_2$ -Absorption entgegenzuwirken, ist ein großer kontinuierlicher Wasserfluss von der Wurzel bis zur substomatären Kammer nötig. Kommt es zu

Wassermangel wird ein hydraulisches Signal in der Pflanze ausgelöst und über weite Strecken in der Pflanze transportiert, was die Bildung des Phytohormons Abscisinsäure induziert um den Wasserfluss in der Pflanze zu regulieren und einem zu großen Wasserverlust entgegenzuwirken (Christmann et al. 2007).

### 1.3 Abscisinsäure

Abscisinsäure wurde in den 1960er-Jahren von mehreren Forschungsgruppen unabhängig voneinander entdeckt und folglich auch zunächst unterschiedlich benannt. Die Forschungsarbeiten beschäftigten sich mit wachstumshemmenden Stoffen und den damit verbundenen Prozessen wie Abszission, Dormanz und Keimung (Addicott and Lyon 1969). Nach der Entdeckung und Isolation einer Abszission-fördernden Substanz aus Baumwollfrüchten wurde die Verbindung zunächst Abscisin II genannt (Ohkuma et al. 1963). Eine als Dormin bezeichnete wachstumshemmende Substanz aus Bergahornblättern, sowie Inhibitor- $\beta$  aus Kartoffelknollen wurden über mehrere chemischen Analysen als identische Verbindung identifiziert und schließlich einheitlich als Abscisinsäure bezeichnet (Cornforth et al. 1965, Milborrow 1967).

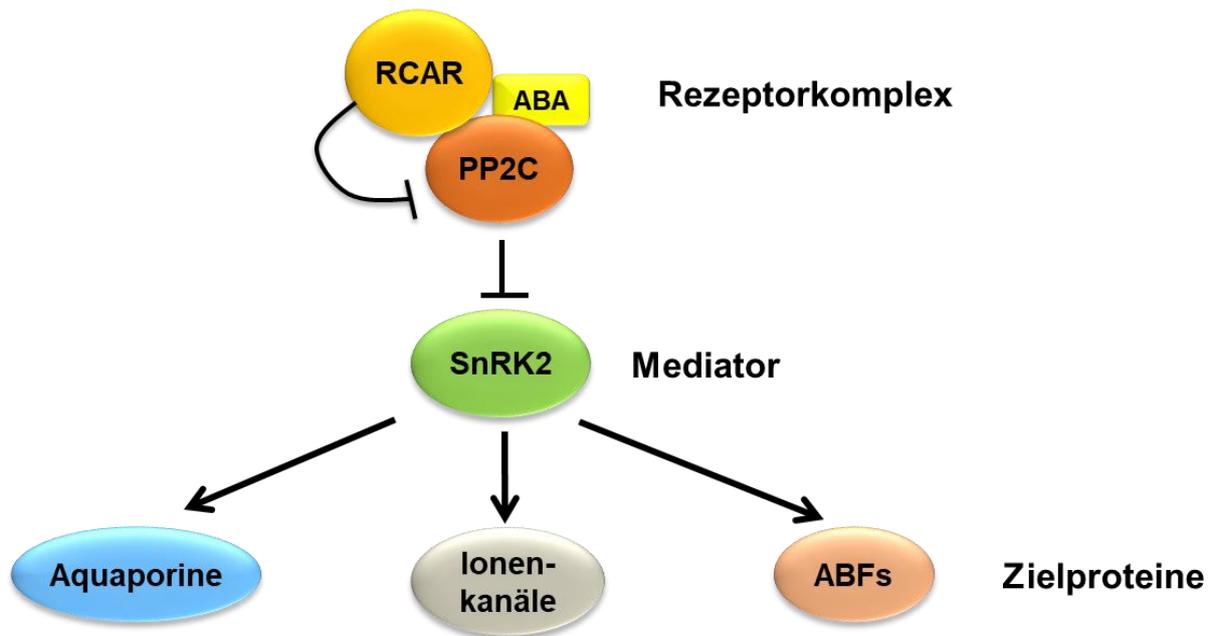
ABA wird über mehrere Syntheseschritte aus Carotinoiden im Xanthophyllzyklus gewonnen. Es gehört zur Gruppe der monozyklischen Sesquiterpene und wird im Chloroplasten über die Zwischenprodukte Zeaxanthin und Violaxanthin mittels der Zeaxanthin epoxidase (ZEP) und anschließender Spaltung und Oxidation im Cytosol durch die Enzyme 9'-cis-Epoxy-carotenoid Dioxygenase (NCED), Short-Chain Alcohol Dehydrogenase/Reductase ABA2 und Abscisic Aldehyde Oxidase (AAO3/ABA3) synthetisiert (Nambara and Marion-Poll 2005, Finkelstein 2013). Mutanten mit gestörter ABA-Biosynthese zeigen aberrante Phänotypen, bedingt durch die Störung der Keimung und der Wasserhaushaltsregulation (Nambara et al. 1998, Zhang 2014).

ABA gilt als pflanzliches Stresshormon und wird vor allem bei Wassermangel induziert (Cutler et al. 2010). Es ist ein wichtiger Regulator des Wasserhaushalts und spielt eine entscheidende Rolle bei Trockenstress, indem es das Wurzelwachstum reguliert, sowie die Schließung der Stomata induziert, was zu einem geringeren Wasserverlust der Pflanze führt (Nilson and Assmann 2007). Es hat weiterhin eine bedeutende regulatorische Wirkung auf pflanzliche Entwicklungsprozesse. So reguliert es unter

anderem bedeutende physiologische Prozesse wie Dormanz, Keimung, Wachstum und Abszission (Li et al. 2010).

### 1.3.1 Abscisinsäure-Signaltransduktion

Nach der Detektion eines Stresssignals von der Pflanze und der damit verbundenen Synthese von ABA wird das Hormon über die Leitgewebe innerhalb der Pflanze verteilt und über ABC-Transporter in die Zellen aufgenommen (Kang et al. 2010). Es hat über 40 Jahre gedauert, um von der Entdeckung von Abscisinsäure als Phytohormon, die Rezeptoren zu finden, welche ABA detektieren und dies als Signal in einem spezifischen Signalweg (Abb. 1-1) weiterleiten um eine physiologische Antwort zu induzieren. Diese Rezeptoren wurden über deren Interaktion mit Proteinen aus der Familie der Typ 2C Proteinphosphatasen (PP2C) identifiziert und abhängig von der Forschungsgruppe *Regulatory Component of ABA-Receptor* (RCAR) bzw. *Pyrabactin Resistant* (PYR) oder *Pyrabactin Resistant-Like* (PYL) genannt (Ma et al. 2009, Park et al. 2009). In *Arabidopsis* besteht diese Proteinfamilie aus 14 Mitgliedern. Diese können ABA binden und zusammen mit einer PP2C einen stabilen Rezeptorkomplex bilden (Abb. 1-1). Dadurch wird die Phosphataseaktivität der PP2Cs inhibiert und die Inaktivierung von Proteinkinasen aus der Familie der *Sucrose non-fermenting 1 (SNF1)-Related Proteinkinases 2* (SnRK2) aufgehoben. Diese Kinasen sind nun aktiv und können ihre Zielproteine phosphorylieren (Umezawa et al. 2009, Melcher et al. 2010). Das *Arabidopsis* Genom codiert für 10 SnRK2-Kinasen, unterteilt in 3 Untergruppen, welche durch ABA aktiviert werden können (Boudsocq et al. 2004) und folglich ABA-abhängige Transkriptionsfaktoren (*ABA-Responsive Element Binding Factors*, ABFs), Aquaporine und Ionenkanäle phosphorylieren und damit aktivieren können (Yoshida et al. 2010, Grondin et al. 2015). Hauptsächlich an der Regulation der Genexpression als Reaktion auf osmotischen Stress beteiligt, sind vier *basic leucine zipper transcription factors* (bZIP), ABF1 - 4, welche im Nucleus phosphoryliert werden und so zu einer veränderten und angepassten Gentranskription führen (Raghavendra et al. 2010, Yoshida et al. 2015).



**Abbildung 1-1 Vereinfachter ABA-Signalweg.**

Durch die Bindung von ABA an den aus RCAR (Rezeptor) und PP2C (inhibierende Phosphatase) bestehenden Rezeptorkomplex wird die Inhibition der PP2C auf den nachgeschalteten Mediator SnRK2 aufgehoben. Die nun aktive Kinase kann daraufhin Zielproteine, wie Aquaporine, Ionenkanäle und ABFs durch Phosphorylierung aktivieren, was zu einer Adaption der Pflanze auf Trockenstress führt.

Durch die Phosphorylierung von Ionenkanälen wie SLAC1 (*SLOW ANION CHANNEL-ASSOCIATED 1*) und Aquaporinen wie PIP2;1 durch SnRK2s kommt es zu einer schnellen Schließung der Stomata durch ein durch Trockenstress und ABA ausgelöstes Signal in der Pflanze (Vahisalu et al. 2008, Grondin et al. 2015).

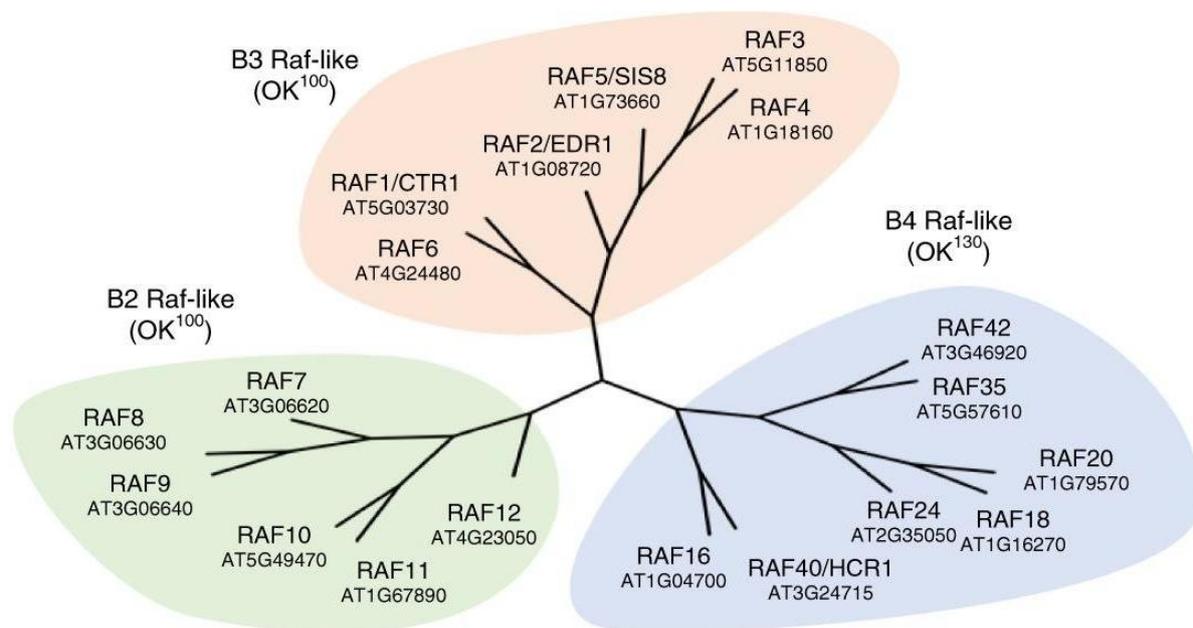


### 1.3.2 Aktivierung von SnRK2s durch osmotischen Stress und ABA

SnRK2-Kinasen können sowohl durch ABA, durch Aufhebung der negativen Inhibierung der PP2Cs, als auch durch osmotischen Stress aktiviert werden, wobei die beiden *pathways* unabhängig voneinander agieren können (Zhao et al. 2018). Durch osmotischen Stress werden in der Pflanze *RAF-like protein kinases* (RAFTs), welche zur Gruppe der *mitogen activated protein kinase kinase kinases* (MAPKKKs) gehören, aktiviert (Lin et al. 2020). In Pflanzen konnten über 60 dieser Kinasen identifiziert werden, wobei nur die Untergruppen B und C zu den *RAF-like protein kinases* gezählt werden (Ichimura et al. 2002). MAPKKKs lösen, in Reaktion auf verschiedene externe Stimuli, in Pflanzen eine Phosphorylierungskaskade aus, um auf sich verändernde Umweltbedingungen und damit verbundene Stresssituationen reagieren zu können (Lewis et al. 1998). Erstmals konnte im Moos *Physcomitrella patens* eine Phosphorylierung und damit Aktivierung einer SnRK-Kinase durch eine *RAF-like protein kinase* gezeigt werden (Saruhashi et al. 2015).

In weiterführenden Studien in Arabidopsis wurde dann die Phosphorylierung von SnRK2s durch sowohl B3- als auch durch *B4-RAF-like protein kinases* (Abb. 1-2) bestätigt und eine essentielle Rolle bei deren durch ABA ausgelöster Aktivierung, sowie der Reaktivierung durch vorherige Dephosphorylierung gezeigt (Lin et al. 2020, Takahashi et al. 2020).

Vertreter dieser Untergruppen sind unter anderem an der Regulation der Wurzeleitfähigkeit oder am Ethylen-Signalweg beteiligt (Frye et al. 2001, Shahzad et al. 2016) und durch den *knockout* von mehreren Proteinen dieser Familie kommt es zu einer Insensitivität gegenüber ABA (Lee et al. 2015).



**Abbildung 1-2 Phylogenetischer Stammbaum von B2-, B3- und B4-RAFTs.**

Der Stammbaum zeigt die Aufteilung der homologen Proteine in die 3 Untergruppen der *B RAF-like protein kinases* Familie aus *Arabidopsis*

Entnommen aus Lin Z, Li Y, Zhang Z, Liu X, Hsu CC, Du Y, Sang T, Zhu C, Wang Y, Satheesh V, Pratibha P, Zhao Y, Song CP, Tao WA, Zhu JK, Wang P. A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. *Nat Commun.* 2020 Jan 30;11(1):613. doi: 10.1038/s41467-020-14477-9. PMID: 32001690; PMCID: PMC6992735. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

## 1.4 MAP3-Kinasen

*Mitogen-activated protein kinase kinases* (MAP3Ks) und die von ihnen ausgelösten Signalkaskaden stellen ein grundlegendes System der Signaltransduktion dar, welches in Eukaryoten konserviert ist (Schaeffer and Weber 1999, Widmann et al. 1999). MAP3Ks können durch verschiedene Faktoren, wie Hormone, Zellstress, Wachstumsfaktoren und Zytokine aktiviert werden (Widmann et al. 1999). Dadurch wird eine Phosphorylierungskaskade und damit eine Aktivierung nachgeschalteter MAP2Ks und MAPKs ausgelöst (Rossomando et al. 1989). MAP2Ks erkennen und phosphorylieren ein spezifisches Threonin-X-Tyrosin Motiv in der Aktivierungsschleife von MAPKs, wodurch diese aktiviert werden und folglich Transkriptionsfaktoren phosphorylieren können (Gartner et al. 1992). Die somit aktivierten MAP-Kinasen können dadurch verschiedene zelluläre Antworten, wie unter anderem Wachstum, Entwicklung und Stressantworten regulieren (Robinson and Cobb 1997).

### 1.4.1 RAF-Kinasen

Eine der bekanntesten MAP3-Signalkaskaden wird durch ein vor etwa 40 Jahren entdecktes Onkogen namens RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*) ausgelöst (Rapp et al. 1983). Zu dem damals entdeckten C-RAF konnten noch zwei weitere Isoformen, A-RAF und B-RAF identifiziert werden (Huleihel et al. 1986). RAFs spielen eine wichtige Rolle im Wachstum, Überleben und in der Differenzierung von Zellen und sind somit wichtige Onkogene, die seit jeher von großem Interesse für Wissenschaft und Forschung sind (Wellbrock et al. 2004).

Die verschiedenen RAFs werden unterschiedlich strikt aktiviert und reguliert. Allgemein wird im tierischen System, durch Bindung eines Wachstumsfaktors, Zytokins und Hormons an deren spezifischen Rezeptor ein kleines G-Protein RAS aktiviert und die Aktivierung von RAF eingeleitet. Dazu wird zunächst RAF zur Membran rekrutiert und durch folgende De-/Phosphorylierungen regulatorischer Domänen und Dimerbildung aktiviert. Diese Modifikationen sind erforderlich um die nachfolgende Phosphorylierungskaskade auf die Proteine MEK (*mitogen-activated protein kinase kinase*) und ERK (*extracellular signal-regulated kinase*) zu vervollständigen und deren weitere Signalvermittlung zu ermöglichen (Marais and Marshall 1996, Wellbrock et al. 2004).

### 1.4.2 RAF-Kinasen im Ethylen-Signalweg

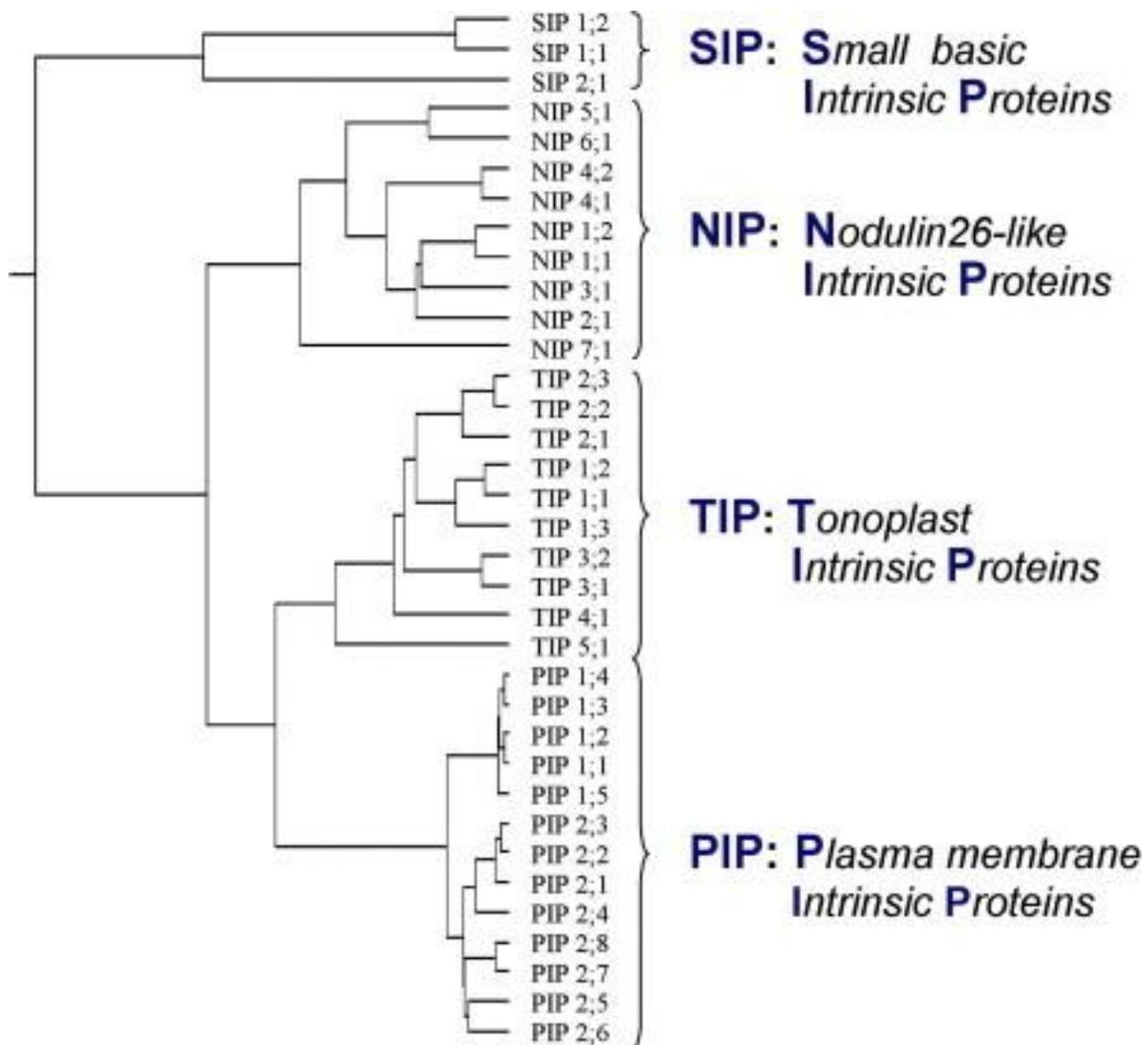
Die physische Interaktion von CTR1 (*constitutive triple response 1*) bzw. RAF1 mit ETR1 (*Ethylene Receptor 1*) wurde bereits vor 25 Jahren gezeigt und über eine negative regulatorische Funktion der Kinase im Ethylen-Signalweg spekuliert (Clark et al. 1998). Kürzlich konnte weiterhin im Moos *P. patens* eine Interaktion der RAF-Kinase mit einer ETR-Histidinkinase (ETR-HK) gezeigt werden, welche für die ABA- und Osmostressantworten entscheidend ist. Mutanten, die keine funktionale Histidinkinase exprimieren, zeigen keine stressinduzierte SnRK2-Aktivierung, was einen *crossstalk* des ABA- und Ethylen-Signalwegs in Reaktion auf Wasserstress impliziert (Toriyama et al. 2022).

## 1.5 Aquaporine

Durch die „zufällige“ Entdeckung eines 28 kDa schweren, kanalbildenden Membranproteins „CHIP28“ (Denker et al. 1988), später AQP1, in menschlichen Erythrozyten, wurde der Grundstein für die Forschung an Aquaporinen gelegt. Dieses Protein konnte aktiv Wasser über biologische Membranen transportieren und die wassertransportierenden Eigenschaften des Kanals wurden erstmals in einem *in vivo* System von *Xenopus* Oocyten charakterisiert (Preston et al. 1992), wofür später im Jahr 2003 Peter Agre und Kollegen den Chemie Nobelpreis erhielten (Agre 2004). Kurz nach der Entdeckung des menschlichen Wasserkanals konnte von Maurel und Kollegen erstmalig ein wassertransportierendes Protein aus der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden (Maurel et al. 1993).

Aquaporine sind nicht einzig auf den Transport von Wasser beschränkt, sondern können auch für Pflanzen wichtige Nähr- und Signalstoffe, wie Bor, Silizium, Wasserstoffdioxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und reaktive Sauerstoffspezies (Maurel et al. 2008), aber auch Gase, wie CO<sub>2</sub>, transportieren (Nakhoul et al. 1998) und sind damit an essentiellen pflanzlichen Prozessen, wie unter anderem Nährstoffaufnahme, Kohlenstofffixierung, Wachstum und Stressantwort, beteiligt. Durch Fortschritte in der Genomsequenzierung und dem Bereitstellen der sequenzierten Genome verschiedener Modellpflanzen konnte die genaue Anzahl an Aquaporinen in *Arabidopsis* mit 35 benannt werden (Johanson et al. 2001).

Aquaporine gehören zur Gruppe der *major intrinsic proteins* (MIPs) und lassen sich wiederum in 4 Hauptgruppen unterteilen (Abb. 1-3). Diese werden weitgehend aufgrund ihrer Lokalisation und Sequenzähnlichkeit unterschieden. In *Arabidopsis* zählen die in der Plasmamembran lokalisierten *plasma membrane intrinsic proteins* (PIPs) mit 13 Mitgliedern zu der größten Gruppe und zusammen mit den in der vakuolären Membran lokalisierten *tonoplast intrinsic proteins* (TIPs) zu den wichtigsten Vertretern hinsichtlich des Wassertransports innerhalb der Pflanze (Maurel et al. 2002). Weiterhin unterscheidet man die *Nodulin26-like intrinsic proteins* (NIPs), sowie die später entdeckten, überwiegend im ER lokalisierten, *small basic intrinsic proteins* (SIPs) (Ishikawa et al. 2005).



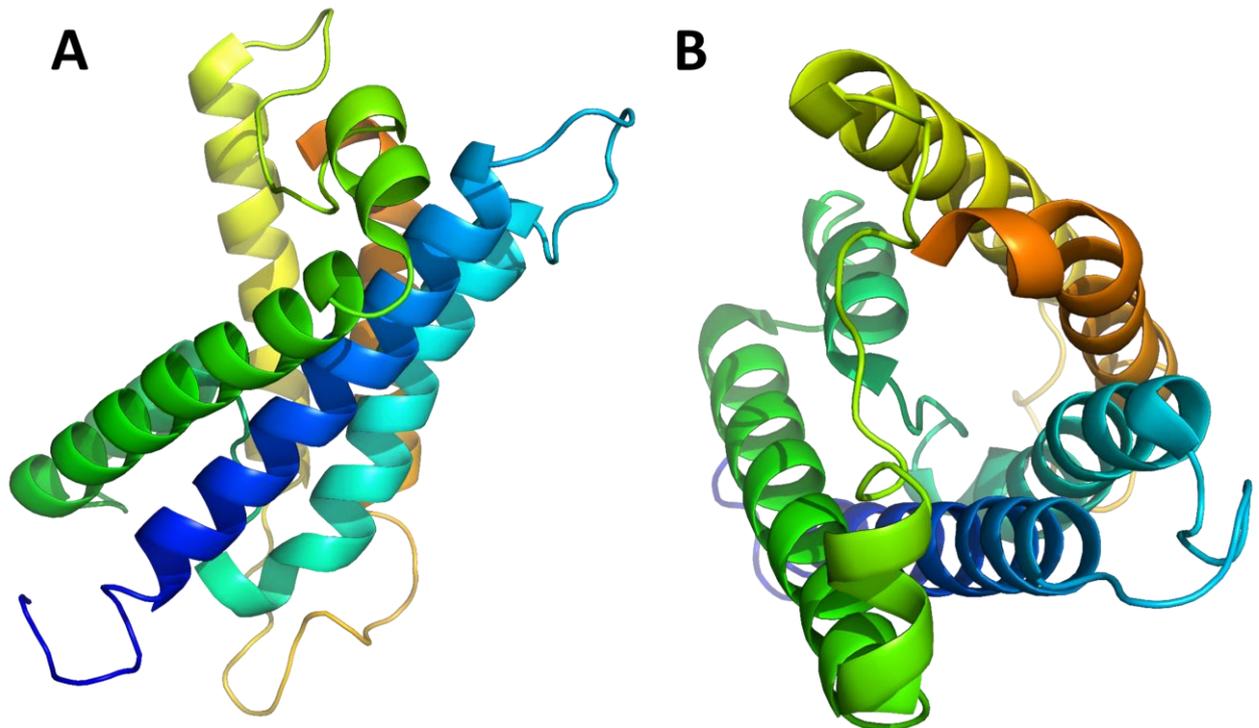
**Abbildung 1-3 Übersicht der Aquaporinfamilie in Arabidopsis.**

Der Stammbaum zeigt die 35 homologen Aquaporinproteine aus Arabidopsis und deren Unterteilung in die vier Hauptgruppen.

Entnommen aus Maurel, C.(2007). Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. FEBS Letters, Volume: 581, Issue: 12, Pages: 2227-2236, First published: 15 March 2007, DOI: (10.1016/j.febslet.2007.03.021).

### 1.5.1 Aufbau, Selektivität und Regulation von Aquaporinen

Pflanzliche Aquaporine sind als Tetramere in der Membran verankert (Daniels et al. 1999, Kukulski et al. 2005). Jedes Monomer besteht aus sechs Transmembrandomänen  $\alpha$ -helices, welche durch fünf Loops miteinander verbunden sind und taucht mit den N- und C-termini auf der cytoplasmatischen Seite in die Membran ein (Abb. 1-4).



**Abbildung 1-4 3D-Struktur von SoPIP2;1.**

Darstellung des PIP2;1-Proteins aus Spinat mit einer Masse von etwa 30 kDa aus in die Membran eingebetteter Ansicht (A) und Vogelperspektive (B). Die Abbildung wurde mittels PyMOL auf Basis des PDB Eintrags 2B5F erstellt.

Die Selektivität von Aquaporinen für verschiedene Substrate wird durch zwei Haupteigenschaften charakterisiert. In der Mitte des Kanals befinden sich zwei Aminosäuremotive, bestehend aus Asparagin-Prolin-Alanin (NPA), wobei Asparagin unverzichtbar für die Funktionalität der Protonenexklusion ist (Groot et al. 2003). Ein weiteres Motiv, tiefer im Inneren des Kanals auf der extracytoplasmatischen Seite der Membran, stellt die ar/R Region dar. Dieses besteht aus der aromatischen Aminosäure (ar) Phenylalanin oder einem Histidin, dem ein Arginin (R) gegenübergestellt ist und sorgt für eine Repulsion positiv geladener Ionen. Eine weiterhin wichtige Eigenschaft für die Selektivität dieses Motivs ist die Größe bzw. der Durchmesser, welcher für reine wassertransportierende Kanäle sehr gut mit der Größe von Wassermolekülen korreliert (Sui et al. 2001, Almasalmeh et al. 2014). Durch eine Mutation oder Aminosäureaustausch dieses Motivs kommt es zu veränderten Transporteigenschaften des Kanalproteins. So führt die Mutation der für dieses Motiv relevanten Aminosäuren Phenylalanin und Histidin zu Alanin, zu einem 3-fach größeren Durchmesser, wodurch das Protein für Glycerol und Urea permeabel wurde.

Weiterhin kann durch die Veränderung der elektrostatischen Eigenschaften im Inneren der Pore, durch die Mutation von Arginin zu Valin, ein Transport von Protonen durch das Aquaporin ermöglicht werden, was die Wichtigkeit und Funktion dieses Motivs weiter hervorhebt (Beitz et al. 2006).

Durch die Phosphorylierung spezifischer Aminosäuren, meist Serinen, eines Kanalproteins kommt es zu einer Konformationsänderung des Proteins und damit zu einer Öffnung und gesteigerten Aktivität des Kanals (Törnroth-Horsefield et al. 2006). Maurel und Kollegen zeigten bereits 1995, dass die Leitfähigkeit eines pflanzlichen TIPs in Oocyten, durch die phosphoablative Mutation der vermuteten drei Serin-Phosphorylierungsstellen gesenkt wurde, oder durch die Anregung der Protein Kinase A und einer damit einhergehenden Phosphorylierung des Proteins, gesteigert werden konnte (Maurel et al. 1995).

## **1.6 Regulation der Wasserleitfähigkeit**

Die Wasserleitung innerhalb der Pflanze wird maßgeblich durch die gewebespezifische Regulation von Aquaporinen durch ABA und die dadurch entstehenden hydraulischen Effekte gesteuert. PIP2;1 gehört zu den am meisten exprimierten Aquaporinen in Wurzeln und Spross und spielt eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung des pflanzlichen Wasserkontingents durch verschiedene Regulationen, wie der Wasseraufnahme durch Wurzeln und Steuerung der Transpiration durch Stomata (Péret et al. 2012, Grondin et al. 2015).

Die Effizienz des Wassertransports wird einerseits durch die Anzahl an Kanälen in der Membran aber auch durch deren Aktivität bestimmt (Chaumont and Tyerman 2014, Maurel et al. 2015). Dies geschieht unter anderem durch die transkriptionelle Regulation und Aktivierung des Kanals durch Ionen, Protonen und Phosphorylierung (Johansson et al. 1998, Hachez et al. 2012). Ein weiterer Regulator des Wasserhaushalts und damit von Aquaporinen ist ABA, welches unterschiedliche Einflüsse auf die jeweiligen Leitfähigkeiten in Wurzel und Spross haben kann und auch die Phosphorylierung von Aquaporinen durch SnRK2.6 und SnRK2.4 induzieren kann, was auf eine gewebespezifische Antwort der ABA-Signalkaskade, bzw. eine unterschiedliche Sensitivität der im jeweiligen Gewebe primär vorhandenen

Signalkomponenten und auf eine direkte Verbindung von ABA und Aquaporinen hindeutet (Ian C. Dodd 2013, Grondin et al. 2015, Shahzad et al. 2023).

Durch die Analysen von Mutantpflanzen des ABA-Signalwegs, sowie Aquaporin *knockouts*, konnte die Rolle einzelner Komponenten und auch deren Wirkung in Kombination mit ABA identifiziert werden, wobei dies durch die meist redundanten Funktionen der Mitglieder der jeweiligen Proteinfamilien erschwert wird. So konnte durch die Analyse von SnRK2.4 *knockout* Pflanzen, welche im Vergleich zum Wildtyp keine Reaktion der Wurzeleitfähigkeit auf exogenes ABA zeigen und deren Phänotyp durch die Expression von SnRK2.4 komplementiert werden konnte, eine spezifische regulatorische Funktion von SnRK2.4 auf die Leitfähigkeit von Wurzeln gezeigt werden (Shahzad et al. 2023).

Durch Analysen von OST1- (*Open Stomata 1*) und PIP2;1-Mutanten konnte die spezifische Wirkung von ABA auf diese Proteine entschlüsselt werden. So wird die durch diese Kinase spezifisch vermittelte Schließung der Stomata einzig durch ABA, nicht aber durch Licht oder CO<sub>2</sub> ausgelöst, was vermutlich durch die Phosphorylierung von PIP2;1 und einer damit einhergehenden Steigerung der osmotischen Wasserleitfähigkeit in der Schließzelle bedingt ist (Mustilli et al. 2002, Grondin et al. 2015).

Weiterhin kommt es durch die Abwesenheit multipler Komponenten anderer Proteinfamilien der ABA-Signalkaskade zu einer Insensitivität gegenüber ABA. So zeigen die *knockouts* von ABA-Rezeptoren der Untergruppe III bei ABA-Zugabe keine Schließung der Stomata und für *knockouts* der Untergruppe I eine Insensitivität der Wurzeln gegenüber ABA, was eine Funktion der verschiedenen Untergruppen auf spezifische Gewebe hervorhebt (Park et al. 2009, Gonzalez-Guzman et al. 2012).

## **1.7 Zielsetzung der Arbeit**

Ziel der Arbeit war, die Wirkung einzelner Komponenten des ABA-Signalwegs oder Signalkaskaden, bestehend aus jeweils einem Protein der jeweiligen Familie, auf ein einzelnes Zielprotein auf molekularer Ebene zu analysieren, ohne den Hintergrund des pflanzlichen Proteoms, wozu in dieser Arbeit hauptsächlich der heterologe Modellorganismus *S. cerevisiae* (Hefe) verwendet wurde.



Hierfür wurde unter anderem, das von Dr. Moritz Ruschhaupt etablierte System zur Analyse des ABA-Signalwegs benutzt um die Effektivität von Proteinen, der neu entdeckten *RAF-like protein kinases* als Komponenten der ABA-Antwort zu charakterisieren und deren mögliche Wirkung auf die anderen Signalkomponenten zu untersuchen.

Weiterhin sollte die Regulation verschiedener Aquaporine durch Komponenten des ABA-Signalwegs und durch ABA selbst untersucht werden, um mögliche Spezifitäten der einzelnen Komponenten aufzuschlüsseln. Zusätzlich sollten mögliche SnRK2-abhängige spezifische Phosphorylierungsstellen des Membranproteins PIP2;1 identifiziert und analysiert werden.

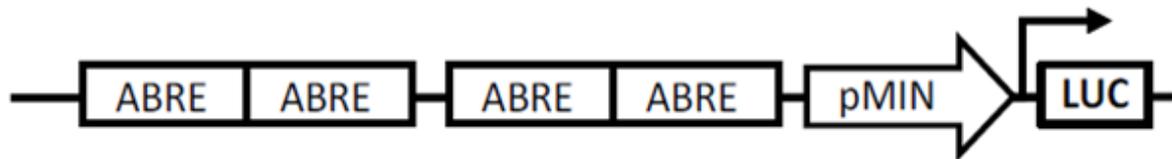
## 2 Ergebnisse

### 2.1 Analyse von RAF-Kinasen im ABA-Signalweg

Durch die Entdeckung einer *B3-RAF-like kinase* im Moos *P. patens*, welche in der Lage war das mooseigene SnRK2 zu phosphorylieren (Saruhashi et al., 2015) und die weiterführenden Studien in Arabidopsis, die eine Funktion von RAFs *upstream* der bisher bekannten ABA-Signalkaskade bestätigten, wurde in der nachfolgenden Studie die Familie der *B-RAF-like kinases*, aus der bereits vereinzelt Mitgliedern eine aktivierende Funktion auf SnRK2s nachgewiesen wurde, herausgegriffen, um alle Mitglieder dieser Gruppe auf deren mögliche Wirkung auf die ABA-Signalkomponenten zu untersuchen.

#### 2.1.1 Aktivierung von SnRK2s durch RAFs

Die spezifische molekulare Funktion und Aktivität einzelner RAF-Kinasen im ABA-Signalweg, sowie eine mögliche Spezifität dieser, wurde durch die systematische Untersuchung *in vivo* in heterologen Hefesystemen analysiert. Hierzu wurde zu dem bereits gezeigten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Wachstumsassay, als Maß für die Aquaporinleitfähigkeit, unter anderem ein synthetischer Luciferasereporter für die Quantifizierung der ABA-Antwort verwendet. Das Reportergerüst besteht aus vier ABRE-Bindesequenzen (*ABA-responsive regulatory cis-element*) und einem 35S-Minimalpromotor (pMIN), der die Expression des Glühwürmchen Luciferasegens (LUC) reguliert (Abb 2-1). Durch die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die ABREs, kommt es zu einer Induktion, bzw. Expression des Reporters und einem damit verbundenen messbaren Luciferasesignal, welches durch zusätzliche SnRK2-Expression weiter induziert werden kann (Ruschhaupt et al. 2019).

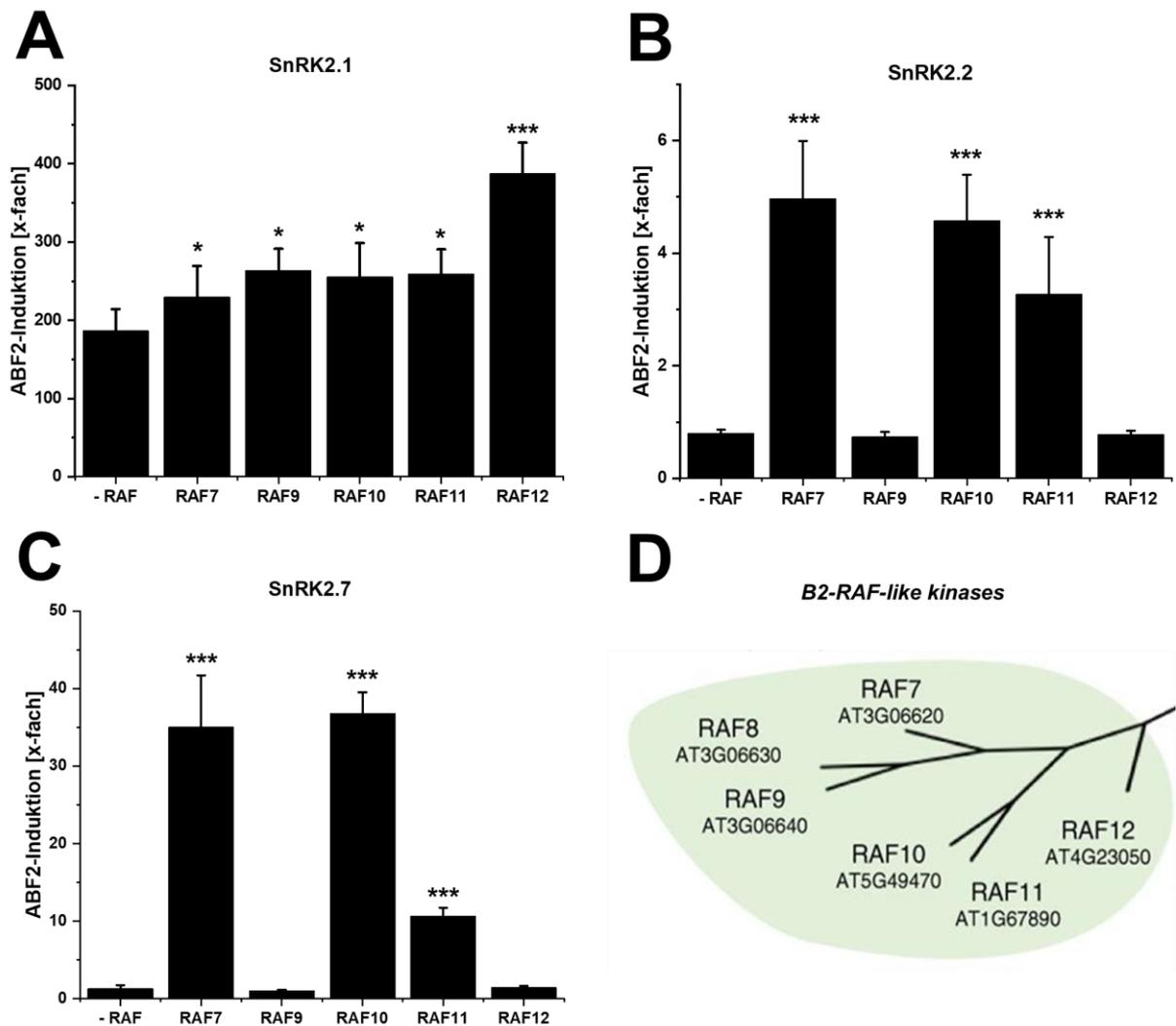


**Abbildung 2-1 Aufbau des synthetischen Luciferasereporters.**

Vier Wiederholungen der ABRE-Bindesequenzen wurden vor einen 35S-Minimalpromotor gesetzt, um die Expression des Glühwürmchen Luciferasegens zu steuern und das ABF-abhängige Luciferasesignal messen zu können. Der Promotor wurde stabil in das Hefegenom des Wildtypstamms BMA64-1A integriert (BMA64-1A Reporterhefe).

Die Koexpression der B2-, B3- und B4-Familie der RAF-Kinasen wurde im Folgenden auf den Einfluss auf je ein Mitglied der verschiedenen SnRK2-Familien getestet. Hierfür wurden SnRK2.1, SnRK2.2 und SnRK2.7 ausgewählt.

Die Expression der Konstrukte erfolgte in Vektoren des Golden Gate Systems. Dazu wurde ABF2 unter dem ADH1- (*alcohol dehydrogenase 1*) Promotor in (LII) pYEAST\_LII\_2-3\_CEN\_HIS kloniert und exprimiert. Die SnRK2-Kinasen wurden in den (LII) pYEAST\_LII\_2-3\_CEN\_TRP kloniert unter Kontrolle des GAL1-Promotors zur Galaktose induzierten Expression. PP2Cs und RAFs wurden unter konstitutiver Expression des TDH3- (*Triose-phosphate dehydrogenase 3*) Promotors in (LII) pYEAST\_LII\_2-3\_CEN\_LEU exprimiert und RCARs im (LII) pYEAST\_LII\_2-3\_CEN\_URA. Alle Hefekonstrukte wurden durch den TDH1-Terminator in Hefe terminiert.



**Abbildung 2-2 Aktivierung von SnRK2s durch B2-RAF-like kinases.**

Aktivierung des Reporters durch Expression von SnRK2.1 (A), SnRK2.2 (B), SnRK2.7 (C) in Kombination mit *B2-RAF-like kinases* in BMA64-1A Reporterhefen. ABF2 und RAFs wurde unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2 Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zur Reporterinduktion ohne RAFs. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten. (D) Stammbaum der Familie der *B2-RAF-like kinases* aus Arabidopsis. Entnommen aus: Lin Z, Li Y, Zhang Z, Liu X, Hsu CC, Du Y, Sang T, Zhu C, Wang Y, Satheesh V, Pratibha P, Zhao Y, Song CP, Tao WA, Zhu JK, Wang P. A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. Nat Commun. 2020 Jan 30;11(1):613. doi: 10.1038/s41467-020-14477-9. PMID: 32001690; PMCID: PMC6992735. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Durch die Expression von SnRK2.1 wird ABF2 aktiviert und es kam zu einer ca. 180-fachen Induktion des Luciferasereporters bereits ohne RAFs. Die Koexpression von RAF7, RAF9, RAF10 und RAF11 führte zu einer leicht gesteigerten Induktion von ca. 230-, 260-, 250- bzw. 260-fach. Einzig für RAF12 konnte, im Vergleich zur Nichtexpression von RAFs, eine 2-fache, bzw. eine ca. 390-fache Induktion des Reporters beobachtet werden (Abb. 2-2A).

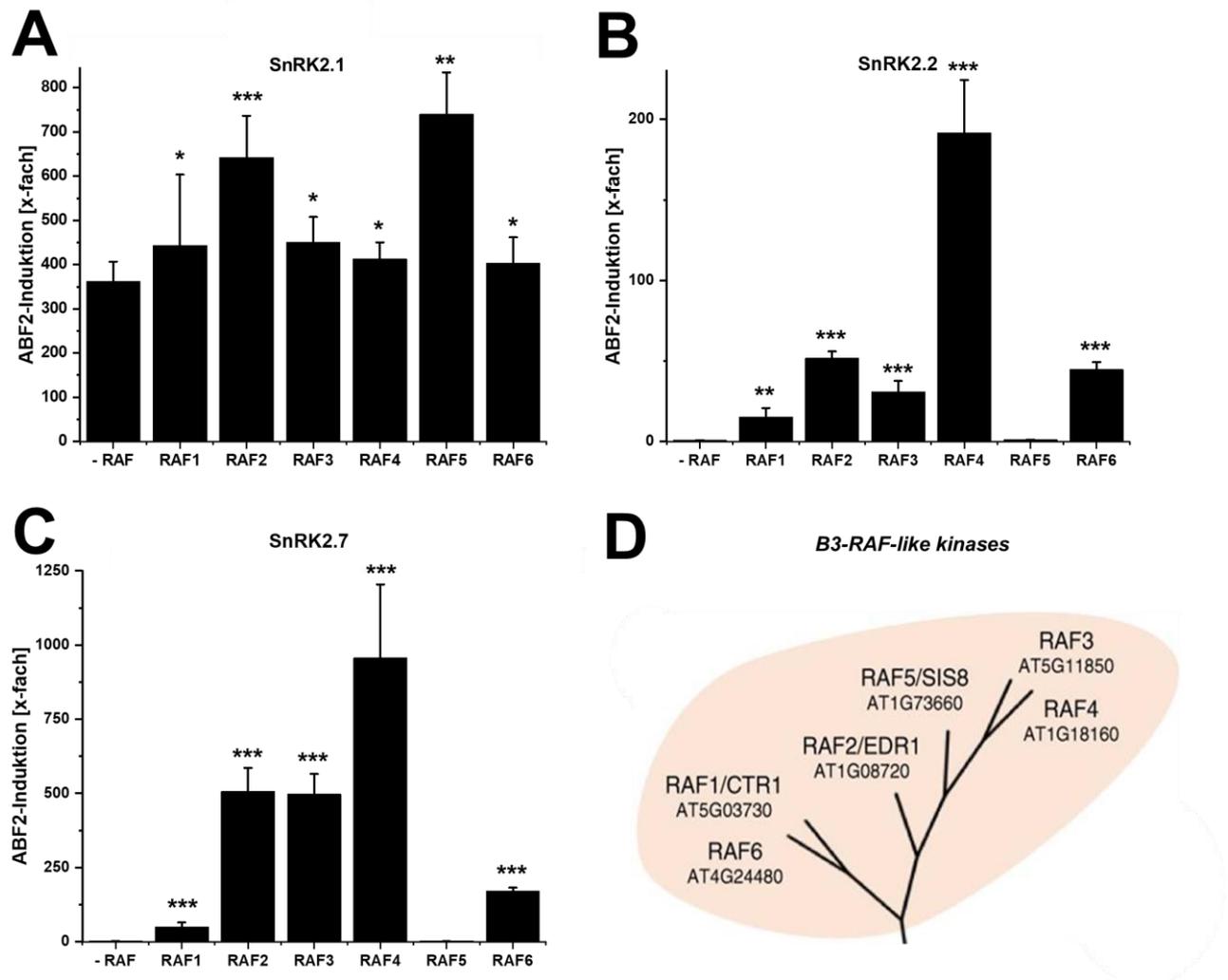
RAF7, RAF10 und RAF11 zeigten für SnRK2.2 nur eine sehr geringe Aktivierung des Reporters, wohingegen für RAF9 und RAF12 keine Induktion von SnRK2.2 und damit auch kein erhöhtes Luciferasesignal detektiert werden konnte (Abb 2-2B).

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich für die Koexpression von SnRK2.7, welches durch RAF9 und RAF12 ebenfalls nicht zu einer Aktivierung des Reporters führte. Für RAF7 und RAF10 konnten vergleichbare Induktionswerte von ca. 35-fach im Vergleich zu keiner zusätzlichen RAF-Expression detektiert werden (Abb 2-2C). Tendenziell schienen RAF7 und RAF10 die inaktiven SnRK2-Kinasen stärker zu induzieren als RAF11 und das vermutlich inaktive RAF9 und RAF12.

Die Koexpression von B3-RAFTs zeigte ein ähnliches Verhalten auf die verschiedenen SnRK2s. Für SnRK2.1 kam es durch die B3-RAFTs zu einer maximal 2-fachen Induktion durch RAF5 im Vergleich zur alleinigen SnRK-Expression. Die Expression von RAF1, RAF3, RAF4 und RAF6 induzierte eine ca. 440-, 450-, 410- bzw. 400-fache Induktion des Reporters (Abb. 2-3A).

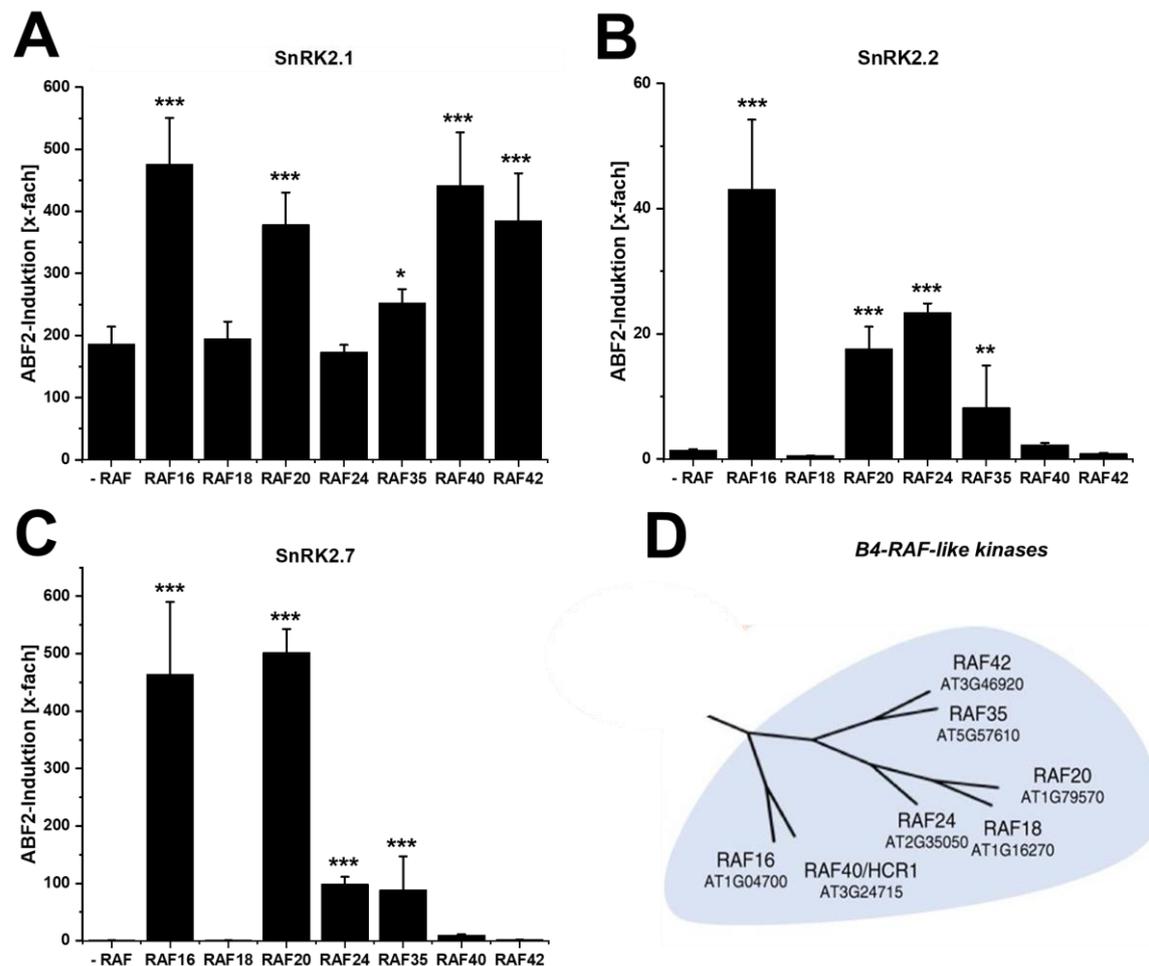
SnRK2.2 und SnRK2.7 wurden durch die Koexpression von RAF1, RAF2, RAF3, RAF4 und RAF6 aktiviert und induzierten den Reporter von 15-fach mit RAF1 und SnRK2.2 bis ca. 190-fach für RAF4 und SnRK2.2 (Abb. 2-3B).

Die Aktivierung von SnRK2.7 war im Vergleich deutlich stärker und induzierte den Reporter von ca. 50-fach mit RAF1 bis zu ca. 950-fach mit RAF4 (Abb. 2-3C). Die Koexpression von RAF4 führte zu der stärksten Induktion der beiden getesteten inaktiven SnRK2s.



**Abbildung 2-3 Aktivierung von SnRK2s durch B3-RAF-like kinases.**

Aktivierung des Reporters durch Expression von SnRK2.1 (A), SnRK2.2 (B), SnRK2.7 (C) in Kombination mit *B3-RAF-like kinases* in BMA64-1A Reporterhefen. ABF2 und RAFs wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2 Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$ , \*\*\*  $P < 0,001$  (one-way ANOVA) im Vergleich zur Reporterinduktion ohne RAFs. Fehlerbalken zeigen die SD aus  $n=3$  Replikaten. (D) Stammbaum der Familie der *B3-RAF-like kinases* aus Arabidopsis. Entnommen aus: Lin Z, Li Y, Zhang Z, Liu X, Hsu CC, Du Y, Sang T, Zhu C, Wang Y, Satheesh V, Pratibha P, Zhao Y, Song CP, Tao WA, Zhu JK, Wang P. A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. Nat Commun. 2020 Jan 30;11(1):613. doi: 10.1038/s41467-020-14477-9. PMID: 32001690; PMCID: PMC6992735. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.



**Abbildung 2-4 Aktivierung von SnRK2s durch B4-RAF-like kinases.**

Aktivierung des Reporters durch Expression von SnRK2.1 (A), SnRK2.2 (B), SnRK2.7 (C) in Kombination mit *B4-RAF-like kinases* in BMA64-1A Reporterhefen. ABF2 und RAFs wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2 Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zur Reporterinduktion ohne RAFs. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten. (D) Stammbaum der Familie der *B4-RAF-like kinases* aus Arabidopsis. Entnommen aus: Lin Z, Li Y, Zhang Z, Liu X, Hsu CC, Du Y, Sang T, Zhu C, Wang Y, Satheesh V, Pratibha P, Zhao Y, Song CP, Tao WA, Zhu JK, Wang P. A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. Nat Commun. 2020 Jan 30;11(1):613. doi: 10.1038/s41467-020-14477-9. PMID: 32001690; PMCID: PMC6992735. <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

Die Koexpression von RAF18, RAF24 und RAF35 mit SnRK2.1 zeigte keinen oder nur einen marginalen Effekt von RAF35 auf die Induktion der Kinase und die damit verbundene Reporterinduktion. Für RAF16, RAF20 und RAF40 konnten ca. 2- bis 3-

fache Induktionswerte verglichen ohne RAF-Koexpression detektiert werden (Abb. 2-4A).

Durch RAF16-, RAF20-, RAF24-, RAF35- und RAF40-Expression konnten die inaktiven Kinasen SnRK2.2 und SnRK2.7 aktiviert werden. RAF40 führte insgesamt zur schwächsten Induktion mit 2-fach für SnRK2.2 und 10-fach für SnRK2.7. RAF16 zeigte die stärkste Aktivierung von SnRK2.2 mit einer ca. 40-fachen Induktion. Für SnRK2.7 konnten die höchsten Induktionswerte mit ca. 460-, bzw. 500-facher Induktion für RAF16 und RAF20 detektiert werden. Die Koexpression von RAF18 und RAF42 führte zu keiner Aktivierung der Kinasen und damit zu keinem detektierbaren Luciferasesignal (Abb. 2-4B, C).

Insgesamt konnte kein oder nur ein marginaler Effekt der getesteten B-RAFTs auf SnRK2.1 festgestellt werden. Eine Aktivierung von SnRK2.2 und SnRK2.7 und damit eine Induktion des Reporters zeigten hier 13 von 18 Mitgliedern der verschiedenen Mitglieder der B-RAF Familie. Eine Spezifität der B-RAFTs für bestimmte SnRK2s konnte nicht mit Sicherheit festgestellt oder ausgeschlossen werden, lediglich eine unterschiedliche Aktivität bzw. Effektivität der Aktivierung der verschiedenen RAFs.

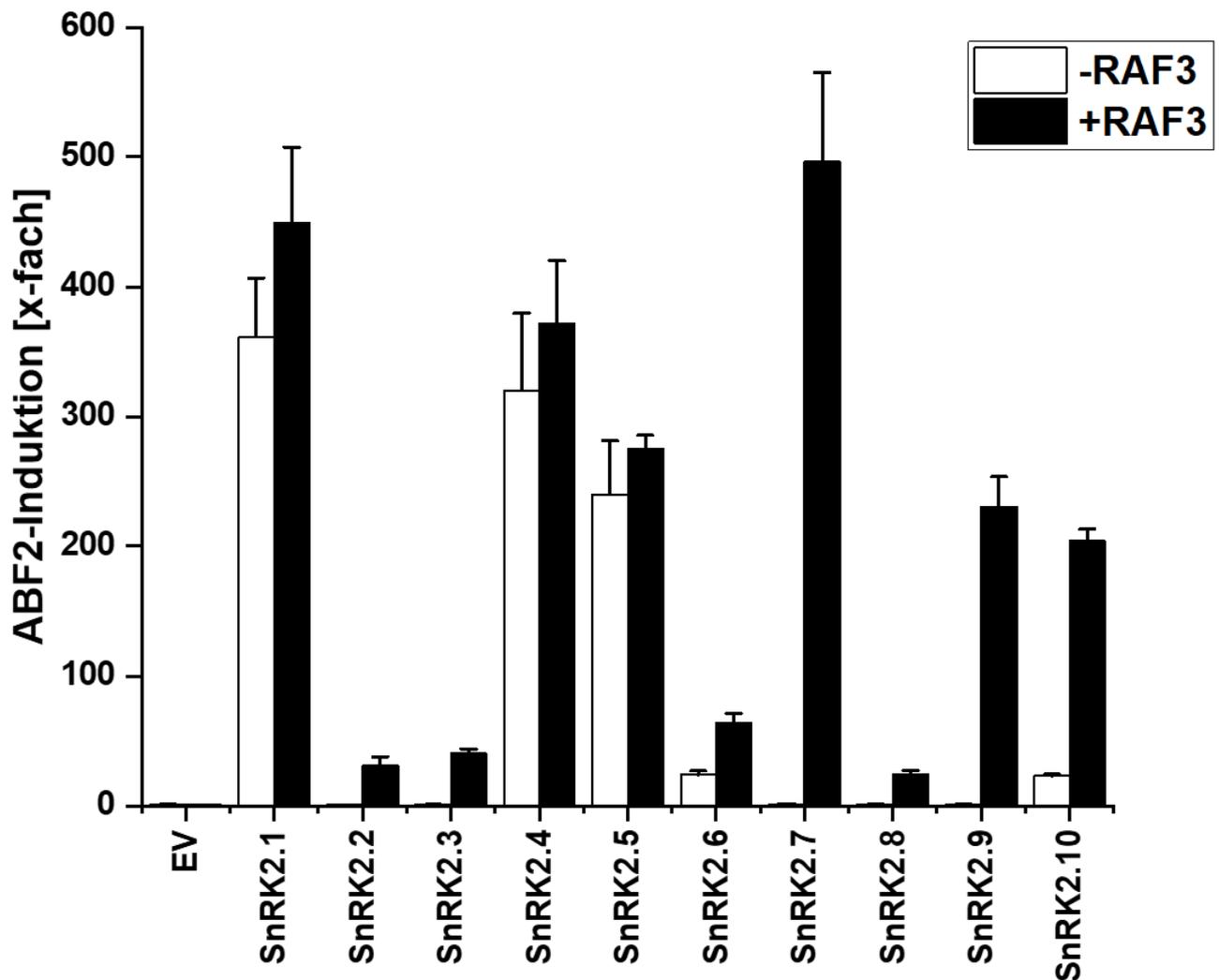
Durch die Bestätigung eines Einflusses der RAF-Kinasen im ABA-Signalweg, wurde die gesteigerte Komplexität in den folgenden Versuchen reduziert, indem die Analysen auf RAF3 und RAF24 fokussiert wurden.

Mit der bereits gezeigten Aktivierung von SnRK2.2 und SnRK2.7 durch RAF3 sollte auch ein Einfluss auf die übrigen SnRK2s durch RAF3 getestet werden.

Die bereits aktiven SnRK2s SnRK2.1, SnRK2.4 und SnRK2.5 zeigten durch die zusätzliche RAF3-Expression nur eine minimal erhöhte Reporterinduktion. Für SnRK2.6 und SnRK2.10 konnte eine erhöhte Induktion von ca. 30-fach auf 60-fach bzw. von ca. 20-fach auf über 200-fach gemessen werden.

Durch die Koexpression von RAF3 kam es zu einer Aktivierung aller inaktiven SnRK2s. SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.8 wurden etwa gleich stark aktiviert und führten zu einer ca. 30-, 40- bzw. 25-fachen Induktion des Reporters. Für SnRK2.7 und SnRK2.9 konnten die höchsten Induktionswerte mit einer ca. 500- und 230-fachen Reporterinduktion festgestellt werden (Abb. 2-5).





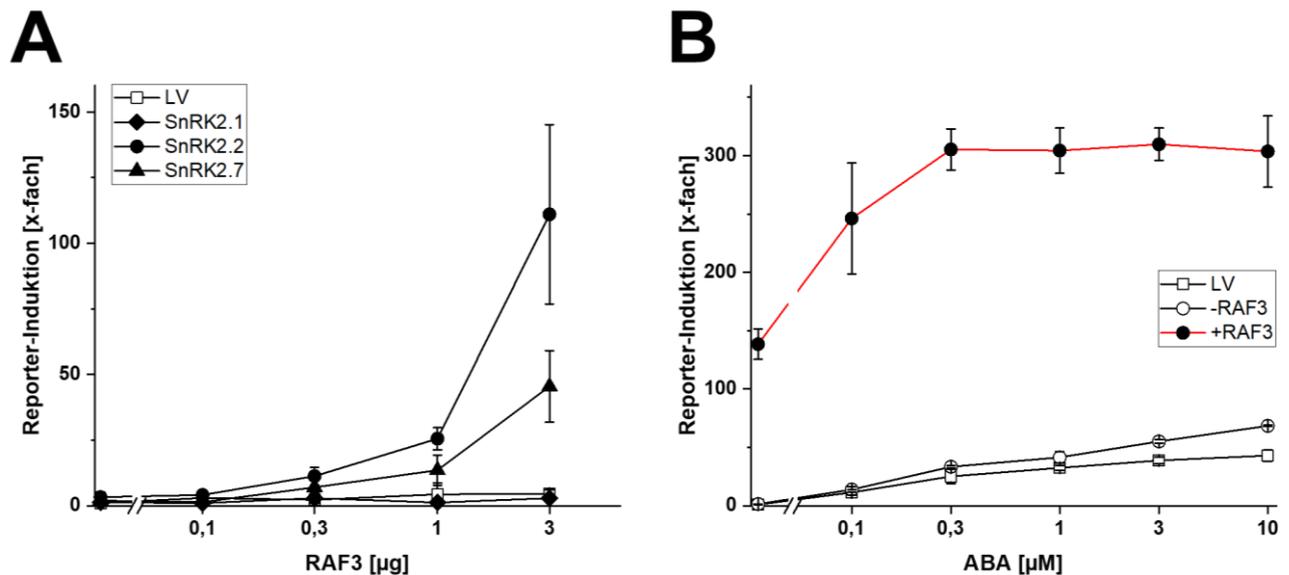
**Abbildung 2-5 Aktivierung des ABA-Signalwegs in Hefe durch RAF3.**

RAF3-induzierte und SnRK2-abhängige Induktion des Reporters ohne (leere Balken) und mit (volle Balken) zusätzlicher RAF3-Expression in BMA64-1A Reporterhefen. ABF2 und RAF3 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimierten, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Um die Aktivierung von SnRK2s und den Einfluss von RAF3 in einem pflanzlichen *in vivo* System zu bestätigen, wurde das Protoplastensystem verwendet. Für die Analysen wurden konstitutiv aktive Konstrukte unter Kontrolle des 35S-Promotors und NOS- (*nopaline synthase*) Terminators im Lllc\_F\_1-2 Vektor generiert. *aba2-1* Protoplasten, die kein weiteres ABA synthetisieren können wurden mit SnRK2s und RAF3 kotransfiziert und die Luciferaseaktivität nach 17 h bei 25 °C gemessen. Die Reporterexpression ohne Effektoren wurde auf 1 gesetzt.

Durch die alleinige Expression der hier getesteten SnRK2s kam es zu keiner Induktion des Promotors, vermutlich durch die im Protoplasten vorhandenen Komponenten des ABA-Signalwegs, vor allem PP2Cs, die eine Aktivierung durch SnRK2s verhindern. Durch die Titration von RAF3 von bis zu 3 µg kam es für SnRK2.1 zu keiner Induktion des Reporters, vergleichbar mit dem Leervektor (LV). Für SnRK2.2 und SnRK2.7 konnte eine gesteigerte Induktion des Reporters mit erhöhter RAF3-Konzentration beobachtet werden. Bei 3 µg RAF3 wurde der Reporter mit SnRK2.2 um 45- und für SnRK2.7 über 100-fach induziert. Die Korrelation von RAF3 in Verbindung mit SnRK2.2 und SnRK2.7 lässt auf einen direkten Effekt und eine Aktivierung der RAF-Kinase auf diese SnRK2s schließen, die dann nicht mehr durch endogene PP2Cs inhibiert werden und den Reporter induzieren können (Abb. 2-6A).

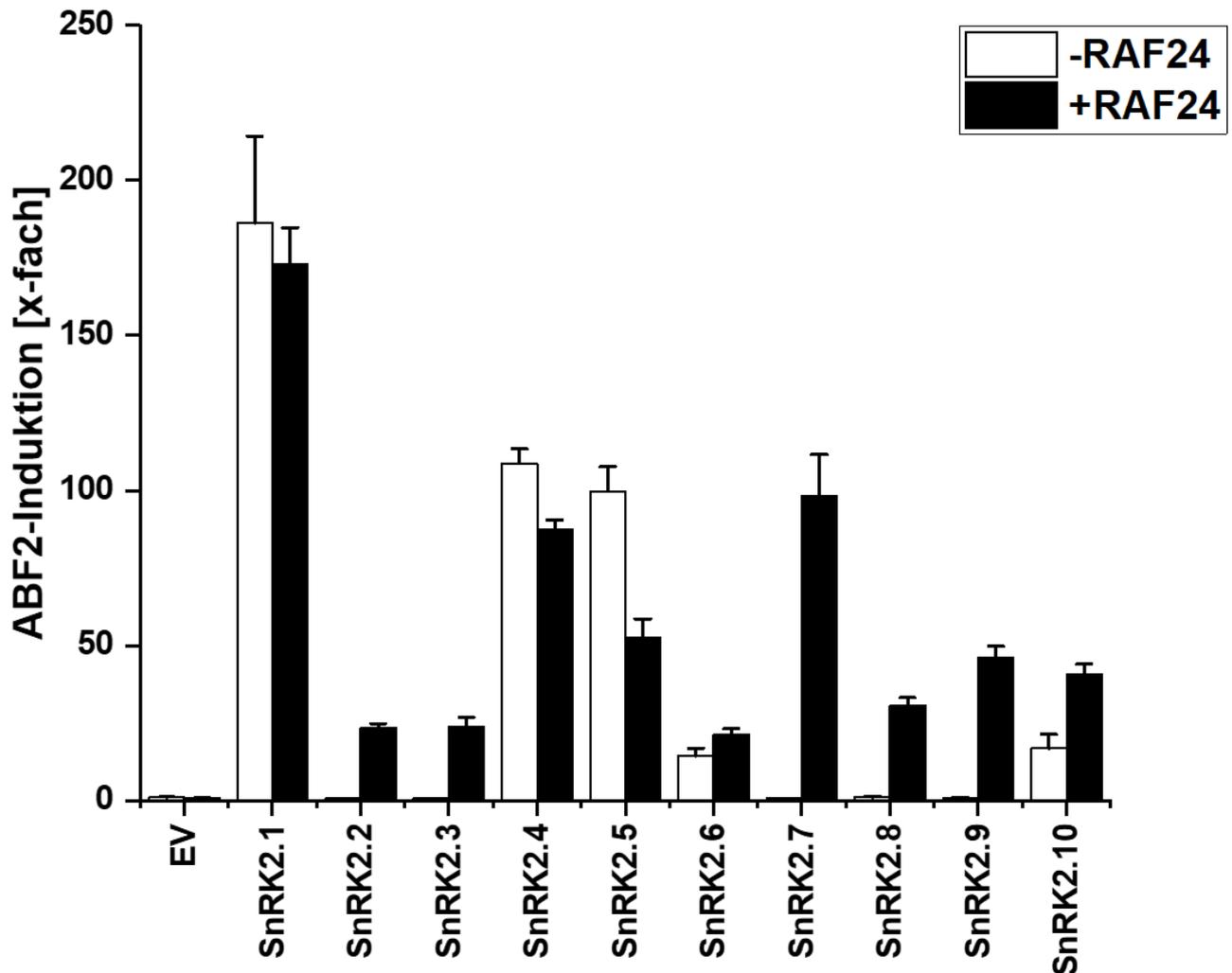
SnRK2.7 wurde aufgrund der starken Induktion durch RAF3 ausgewählt, um einen möglichen Effekt von ABA auf das System zu identifizieren. Hierzu wurde eine Titrationsreihe bis zu 10 µM ABA analysiert. Durch die Titration von ABA kam es sowohl für den Leervektor als auch für SnRK2.7 ohne RAF3, zu einer Induktion des Reporters um ca. 40-fach bzw. 70-fach bei 10 µM ABA-Konzentration, was durch eine Inhibierung von endogenen PP2Cs durch RCARs bei steigender ABA-Konzentration und dadurch eine Induktion des Promotors durch die nun aktiven SnRK2s begründet wird. Die Koexpression von RAF3 verstärkte die Induktion des Reporters durch SnRK2.7 auf eine über 100-fache Induktion ohne zusätzliches ABA. Mit einer Konzentration von bereits 0,3 µM ABA erreichte die Induktion den Maximalwert von etwa 300-fach, welcher auch bei höheren ABA-Konzentrationen konstant blieb. Eine Erhöhung des intrazellulären ABA-Gehalts beeinflusste die Induktion des Reporters durch SnRK2.7 und RAF mit etwa 3-fach, weshalb eine leichte ABA-abhängige Regulation des Systems durch die Interaktion von ABA auf endogene RCARs und die damit verbundene Aufhebung der inhibitorischen PP2Cs wahrscheinlich ist (Abb. 2-6B).



**Abbildung 2-6 *In vivo* Analyse von RAF3 und SnRK2s in Arabidopsis Protoplasten.**

aba2-1 Protoplasten ( $10^5$ ) wurden jeweils mit 3  $\mu\text{g}$  p35S::GUS, 5  $\mu\text{g}$  pRD29B::LUC, 3  $\mu\text{g}$  Effektor DNA transfiziert und für 17 h bei 25 °C inkubiert. (A) Induktion des Reporters durch Titration von RAF3 in Kombination mit SnRK2.1 (Raute), SnRK2.2 (Viereck) und SnRK2.7 (Dreieck). (B) Analyse der ABA-Abhängigkeit durch Titration von ABA mit SnRK2.2 und RAF3 in Anwesenheit (voller Kreis) oder Abwesenheit (leerer Kreis) von RAF3. Die Reporterexpression ohne Effektoren wurde auf 1 gesetzt. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Transformationen.

Zum direkten Vergleich der Effekte von RAF3 im ABA-Signalweg, wurde zusätzlich RAF24 der Untergruppe B4 in Hefe getestet, welches in einem physiologischen Screen von einer Mitarbeiterin des Lehrstuhls als Komponente des ABA-Signalwegs identifiziert wurde.

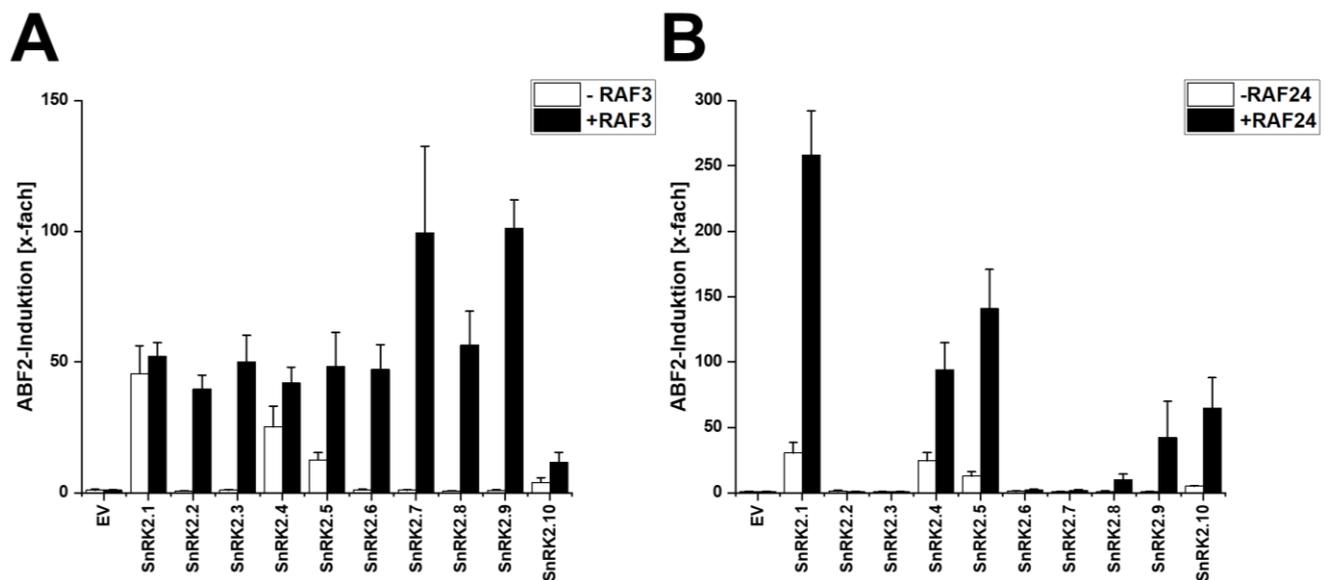


**Abbildung 2-7 Aktivierung des ABA-Signalwegs in Hefe durch RAF24.**

RAF24-induzierte und SnRK2-abhängige Induktion des Reporters ohne (leere Balken) und mit (volle Balken) zusätzlicher RAF24-Expression in BMA64-1A Reporterhefen. ABF2 und RAF24 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Ähnlich der RAF3-Analyse konnte für RAF24 nur ein geringer Effekt auf die bereits aktiven SnRK2s, SnRK2.1, SnRK2.4, SnRK2.6 und SnRK2.10 festgestellt werden, wenngleich dieser bis auf SnRK2.6 und SnRK2.10 diesmal leicht inhibitorisch erschien. Wieder schienen SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.8 ähnlich stark durch RAF24 aktiviert zu werden, was eine ca. 20-, 25- und 30-fache Induktion des Reporters zur Folge hat. Am stärksten aktiviert wurden wieder SnRK2.7 und SnRK2.9 mit einer 100- bzw. 50-fachen Induktion (Abb. 2-7).

### 2.1.2 RAFs mindern den inhibitorischen Effekt von PP2Cs auf SnRK2s



**Abbildung 2-8 Wirkung von RAFs auf den inhibitorischen Effekt von ABI1.**

RAF-abhängige Inhibierung des Reporters durch SnRK2s und ABI1 ohne (leere Balken) und mit (volle Balken) zusätzlicher RAF3 (A) oder RAF24 (B) Expression in BMA64-1A Reporterhefen. ABF2 bzw. RAFs und ABI1, wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Durch die Koexpression von ABI1 kam es für SnRK2s der Untergruppe I zu einer starken Reduktion des Luciferasesignals von mindestens 80% im Vergleich zur alleinigen SnRK2-Expression. Diese deutliche Inhibierung durch ABI1 wurde durch die Koexpression von RAF3 kaum beeinflusst, wobei für SnRK2.4, SnRK2.5 und SnRK2.10 wieder eine leicht erhöhte Induktion verglichen ohne RAF3 festgestellt werden konnte. Für SnRK2s der Untergruppe III konnten vergleichbare Werte, wie ohne ABI1, im Bereich einer etwa 40- bis 60-fachen Induktion für SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.8 gemessen werden, welche nicht mehr durch ABI1 inhibierbar waren. Die durch RAF3 aktivierten Kinasen SnRK2.7 und SnRK2.9 wurden durch ABI1 bis zu 80% bzw. 55% inhibiert (Abb. 2-8A).

Für die RAF24-Koexpression und dessen Wirkung auf SnRK2s und ABI1 zeigte sich ein gegensätzliches Ergebnis. SnRK2s der Untergruppe III wurden durch ABI1 komplett inhibiert, wodurch keine Induktion des Reporters mehr festgestellt werden konnte. Ausnahmen bildeten SnRK2.8 mit einer schwächeren Inhibierung von ca. 70%

und SnRK2.9, welches vergleichbare Werte wie ohne ABI1 und damit keinen Einfluss der Phosphatase zeigte. Im Gegensatz hierzu standen SnRK2s der Untergruppe I, die wieder ohne RAF-Expression zu mindestens 80% inhibiert wurden, jedoch mit RAF24-Koexpression weiterhin zu einer starken Induktion des Luciferasereporters führten (Abb. 2-8B).

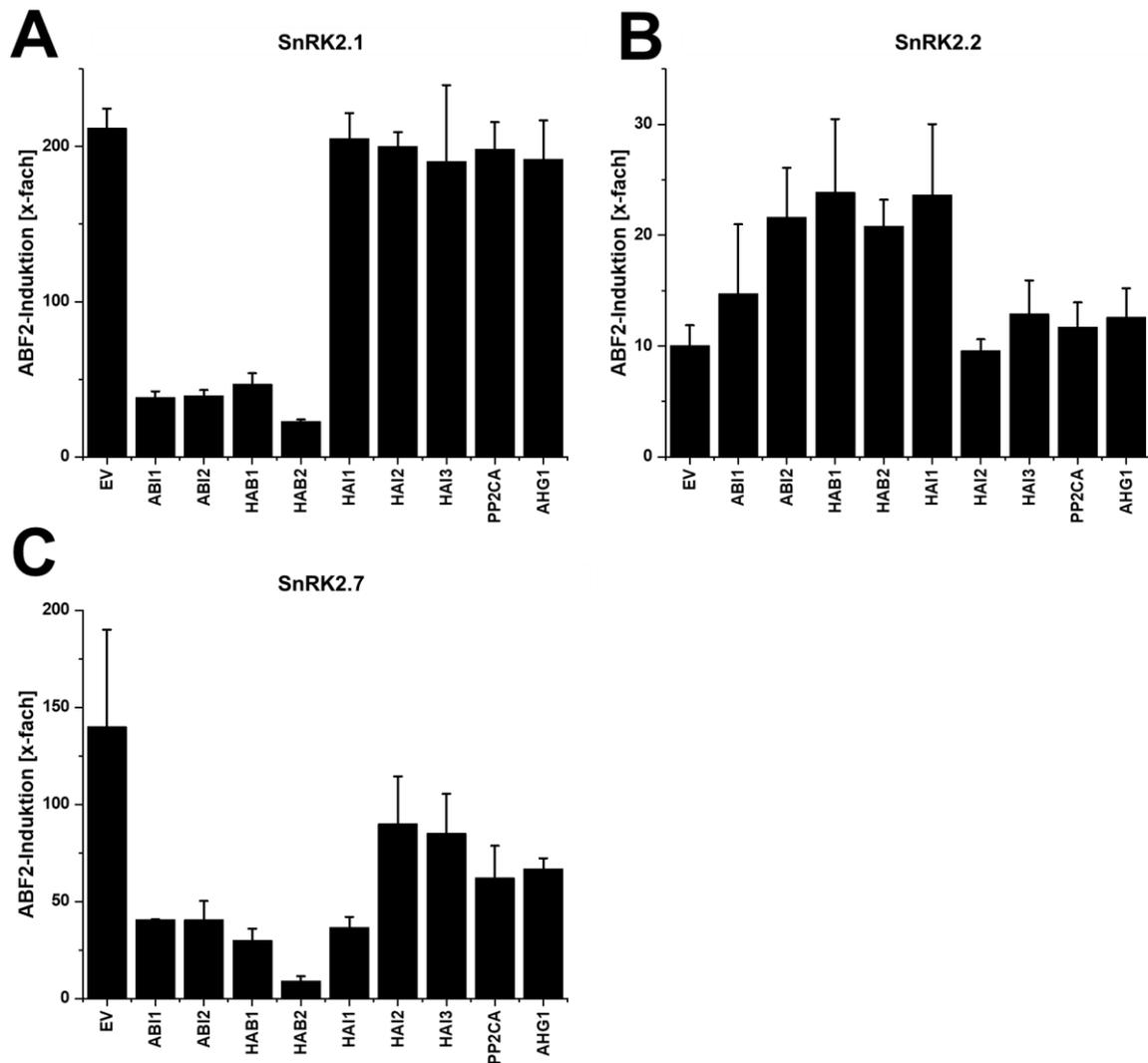
RAF3 schien eine aktivierende Wirkung auf die hauptsächlich am ABA-Signalweg beteiligten SnRK2s, SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6 zu haben, welche dann nicht mehr effizient durch ABI1 inhibiert werden konnten. Für RAF24 hingegen schienen SnRK2s der Untergruppe I wie SnRK2.1, SnRK2.4, SnRK2.5, SnRK2.9 und SnRK2.10 nach deren möglicher Modifikation durch RAF24 nicht mehr durch ABI1 inhibierbar, was auf eine erste Spezifität von RAF-Kinasen auf verschiedene SnRK-Untergruppen oder PP2Cs hindeutet.

Eine mögliche Spezifität dieses Effekts von RAF3 auf SnRK2 oder die inhibierende Phosphatase sollte im Folgenden zunächst durch das Testen verschiedener PP2Cs analysiert werden.

Durch die Koexpression von RAF3, SnRK2.1 und verschiedenen PP2Cs kam es für die Untergruppe A (ABI1, ABI2, HAB1, HAB2) zu einer Inhibierung von ca. 80%, während für die Untergruppe B (HAI1, HAI2, HAI3, PP2CA, AHG1) keine Inhibierung der Reporterinduktion festgestellt werden konnte (Abb. 2-9A).

Für durch RAF3 aktiviertes SnRK2.2 konnte durch die Koexpression von PP2Cs keine Inhibierung festgestellt werden. Für die Untergruppe A und auch HAI1 wurde der Reporter eher noch induziert und zwar bis zu 2-fach. Die Koexpression der Untergruppe B zeigte keinen Einfluss auf die Reporterinduktion (Abb. 2-9B).

Ein ähnliches Ergebnis wie mit SnRK2.1 zeigte sich für durch RAF3 aktiviertes SnRK2.7. Die Kinase wurde ebenfalls stark durch die Expression der Untergruppe A reprimiert, um 70% für ABI1 und ABI2, ca. 75% für HAB1 und am stärksten um über 90% mit HAB2. Für die Untergruppe B konnte eine schwächere Inhibierung von etwa 35% für HAI2 bis zu 55% für PP2CA festgestellt werden. Ausnahme bildet HAI1, welches ähnlich stark wie HAB1 die Induktion um knapp 80% inhibierte (Abb. 2-9C).

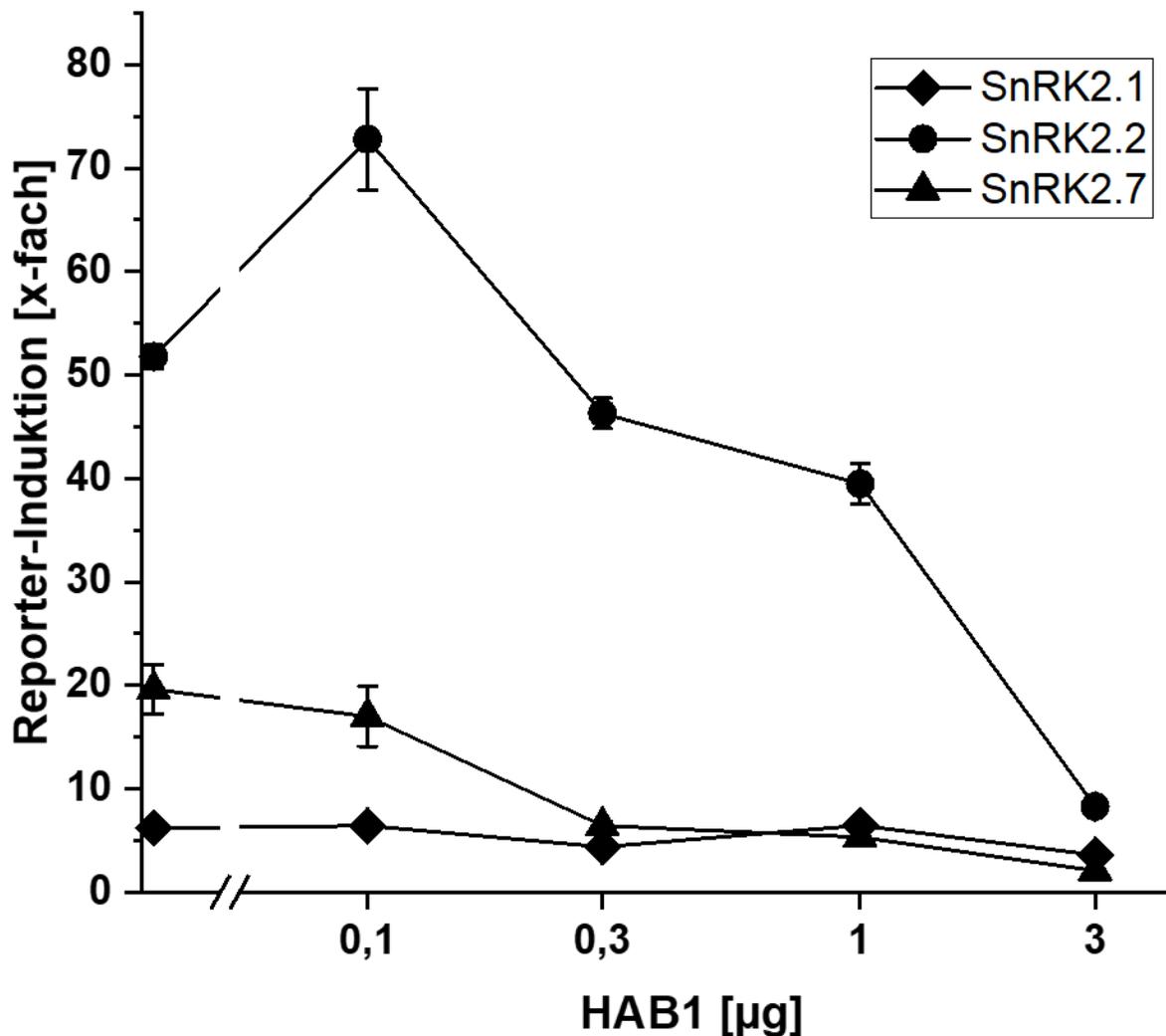


**Abbildung 2-9 Inhibierung der Reporterinduktion von PP2Cs durch RAF3 aktivierte SnRK2s.**

SnRK2.1 (A), SnRK2.2 (B) und SnRK2.7 (C) in Kombination mit RAF3-abhängiger Induktion des Reporters (EV) mit zusätzlicher Expression der PP2Cs in BMA64-1A Reporterhefen. ABF2, bzw. RAF3 und PP2Cs wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Das Ergebnis einer nicht mehr inhibierbaren, durch RAF3 aktivierten SnRK2.2, sollte im Protoplastensystem überprüft werden. Das ohnehin kaum aktive SnRK2.1 wurde von einer ungefähr 6-fachen Reporterinduktion durch die HAB1-Titration bei 3  $\mu$ g um 66% auf 2-fach reprimiert. Auch für SnRK2.7 konnte eine anfängliche durch RAF3 induzierte Reporterinduktion von 20-fach durch bereits 0,3  $\mu$ g HAB1 um fast 70% auf 6-fach inhibiert werden. Interessanterweise kam es für das durch RAF3 aktivierte

SnRK2.2 im submikromolaren Bereich von 0,1  $\mu\text{g}$  HAB1 zu einer erhöhten Reporterinduktion. Durch die Titration von bis zu 1  $\mu\text{g}$  HAB1 kam es nur zu einer Inhibierung von 25%, welche bei 3  $\mu\text{g}$  HAB1 noch auf 85% ansteigt (Abb. 2-10). Eine effektive Inhibierung von aktiviertem SnRK2.2 war im Vergleich zu den anderen getesteten SnRK2s erst bei höheren mikromolaren Konzentrationen an HAB1 möglich.

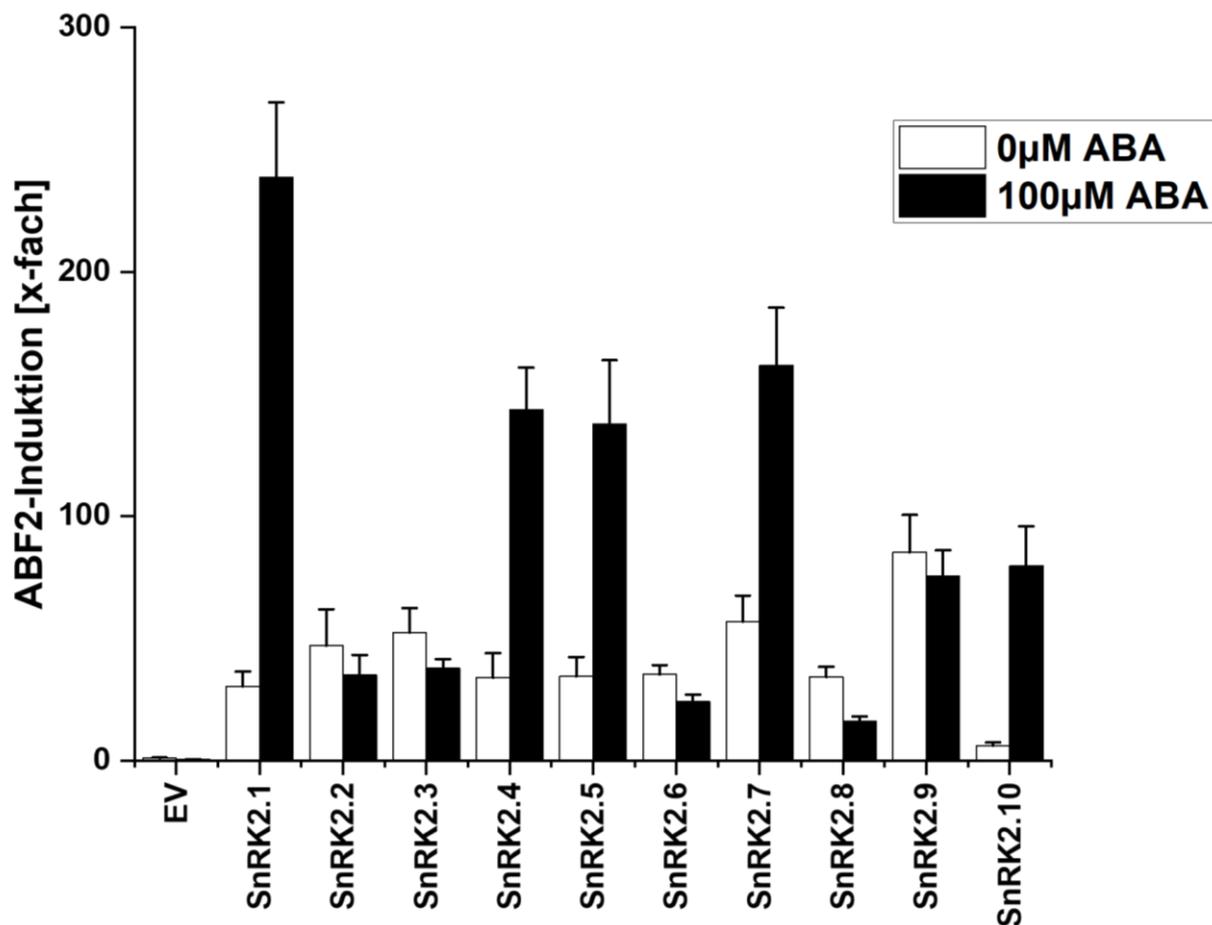


**Abbildung 2-10** *In vivo* Analyse von RAF3 auf HAB1 und SnRK2s in Arabidopsis Protoplasten.

aba2-1 Protoplasten ( $10^5$ ) wurden jeweils mit 3  $\mu\text{g}$  p35S::GUS, 5  $\mu\text{g}$  pRD29B::LUC, 3  $\mu\text{g}$  Effektor DNA transfiziert und für 17 h bei 25 °C inkubiert. Inhibierung der Reporterinduktion durch Titration von HAB1 auf RAF3 in Kombination mit SnRK2.1 (Raute), SnRK2.2 (Viereck) und SnRK2.7 (Dreieck). Die Reporterexpression ohne Effektoren wurde auf 1 gesetzt. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Transformationen.



### 2.1.3 Analyse von RAFs auf ABA-Antwort und -Signaltransduktion



**Abbildung 2-11 Regulation des ABA-Signalwegs bei RAF3 aktivierten SnRK2s.**

Reporterinduktion des ABA-Signalwegs bestehend aus ABF2, SnRK2s, RAF3, HAB1 und RCAR12 ohne (leere Balken) und mit (volle Balken) Zugabe von 100  $\mu$ M ABA in BMA64-1A Reporterhefen. ABF2, bzw. RAF3, HAB1 und RCAR12 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Durch die zusätzliche Expression von RCARs konnte für die durch RAF3 aktivierten SnRK2s der Untergruppe III, sowie für SnRK2.8 und SnRK2.9 keine Regulation durch den ABA-Signalweg durch die Zugabe von 100  $\mu$ M ABA beobachtet werden. Diese SnRK2s zeigten vergleichbare, leicht geringere Induktionswerte wie ohne ABA und damit keinen positiven Effekt des Hormons auf die Reporterinduktion, was eigentlich durch eine Inhibierung von HAB1 durch im Komplex mit RCAR12 gebundenes ABA die Inhibierung auf SnRK2s minimieren würde und so zu einer gesteigerten Reporterinduktion führen sollte. Dies ist in Übereinstimmung mit der PP2C-Analyse,

wo SnRK2s der Untergruppe III ebenfalls nicht mehr inhibiert wurden. Mit der RCAR-Koexpression wurde eine zusätzliche Inhibierung bereits ohne ABA erreicht, wodurch auch SnRK2.8 und SnRK2.9 nicht mehr inhibierbar erscheinen.

Für SnRK2s der Untergruppe I und SnRK2.7 zeigte sich ein gegensätzliches Ergebnis. Hier wurden die SnRK2s, wie erwartet, stark durch die HAB1-Koexpression inhibiert und konnten durch 100  $\mu\text{M}$  ABA-Gabe in Verbindung mit RCAR12 die inhibierende Wirkung der Phosphatase aufheben und somit die ABA-Antwort wiederherstellen (Abb. 2-11).

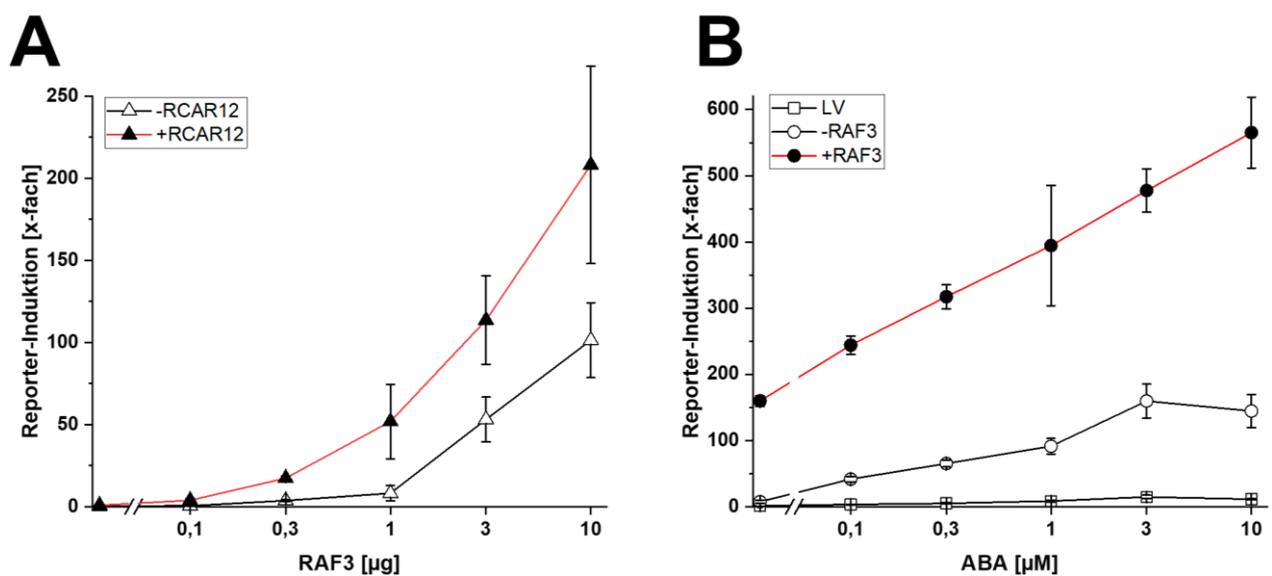
Eine nicht weiter wirksame Regulation von unter anderem SnRK2.2 in Kombination mit RAF durch den ABA-Signalweg wurde hier bestätigt und sollte im Folgenden in Protoplasten analysiert werden.

Zunächst wurde der Effekt von RAF3 auf das Reportersystem und die ABA-Signalkaskade untersucht. Durch die Titration verschiedener Konzentrationen von RAF3 kam es ab 0,3  $\mu\text{g}$  RAF3 mit RCAR12 und ab 1  $\mu\text{g}$  RAF3 ohne RCAR12 zur Induktion des Reporters um etwa 15-fach bzw. knapp 10-fach. Diese Induktionswerte stiegen bei 10  $\mu\text{g}$  RAF3 noch weiter an auf 200-fach bzw. 100-fach (Abb. 2-12A). Durch die RCAR-Expression reagierte das System sensitiver auf RAF3 und kann den Reporter bei niedrigeren Konzentrationen bereits höher induzieren als ohne RCAR12. Dies kann durch eine bereits aktivere SnRK2.2, durch die inhibierende Wirkung der Expression von RCAR12 auf HAB1, begründet werden, wodurch ein Effekt von RAF3 auf SnRK2.2 bereits früher und stärker deutlich wird, als ohne RCAR12 mit stärker inhibierendem Effekt der Phosphatase.

In einem weiteren Experiment sollte die Abhängigkeit von ABA auf das System getestet werden. Durch die Expression eines Leervektors (LV) kam es durch die Titration von bis zu 10  $\mu\text{M}$  ABA zu einer über 10-fachen Induktion des Reporters, durch die inhibitorische Wirkung der endogenen RCARs auf die endogenen PP2Cs. Bei maximaler ABA-Konzentration sank die Induktionsrate leicht, was vermutlich durch eine leichte Toxizität von ABA als Säure gegenüber den Protoplasten bedingt ist.

Durch die Expression von SnRK2.2, HAB1 und RCAR12 kam es mit steigender ABA-Konzentration zu einer erhöhten Induktion des Reporters, welche bei 3  $\mu\text{M}$  ABA ihr Maximum von über 150-fach erreicht.

Mit der RAF3-Koexpression wurde die ABA-Antwort bereits ohne zusätzliches ABA durch das durch RAF3 aktivierte SnRK2.2 um über 150-fach induziert. Durch die Zugabe von ABA konnte diese Induktion bei 10  $\mu\text{M}$  noch auf über 550-fach gesteigert werden, wobei die Titration von RAF3 eine nahezu lineare Steigerung der Reporteraktivität bewirkte, welche auch bei 10  $\mu\text{M}$  ABA noch nicht ihr Maximum erreicht zu haben scheint (Abb. 2-12B). Die Induktion des Reporters und damit die Aktivierung der ABA-Signalkaskade konnte sowohl durch RAF3-Expression als auch durch ABA-Zugabe induziert und reguliert werden.

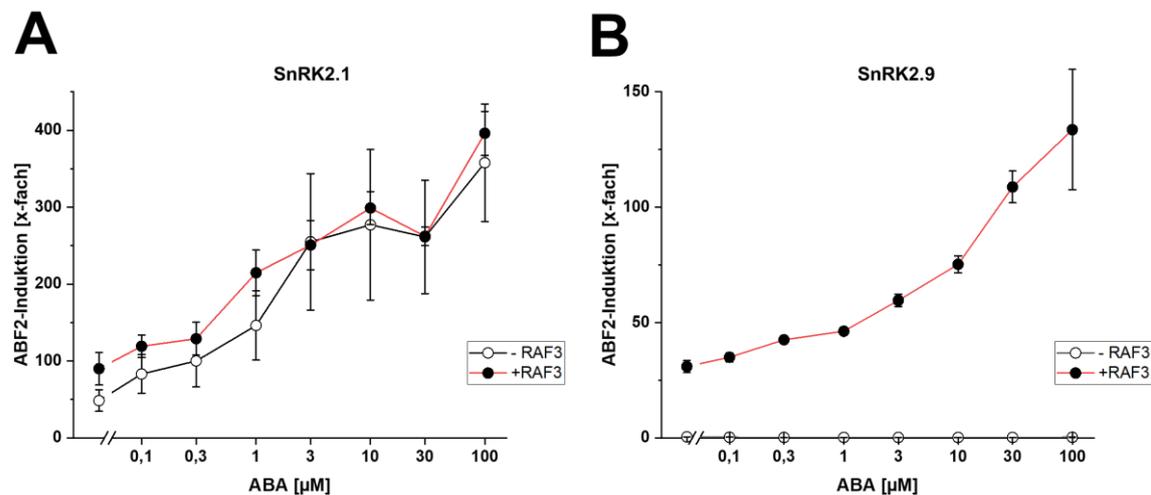


**Abbildung 2-12 *In vivo* Analyse von RAF3 und SnRK2s in Arabidopsis Protoplasten.**

aba2-1 Protoplasten ( $10^5$ ) wurden jeweils mit 3  $\mu\text{g}$  p35S::GUS, 5  $\mu\text{g}$  pRD29B::LUC, 3  $\mu\text{g}$  Effektor DNA transfiziert und für 17 h bei 25 °C inkubiert. (A) RAF3-abhängige Regulation des ABA-Signalwegs mit Rezeptorkomplex aus HAB1 und RCAR12 in Anwesenheit (voller Kreis) oder Abwesenheit (leerer Kreis) von RCAR12. (B) ABA-abhängige Regulation des ABA-Signalwegs mit Rezeptorkomplex aus HAB1 und RCAR12 in Anwesenheit (volles Dreieck) oder Abwesenheit (leeres Dreieck) von RAF3. Die Reporterexpression ohne Effektoren wurde auf 1 gesetzt. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Transformationen.

Um eine Spezifität der RAF-Kinasen auf bestimmte SnRK2s zu bestätigen und den Einfluss auf die ABA-Antwort zu analysieren, wurden die verschiedenen Kinasen in Kombination mit ABF2, HAB1 und RCAR12 im Hefesystem untersucht und die Signalkaskade durch zusätzliche ABA-Exposition aktiviert. Die Analyse erfolgte für

ausgewählte SnRK2s der verschiedenen Untergruppen in Kombination mit RAF3 oder RAF24.



**Abbildung 2-13 Einfluss von RAF3 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2s der Untergruppe I.**

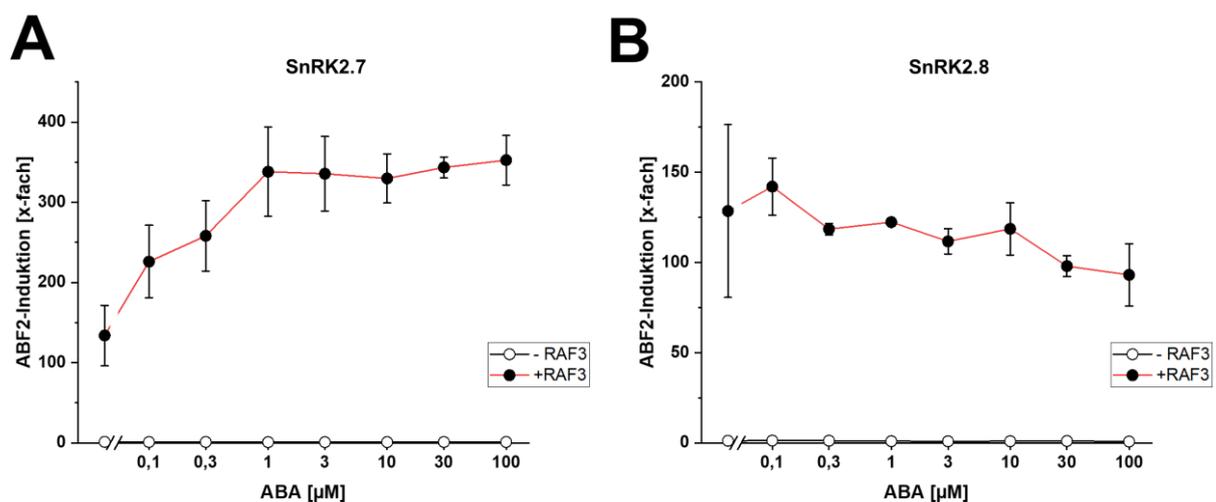
ABF2, SnRK2.1 (A) oder SnRK2.9 (B), HAB1 und RCAR12 exprimierende BMA64-1A Reporterhefen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ABA, jeweils ohne (leerer Kreis) oder mit (voller Kreis) RAF3 für 18 h bei 30 °C inkubiert. ABF2, bzw. HAB1, RAF3 und RCAR12 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Die Expression von SnRK2.1 (leerer Kreis) führte zu einer Induktion des Reporters um 50-fach. Durch die Titration von ABA wurde die inhibierende Phosphatase im Rezeptorkomplex stärker gebunden und dadurch die Inaktivierung der Kinase reduziert, was zu einer stärkeren Induktion des Reporters um bis zu knapp 400-fach bei 100 µM ABA führte, was die Regulation des Systems durch ABA bestätigt. Durch die zusätzliche Expression von RAF3 (voller Kreis) konnte kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu ohne RAF (leerer Kreis) festgestellt werden, was auf keinen Einfluss von RAF3 auf die Signalkaskade mit SnRK2.1 hinweist (Abb. 2-13A).

Für SnRK2.9 wurde, wie erwartet, ohne aktivierendes RAF (leerer Kreis), keine Induktion des Reporters detektiert. Durch RAF3 (voller Kreis) wurde die Kinase aktiviert und kann den Reporter um 30-fach induzieren, was durch Zugabe von 100 µM ABA auf über 130-fach verstärkt werden konnte (Abb. 2-13B).

Für SnRK2.7 kam es zu einem ähnlichen Ergebnis wie für SnRK2.9. Ohne RAF3-Koexpression (leerer Kreis) ist die Kinase inaktiv und konnte den Reporter nicht induzieren. Durch RAF3 (voller Kreis) wird SnRK2.7 aktiv und konnte den Reporter bereits um über 100-fach induzieren, was mit einer über 300-fachen Induktion ab 1  $\mu\text{M}$  ABA das Maximum erreichte (Abb. 2-14A).

Das inaktive SnRK2.8 wurde durch RAF3-Koexpression (voller Kreis) auf die maximale Induktionsrate von über 100-fach induziert, welche durch die kontinuierliche steigende Konzentration an ABA auf knapp unter 100-fach absank (Abb. 2-14B). Eine positive Wirkung auf die Induktion des Reporters durch den ABA-Rezeptorkomplex und ABA Zugabe oder auch eine negative Wirkung durch die Phosphatase ohne zusätzliches ABA, konnte hier nicht beobachtet werden, da schon ohne ABA-Exposition die maximale Induktion des Reporters detektiert wurde.

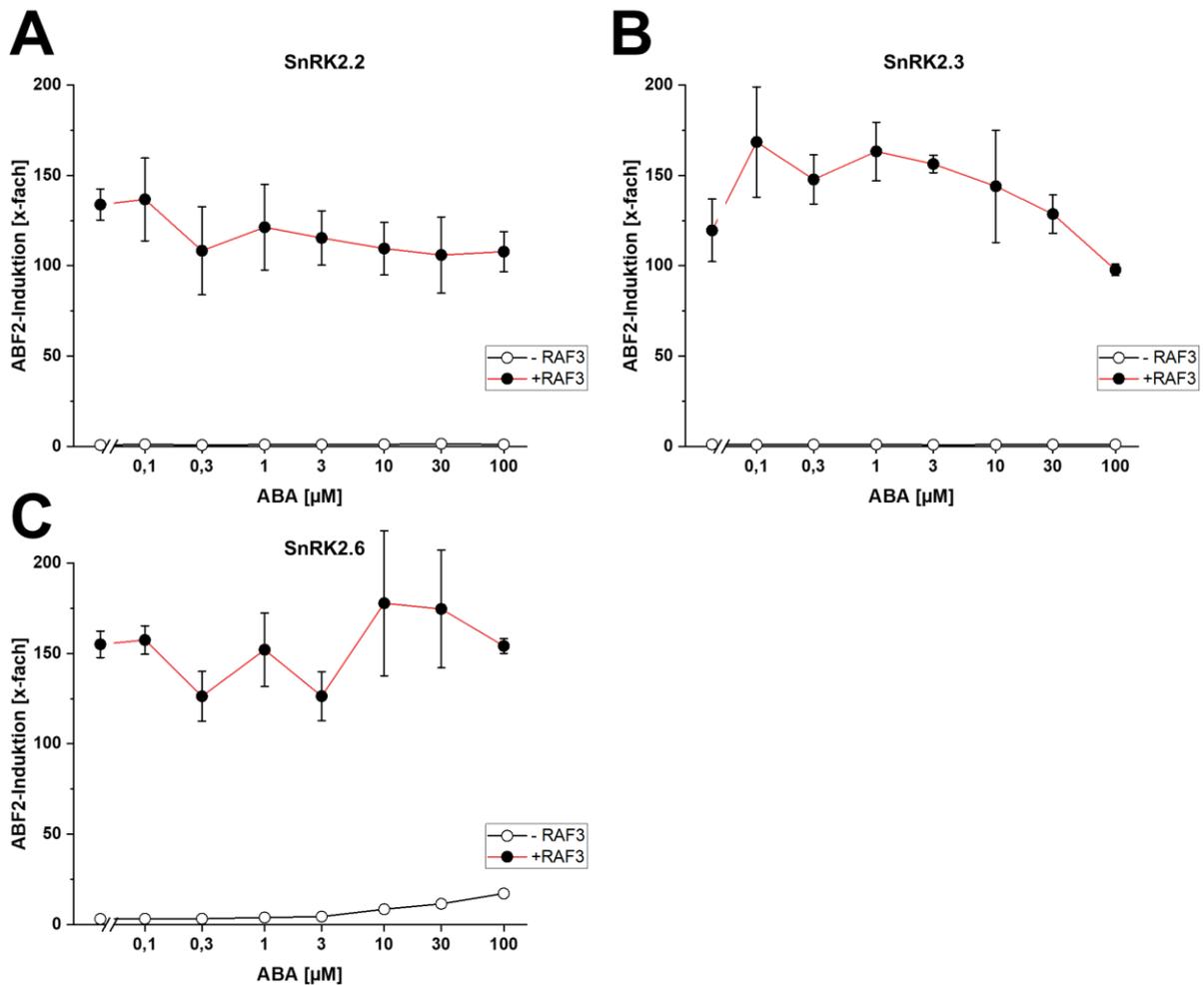


**Abbildung 2-14 Einfluss von RAF3 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2s der Untergruppe II.**

ABF2, SnRK2.7 (A) oder SnRK2.8 (B), HAB1 und RCAR12 exprimierende BMA64-1A Reporterhefen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ABA, jeweils ohne (leerer Kreis) oder mit (voller Kreis) RAF3 für 18 h bei 30 °C inkubiert. ABF2, bzw. HAB1, RCAR12 und RAF3 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

SnRK2.6 zeigte bereits ohne RAF3 eine ca. 15-fache Induktion des Reporters bei 100  $\mu$ M ABA. Für SnRK2s der Untergruppe III kam es durch die RAF3-Koexpression zu einer über 100-fachen Induktion des Reporters, mit der stärksten Induktion von über 150-fach für SnRK2.6, wobei die Titration von ABA auf SnRK2.6 praktisch keinen Einfluss zeigte. Diese Induktionsraten sanken für SnRK2.2 und SnRK2.3 durch die Titration von bis zu 100  $\mu$ M ABA um ca. 20% des Startwerts, was, wie bei SnRK2.8, zu keiner positiven Regulation des Systems durch ABA führte (Abb. 2-15).

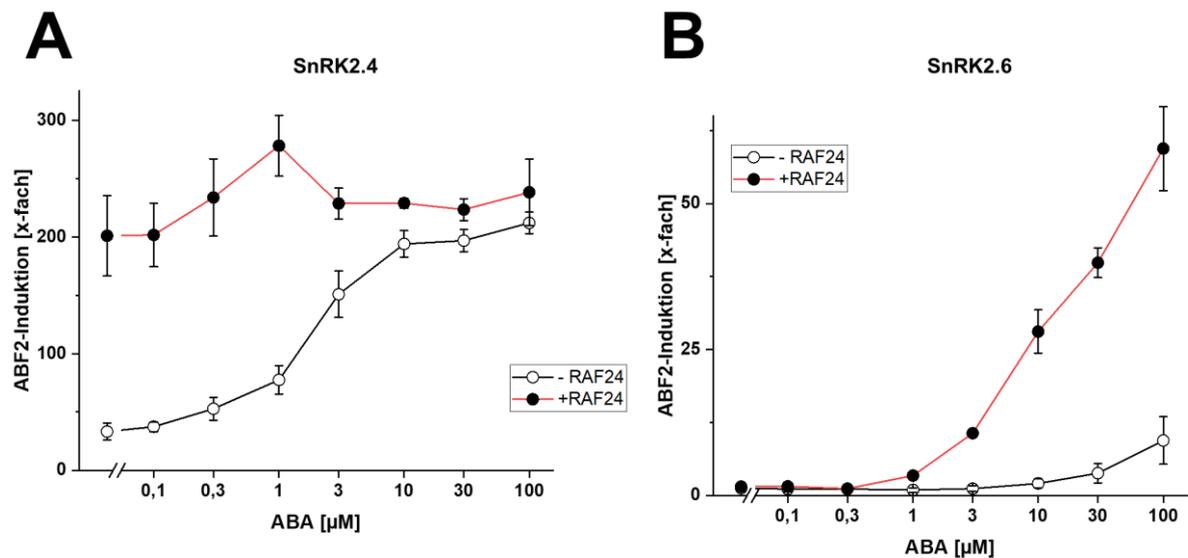
Durch RAF3 wurden die in Hefe inaktiven Kinasen SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.7, SnRK2.8 und SnRK2.9 aktiviert und können den Luciferasereporter induzieren. Für SnRK2.7 und SnRK2.9 konnte weiterhin eine durch ABA und den ABA-Rezeptorkomplex vermittelte Regulation festgestellt werden, wodurch diese Kinasen vermutlich einen wichtigen Teil zur ABA-Stressantwort beitragen. Hierzu gegensätzlich verhielten sich SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6 und SnRK2.8, welche nach RAF3-Aktivierung bereits eine maximale Induktion des Reporters zeigten, welche nicht durch HAB1 inhibierbar scheint und dadurch auch keine Regulation oder Einfluss von ABA mehr auf den Rezeptorkomplex festgestellt werden konnte. Auf SnRK2.1 zeigte die RAF3-Koexpression keinen Einfluss. Eine leichte Inhibierung des Systems durch ABA kann eventuell auf eine geringe Toxizität von ABA auf die Hefezellen zurückgeführt werden.



**Abbildung 2-15 Einfluss von RAF3 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2s der Untergruppe III.**

ABF2, SnRK2.2 (A), SnRK2.3 (B) oder SnRK2.6 (C), HAB1 und RCAR12 exprimierende BMA64-1A Reporterhefen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ABA, jeweils ohne (leerer Kreis) oder mit (voller Kreis) RAF3 für 18 h bei 30 °C inkubiert. ABF2, bzw. HAB1, RCAR12 und RAF3 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Die für RAF3 beobachteten Effekte auf spezifische Komponenten des ABA-Signalwegs sollten ebenfalls für RAF24 überprüft werden.



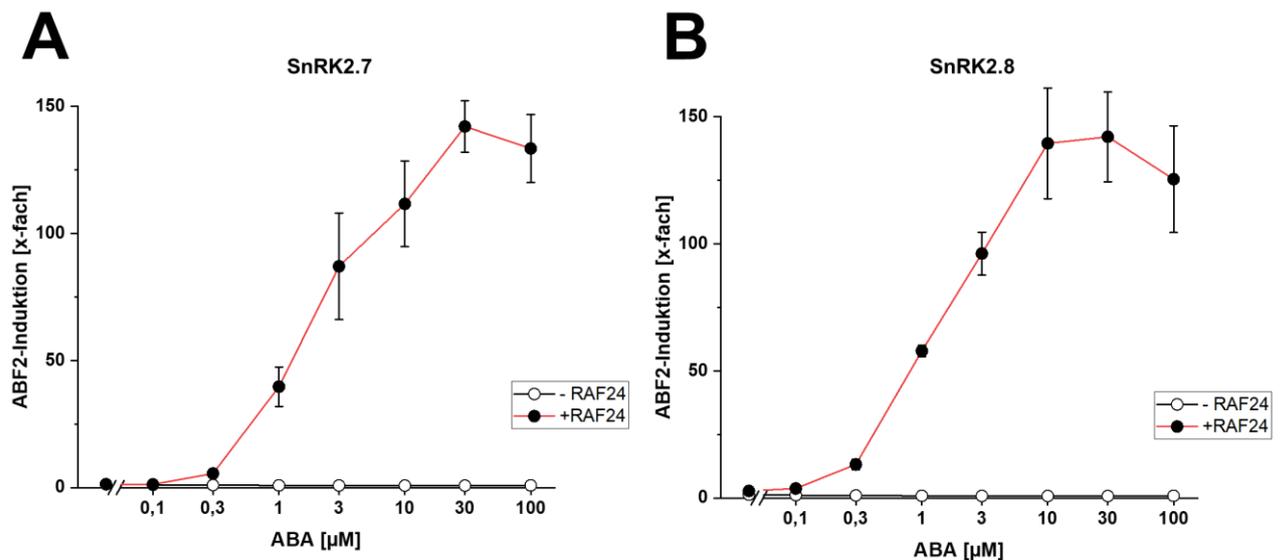
**Abbildung 2-16 Einfluss von RAF24 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2.4 und SnRK2.6.**

ABF2, SnRK2.4 (A) oder SnRK2.6 (B), HAB1 und RCAR12 exprimierende BMA64-1A Reporterhefen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ABA, jeweils ohne (leerer Kreis) oder mit (voller Kreis) RAF24 für 18 h bei 30 °C inkubiert. ABF2, bzw. HAB1, RCAR12 und RAF24 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Für SnRK2.4 konnte, wie erwartet, die Regulation des Rezeptorkomplexes durch die Zugabe von ABA reguliert werden. Dadurch wurde mit steigender ABA-Konzentration der Reporter durch die geringe Aktivität der Phosphatase bzw. die höhere Aktivität der Kinase stärker induziert von etwa 30-fach ohne ABA auf bis 200-fach mit 100 µM ABA (leerer Kreis). Durch Koexpression von RAF24 (voller Kreis) kam es hier bereits ohne zusätzliches ABA zu einer ähnlich starken Induktion des Reporters wie ohne RAF24 mit 100 µM ABA. Durch 1 µM ABA stieg die Induktion noch leicht auf über 270-fach an und sank mit 100 µM ABA wieder leicht auf etwa 230-fach (Abb. 2-16A).

Das bereits aktive SnRK2.6 konnte bereits ohne RAF-Expression den Reporter um knapp 10-fach mit 100 µM induzieren. Durch die zusätzliche RAF24-Expression wurde dieser Induktionswert bereits mit 3 µM ABA erreicht und stieg mit 100 µM noch auf über 50-fach an. SnRK2.6 blieb mit Koexpression von RAF24 noch durch ABA und den Rezeptorkomplex regulierbar, reagierte aber folglich sensitiver und induzierte den Reporter dadurch stärker (Abb. 2-16B).





**Abbildung 2-17 Einfluss von RAF24 auf die Regulation des ABA-Signalwegs durch SnRK2s der Untergruppe II.**

ABF2, SnRK2.7 (A) oder SnRK2.8 (B), HAB1 und RCAR12 exprimierende BMA64-1A Reporterhefen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ABA, jeweils ohne (leerer Kreis) oder mit (voller Kreis) RAF24 für 18 h bei 30 °C inkubiert. ABF2, bzw. HAB1, RCAR12 und RAF24 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Für SnRK2.7 und SnRK2.8 konnte mit RAF24 eine Aktivierung und folglich eine Regulation durch ABA und den Rezeptorkomplex beobachtet werden. Die beiden Kinasen verhielten sich im Kurvenverlauf annähernd gleich mit maximalen Induktionswerten von etwa 140-fach, wobei dieser Wert für SnRK2.7 mit 30 µM und für SnRK2.8 bereits mit 10 µM ABA erreicht wurde (Abb. 2-17).

RAF24 konnte ähnlich wie RAF3, die inaktiven Kinasen SnRK2.7 und SnRK2.8 aktivieren, welche dann durch den ABA-Signalweg regulierbar waren.

Die beiden RAFs unterschieden sich in ihren Effekten auf die verschiedenen Untergruppen der SnRK2s. Wohingegen mit dem der Untergruppe I zugehörigen SnRK2.1 kein Unterschied zur Koexpression mit RAF3 festgestellt werden konnte, führte RAF24 dazu, dass SnRK2.4 nicht mehr durch ABA bzw. den Rezeptorkomplex regulierbar war. Dieser Effekt war ebenfalls für die durch RAF3 aktivierten SnRK2s der Untergruppe III, SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6 feststellbar. RAF24 zeigte hingegen

mit SnRK2.6 eine gesteigerte Sensitivität und Abhängigkeit gegenüber ABA, und damit eine dementsprechend höhere Reporterinduktion. Während beide RAFs SnRK2.7 und SnRK2.8 aktivierten, blieben diese weiterhin durch ABA regulierbar, außer für das durch RAF3 aktivierte SnRK2.8, welches keinen Einfluss der ABA-Signalantwort mehr zeigte.

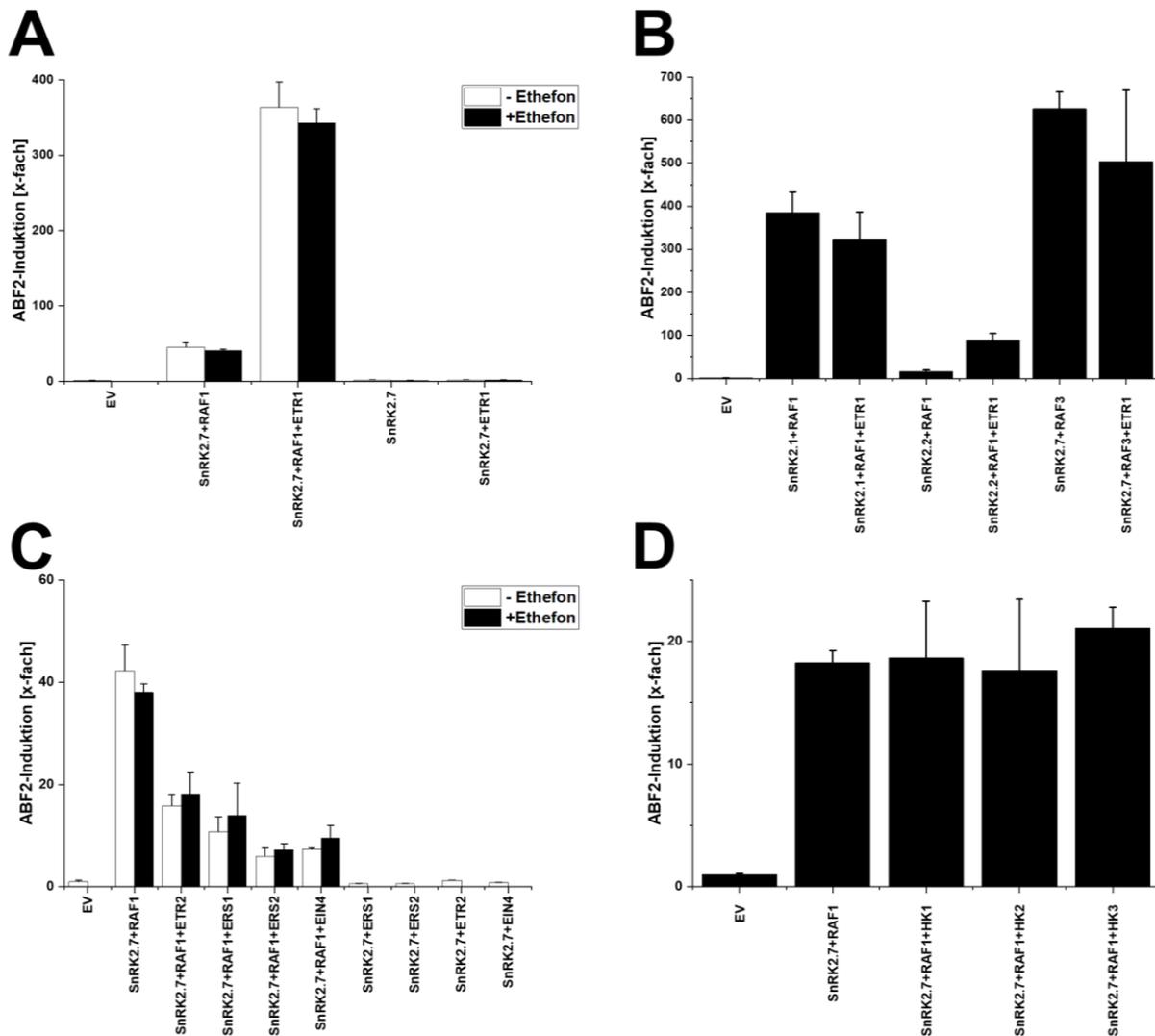
## 2.2 Charakterisierung der Interaktion von ABA- und Ethylen-Signalweg

Durch die Analysen von CTR1 (RAF1) im Moos *Physcomitrella*, in Kombination mit *ethylene-receptor-related sensor histidine kinases* (ETR-HKs), welche *in planta* miteinander interagieren, sollten im Folgenden die Ethylen-Rezeptoren um ETR1 aus *Arabidopsis* in Kombination mit verschiedenen SnRK2s, RAFs, und HKs (Histidinkinasen), sowie mit Zugabe von Ethefon auf einen möglichen Effekt der jeweiligen Komponenten sowie auf einen möglichen *crosstalk* der beiden Signalwege in Hefe untersucht werden.

Zunächst wurde das System durch die bereits bekannte Interaktion von RAF1 und SnRK2.7 um 45-fach durch die Aktivierung von SnRK2.7 durch RAF1 induziert. Durch zusätzliche ETR1-Koexpression wurde die Reporterinduktion nochmal um etwa 8-fach auf eine 360-fache Induktion gesteigert. Zusätzliche Exposition von 100  $\mu$ M Ethefon zeigte keinen Einfluss auf die beschriebenen Ergebnisse. Die Expression von SnRK2.7 alleine und in Kombination mit ETR1 war nicht in der Lage den Reporter zu induzieren (Abb.2-18A). Eine Aktivierung von RAF1 durch ETR1, welches daraufhin in der Lage ist, SnRK2.7 stärker zu aktivieren, deutet auf einen *crosstalk* des ABA- und Ethylen-Signalwegs in *Arabidopsis* hin, wobei der Rezeptor hier in Hefe nicht durch Ethefon regulierbar schien.

Um eine Spezifität von ETR1 auf bestimmte SnRK2s oder RAFs zu identifizieren, wurden diese Komponenten als nächstes variiert und analysiert. Das bereits aktive SnRK2.1 zeigte in Kombination mit RAF1 und ETR1 keinen signifikanten Einfluss auf das System, was ebenfalls für die Kombination aus RAF und SnRK2.7 beobachtet werden konnte. Für SnRK2.2, was durch RAF1-Koexpression den Reporter bereits um 15-fach induziert, konnte durch ETR1 nochmal über 5-fach auf 90-fach gesteigert werden (Abb. 2-18B). Eine Spezifität von ETR1 auf RAF1, sowie dessen weitere spezifische Aktivierung von SnRK2.2 und SnRK2.7 wurde hier gezeigt. Weitere

induktorische Effekte von durch ETR1 aktiviertem RAF1 auf andere, hier nicht getestete SnRK2s, scheinen wahrscheinlich.



**Abbildung 2-18** Effekt von RAFs, ETRs und Etheffon auf SnRK2s.

ABF2, bzw. RAFs und ETR-HKs wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor in BMA64-1A Reporterhefen exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. Durch RAF1 aktiviertes SnRK2.7 wurde durch zusätzliche ETR1-Expression stärker stimuliert (A), was nicht durch Zugabe von 100  $\mu$ M Etheffon (volle Balken) beeinflusst wurde. (B) Durch RAF1 aktiviertes SnRK2.2 zeigte, im Gegensatz zu SnRK2.1, in Kombination mit ETR1 einen positiven Effekt. Durch RAF3 aktiviertes SnRK2.7 kam es mit ETR1 zu keiner Veränderung der LUC-Aktivität. (C) Einfluss der Expression der ETR-Familie auf durch RAF1 aktiviertes SnRK2.7 ohne (leere Balken) oder mit (volle Balken) Etheffon. (D) Kein Einfluss der zusätzlichen Expression von HKs auf durch RAF1 aktiviertes SnRK2.7. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

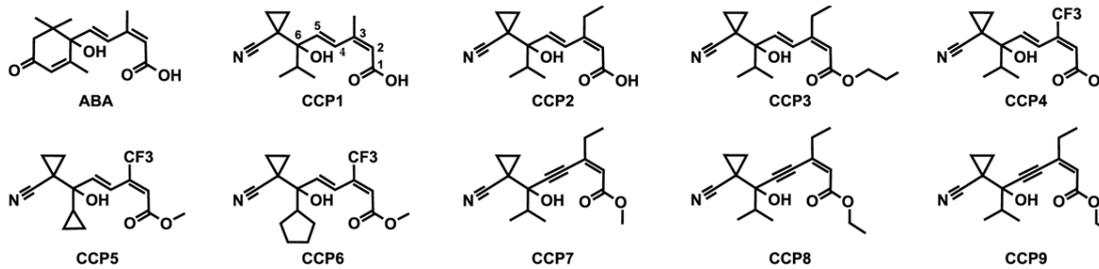
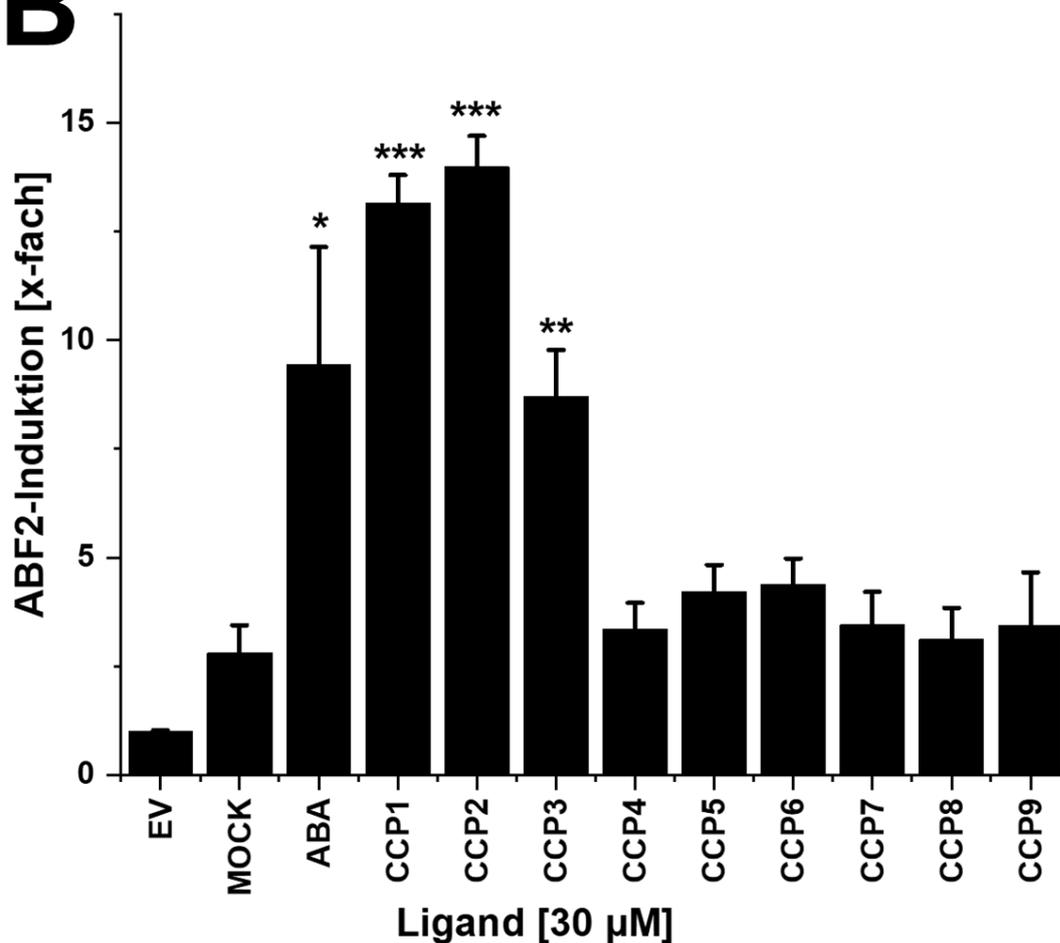
Weiterhin wurden die anderen vier Ethylen-Rezeptoren aus *Arabidopsis* (Bleecker et al. 1998) auf ihren Effekt auf RAF1 getestet. Interessanterweise kam es durch die Koexpression von ETR2, ERS1, ERS2 und EIN4 zu einer deutlich reduzierten Reporterinduktion als durch SnRK2.7 und RAF1 von über 60% mit ETR2 bis hin zu über 80% mit ERS2, wobei die Exposition von 100  $\mu$ M Ethefon auch hier keinen Effekt hatte (Abb. 2-18C). Eine allgemein inhibierende Wirkung der anderen Mitglieder der Ethylen-Rezeptorfamilie scheint hier vorzuliegen.

Durch den Aufbau der Ethylen-Rezeptoren aus Rezeptor und nachgeschalteter Histidinkinase, welche im Folgenden die Zielproteine reguliert, sollte als nächstes ein Einfluss der allgemeinen und unspezifischen Histidinkinasen aus *Arabidopsis* untersucht werden, ob durch diese ebenfalls eine Aktivierung von RAF1 und damit von SnRK2s möglich ist. Dazu wurde RAF1 mit SnRK2.7 koexprimiert, was zu einer knapp 20-fachen Induktion des Reporters führte. Durch die zusätzliche Expression der Histidinkinasen 1-3 aus *Arabidopsis* konnte kein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 2-18D).

Eine spezifische Aktivierung von SnRK2.2 und SnRK2.7 durch RAF1, welche durch die ETR1-Koexpression weiter gesteigert werden konnte, zeigt eine direkte Verbindung des ABA- und Ethylen-Signalwegs. Die Expression in Kombination mit den anderen Ethylen-Rezeptoren führte hier in Hefe jedoch zu einer Inhibierung des Signalwegs.

### **2.3 Analyse verschiedener ABA-Analoga auf ABA-Antwort und die ABA-Signaltransduktion**

In einer Kooperation mit der Bayer AG (*division crop science*) wurden in diesem Projekt ABA-ähnliche *cyano cyclopropyl compounds* (CCPs) (Frackenhohl et al. 2018) auf deren regulatorische Eigenschaften im ABA-Signalweg und einen möglichen stärkeren Effekt als ABA selbst getestet. Hierfür wurde das synthetische Luciferasesystem in Hefe verwendet. Die synthetisierten CCPs sind strukturell sehr ähnlich zu ABA, wobei der Cyclohexanonring durch eine Cyanocyclopropylgruppe ersetzt wird, wodurch die C8' und C9' Dimethylgruppen, sowie die Carbonylgruppe von ABA imitiert werden (Abb. 2-19A) (Roeder et al. 2023).

**A****B**

**Abbildung 2-19 Induktion des ABA-Signalwegs durch verschiedene Liganden in Hefe.**

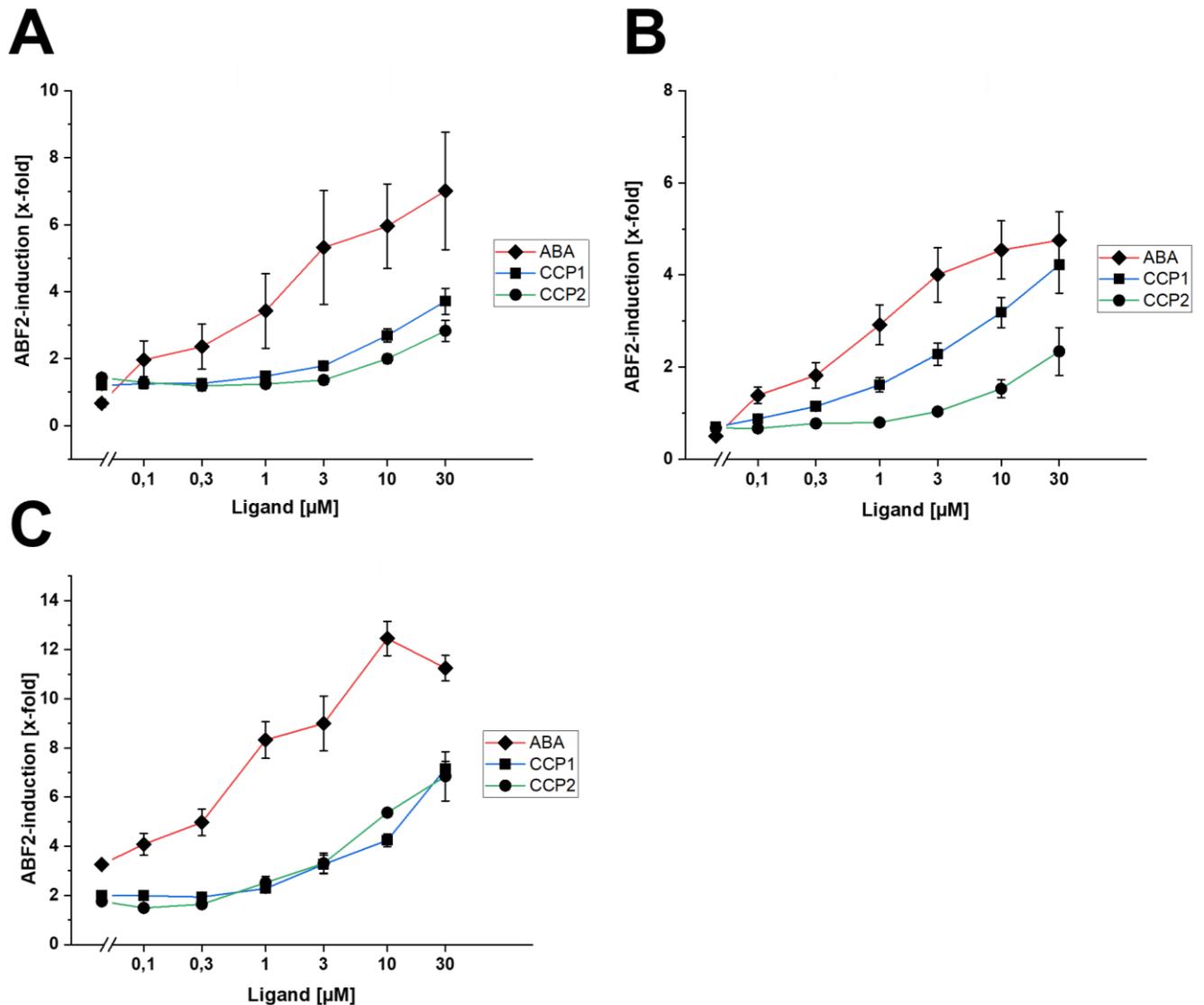
(A) Chemische Struktur von ABA und CCPs. Abbildung bereitgestellt von Dr. Yang. (B) Induktion des Luciferasereporters durch ABA und CCPs. ABF2, SnRK2.6, ABI2 und RCAR11 exprimierende BMA64-1A Reporterhefen wurden mit 30 µM Ligand für 18 h bei 30 °C inkubiert. ABF2, bzw. ABI2 und RCAR11 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren (EV) wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zu Zellen ohne Ligand (MOCK). Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

Durch die Expression der ABA-Signalkaskade aus ABF2, SnRK2.6, ABI2 und RCAR11 kam es mit zusätzlich 30  $\mu\text{M}$  ABA zu einer signifikanten Induktion des Reporters um etwa 10-fach. Für CCP1s und CCP2 wird der Reporter sogar stärker als ABA mit 13- bzw. 14-fach induziert. CCP3 kann den Reporter in einem ähnlichen Verhältnis wie ABA um etwa 9-fach induzieren. Für die anderen getesteten CCPs konnte keine signifikante Induktion des Reporters festgestellt werden (Abb. 2-19B).

Die Effektivität und Spezifität der im vorigen Experiment als aktiv gezeigten Liganden CCP1 und CCP2 wurde im Folgenden durch deren Titration mit verschiedenen Rezeptorkomplexen, sowie zusätzlich exprimiertem ABF2, SnRK2.6 und ABI2 analysiert.

CCP1 aktivierte mit RCAR11 durch gesteigerte Ligandenkonzentrationen die ABA-Signalkaskade in Hefe, in ähnlichem Verhältnis wie ABA, wobei CCP1 grundsätzlich effektiver schien als CCP2. Für RCAR1 und RCAR8 war die Effektivität der Liganden deutlich niedriger als ABA. Die benötigte Konzentration an CCP1 und CCP2 war in Kombination mit RCAR1 über 30-fach höher als für 1  $\mu\text{M}$  ABA. Für RCAR8 konnte sowohl mit ABA als auch mit CCP1 eine vergleichbare Induktion des Reportersystems von etwa 4-fach erreicht werden. Mit RCAR11 konnte für 10  $\mu\text{M}$  ABA die höchste Reporterinduktion von über 12-fach erreicht werden, was für die gleiche Konzentration an CCPs nur zu einer 5- bzw. 4-fachen Induktion führte (Abb. 2-20).

Die getesteten CCPs konnten in Hefe mit verschiedenen Rezeptorkomplexen interagieren und somit die ABA-Antwort auslösen, wenn auch mit meist geringerer Effizienz als ABA selbst.



**Abbildung 2-20 Rezeptorkomplex-abhängige Aktivierung des ABA-Signalwegs durch Titration von ABA und CCPs in Hefe.**

ABF2, SnRK2.6, ABI2 und RCAR1 (A), RCAR8 (B) oder RCAR11 (C) exprimierende BMA64-1A Reporterhefen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an ABA (Raute), CCP1 (Viereck) oder CCP2 (Kreis) für 18 h bei 30 °C inkubiert. ABF2 bzw. ABI2 und RCARs wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert, während die SnRK2-Kinasen unter der Kontrolle des Galactose induzierbaren GAL1-Promotors standen. LUC-Aktivität von Hefen, die nur den Reporter exprimieren, wurde auf 1 gesetzt und die Aktivität auf die Zelldichte normalisiert. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=3 Replikaten.

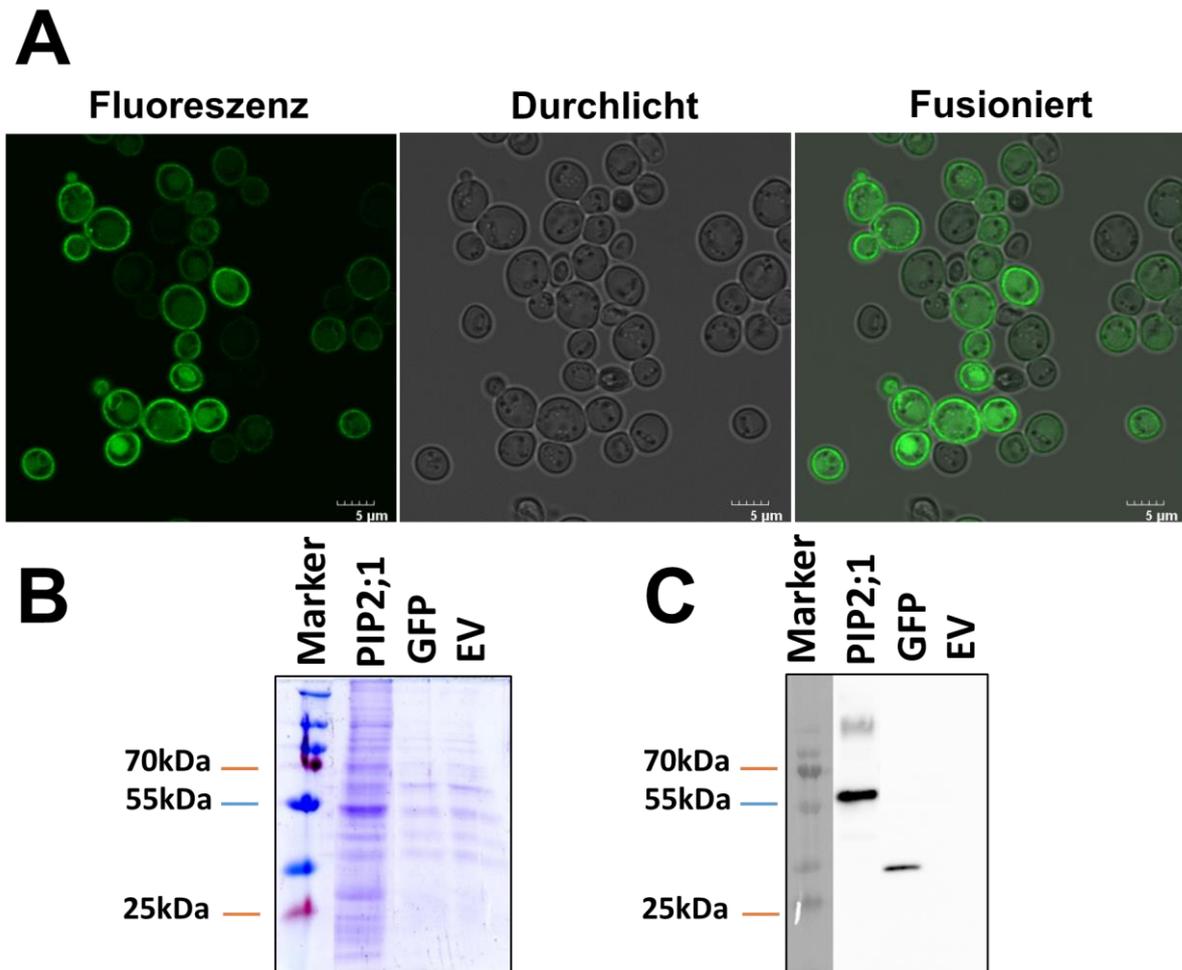
## 2.4 Analyse pflanzlicher Aquaporine in Hefe

### 2.4.1 Lokalisations- und Expressionsanalyse von PIP2;1 in Hefe

Um eine Analyse der molekularen Eigenschaften von pflanzlichen Aquaporinen in Hefe durchführen zu können, ist es von entscheidender Bedeutung, dass die Proteine in Hefe korrekt exprimiert und lokalisiert sind. Um die korrekte Lokalisation und Expression pflanzlicher Aquaporine in der Plasmamembran von Hefezellen zu verifizieren, wurde die codierende Sequenz von PIP2;1 mit einem N-terminalen meGFP-tag unter dem konstitutiv aktiven Hefepromotor TDH3 in Wildtyphefen des Stamms BMA64-1A transformiert und unter dem Mikroskop auf GFP-Expression analysiert (Abb. 2-21A). Die GFP-Expression des Fusionsproteins konnte im Großteil der Hefezellen hauptsächlich in der Plasmamembran der Hefezellen detektiert werden. Schwächere Expressionssignale sind vermutlich als Abbauprodukte in der Vakuole sichtbar.

Die Expression des Fusionsproteins wurde zusätzlich mittels SDS-PAGE und anschließendem Westernblot bestätigt. Abb. 2-21B zeigt den Aufschluss und eine Reihe von Signalen verschiedener Hefeproteine nach der Anreicherung der Membranfraktion von GFP-PIP2;1 und folgender GFP-trap. Als Kontrollen aufgetragen wurden aufgeschlossene Hefezellen, die einen Leervektor exprimieren (EV) oder das nicht fusionierte GFP. Eine dem GFP-PIP2;1 Fusionsprotein entsprechende Bande bei 56 kDa, sowie die dem freien GFP entsprechende Bande bei etwa 27 kDa konnten im anschließenden Westernblot mittels GFP-Antikörpern detektiert werden, wobei für den Leervektor kein Signal im Westernblot zu sehen war (Abb. 2-21C). Hierdurch konnte die korrekte Expression und Lokalisation von PIP2;1, welches für die folgenden Analysen als prototypisches Aquaporin verwendet wird, in Hefe bestätigt werden.





**Abbildung 2-21: Lokalisation und Expression von PIP2;1 in Hefe.**

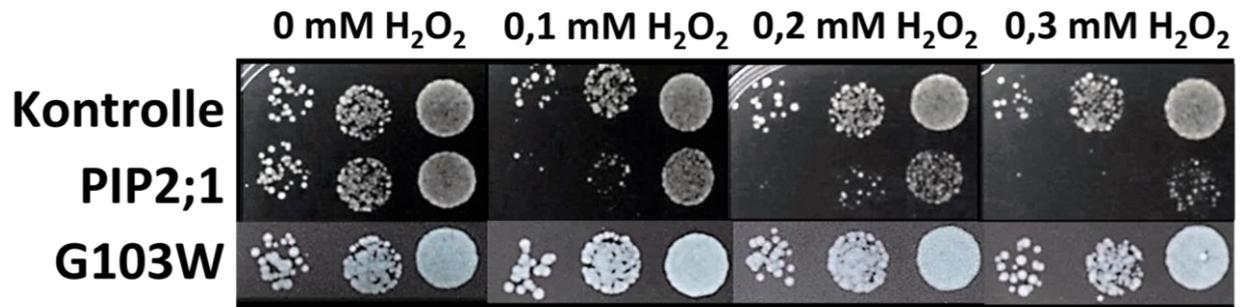
PIP2;1 wurde als GFP-PIP2;1 Konstrukt in BMA64-1A Hefen transformiert und unter dem konstitutiv aktiven TDH3-Promotor exprimiert. Die geernteten Hefen wurden für die Detektion des Fluoreszenzsignals in der Plasmamembran mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie (A) sowie für die Detektion der Fusionsproteine mittels anti-GFP Antikörpern für SDS-PAGE (B) und Westernblot (C) benutzt. Eine dem GFP-PIP2;1 entsprechende Bande wurde bei ca. 56 kDa detektiert. Als Kontrollen wurden das nicht fusionierte GFP (~27 kDa), sowie ein Leervektor (EV) verwendet.

#### 2.4.2 Charakterisierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeiten verschiedener pflanzlicher Aquaporine in Hefe

Aquaporine sind membranständige Proteine, die Wasser über biologische Membranen hinweg transportieren können. Zu den später entdeckten zusätzlichen Substraten gehört unter anderem Wasserstoffperoxid, welches aufgrund seiner molekularen Eigenschaften sehr ähnlich zu Wasser ist, weshalb davon ausgegangen wird, dass alle Aquaporine, die Wasser transportieren, ebenfalls für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permeabel sind.

(Almasalmeh et al. 2014). Durch die Lokalisation des Proteins in der Hefemembran kann der im Folgenden angewandte Assay sich die Ähnlichkeiten der beiden Moleküle sowie die Toxizität und die damit verbundene Inhibierung des Hefewachstums durch  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu Nutze machen. Hierfür werden transformierte Hefezellen, die sich in der logarithmischen Wachstumsphase befinden und die entweder einen Leervektor als Kontrolle oder ein Aquaporin exprimieren auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 eingestellt. Die Zellen werden anschließend dreimal seriell 1:10 verdünnt und auf Platten mit unterschiedlichen Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  pipettiert. Durch die Expression des Kanalproteins kommt es zu einer erhöhten Aufnahme von  $\text{H}_2\text{O}_2$  in die Zelle, was zu einer stärkeren Inhibierung des Wachstums als durch passive Diffusion über die Membran führt, wodurch die Zellen langsamer wachsen als einen Leervektor (Kontrolle) exprimierende Zellen. Die Dokumentation des Hefewachstums erfolgte nach 2-tägiger Inkubation bei 30 °C. Alle Wachstumsassays wurden mit drei biologischen Replikaten sowie auf einer Kontrollplatte ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$ , um eine eventuelle Inhibierung des Wachstums durch die alleinige Proteinexpression auszuschließen, durchgeführt. Aus Platz- und darstellerischen Gründen werden nicht für alle Experimente jeweils die drei Replikate und die Kontrollplatte gezeigt, wobei diese dann dem zu erwartenden Ergebnis entsprechen würden.

Sowohl die Kontrollen, die entweder einen Leervektor oder die inaktive PIP2;1-Mutante G103W (Wang et al. 2016), als auch Hefen, die das Aquaporin PIP2;1 aus Arabidopsis exprimieren, zeigten auf der Kontrollplatte ohne  $\text{H}_2\text{O}_2$  ein normales Wachstum, wobei selbst bei steigender  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration keine Einschränkung des Wachstums bei den Kontrollhefen festgestellt werden konnte. Andererseits zeigten PIP2;1 exprimierende Hefen ein reduziertes Wachstum bei 0,1 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$ , welches mit erhöhter  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration weiter abnimmt (Abb. 2-22).

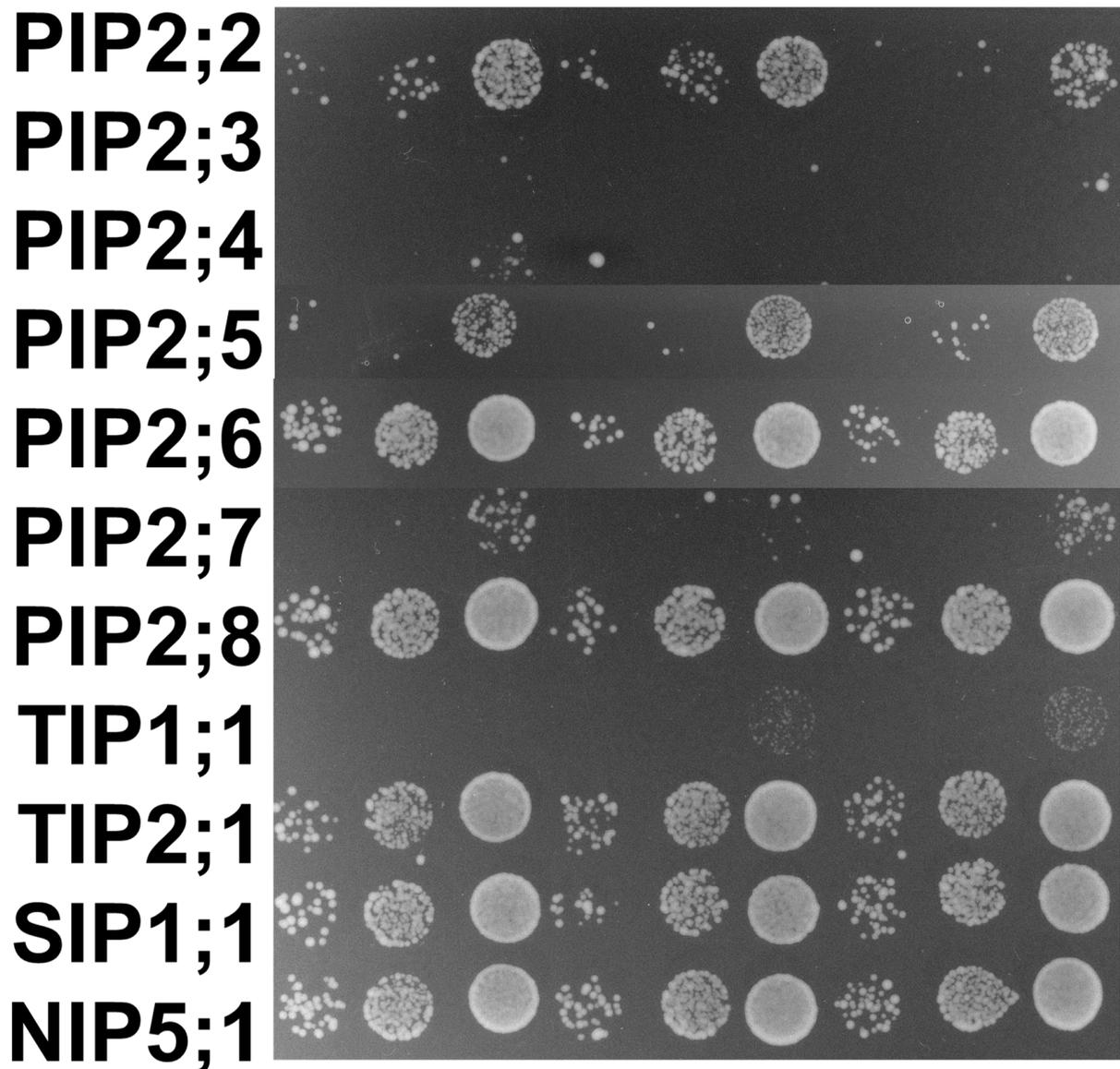


**Abbildung 2-22 Hefewachstumsassay auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$ .**

Die Expression eines funktionalen PIP2;1 führt zu vermindertem Wachstum auf Platten mit  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (Kontrolle), AtPIP2;1 oder der Mutante AtPIP2;1G103W transformiert und die Konstrukte unter dem konstitutiv aktiven ADH-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit verschiedenen Konzentrationen an  $\text{H}_2\text{O}_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

Die nachfolgenden Hefewachstumsassays wurden, sofern nicht anders erwähnt, bei einer Konzentration von 0,2 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  dargestellt. Dieser Wert wurde gewählt, um einen deutlichen wachstumsinhibierenden Effekt der Aquaporinexpression zu sehen, als auch die Möglichkeit einer weiteren Steigerung dieses Effekts, durch die zusätzliche Expression anderer Proteine zu erhalten.

Durch das hier gezeigte, verminderte Hefewachstum durch die Expression von PIP2;1 wurde als nächstes die PIP2-Familie getestet sowie verschiedene Vertreter der anderen Aquaporin-Untergruppen (Abb. 2-23).



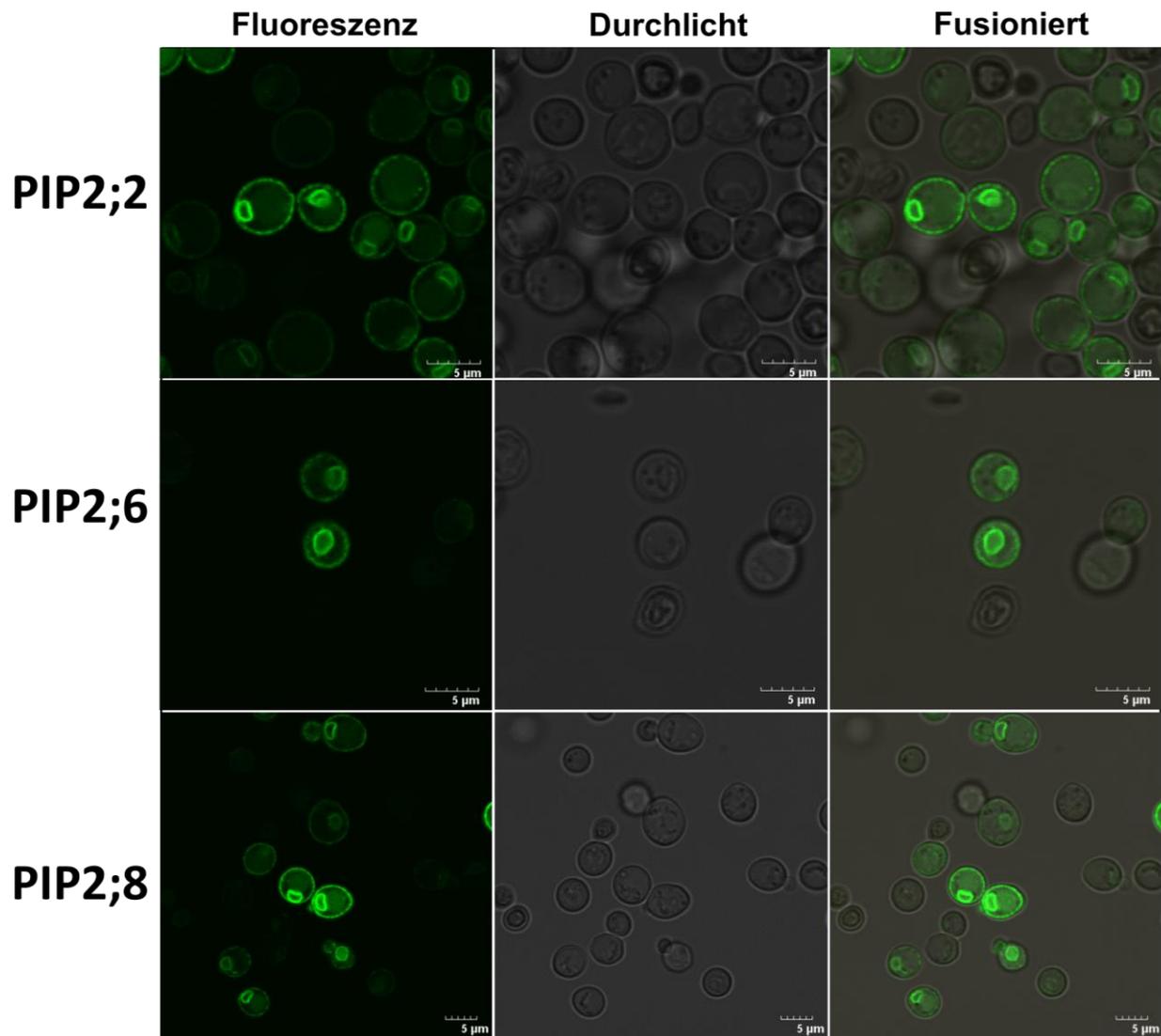
**Abbildung 2-23: Hefewachstumsassay verschiedener Aquaporine.**

Die Expression verschiedener Aquaporine führt zu vermindertem Wachstum auf Platten mit  $H_2O_2$ . Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit verschiedenen Aquaporinen aus Arabidopsis transformiert und die Konstrukte unter dem konstitutiv aktiven ADH-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

Für die anderen Vertreter der PIP2-Familie konnte bis auf PIP2;6 und PIP2;8 ein vermindertes Wachstum auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> festgestellt werden. PIP2;2 und PIP2;5 zeigten ein ähnliches Wachstumsverhalten wie mit PIP2;1 transformierte Hefen aus vergleichbaren Experimenten. PIP2;7 zeigte eine höhere Leitfähigkeit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welche nur von PIP2;3, PIP2;4 und TIP1;1 noch übertroffen wird, wo gar kein Hefewachstum mehr feststellbar war. Hefen, die TIP2;1, SIP1;1 und NIP5;1 exprimierten, zeigten kein vermindertes Wachstum, welches vergleichbar mit Hefen war, die nur den Leervektor exprimierten.

Um zu überprüfen, ob die nicht vorhandenen Transporteigenschaften von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für PIP2;6 und PIP2;8 an einer falschen Lokalisation der Proteine innerhalb der Hefezelle liegen, wurden N-terminale Fusionsproteine, wie zuvor beschrieben, in Hefe transformiert und deren GFP-Expression am Mikroskop detektiert.

Die Fluoreszenzsignale der Fusionsproteine wurden für GFP-PIP2;2, GFP-PIP2;6 und GFP-PIP2;8, alle vergleichbar mit vorheriger GFP-PIP2;1-Expression in der Plasmamembran, sowie zusätzlich in stärkerer Intensität in einer kreisförmigen Struktur um den Nucleus, detektiert (Abb. 2-24).



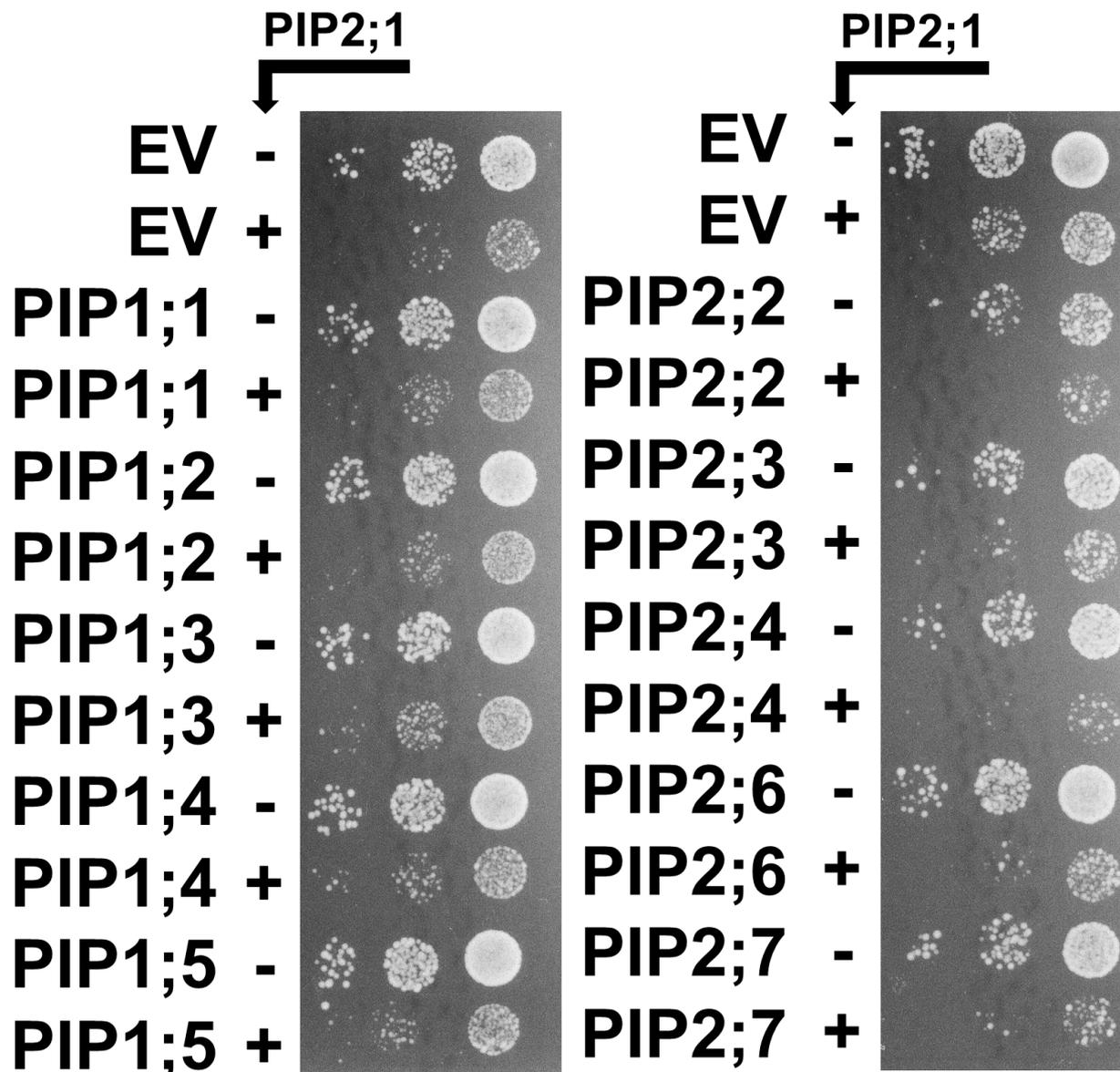
**Abbildung 2-24 Lokalisation verschiedener PIP2s in Hefe.**

PIP2s wurden als GFP-PIP2-Konstrukte in BMA64-1A Hefen transformiert und unter dem konstitutiv aktiven TDH3-Promotor exprimiert. Die Detektion des Fluoreszenzsignals in der Plasmamembran und einer ringförmigen Struktur um den Nucleus erfolgte mittels konfokaler Laserscanningmikroskopie.

### 2.4.3 Heteromerisierungsanalyse von PIP2;1

Aquaporine liegen in der Membran als Tetramere vor. Neben Homotetrameren können auch Heterotetramere verschiedener Isoformen gebildet werden (Murozuka et al. 2013). Um einen positiven Einfluss der Heteromerisierung verschiedener PIP1s und PIP2s mit PIP2;1 zu überprüfen, wurden diese Aquaporine mit PIP2;1 koexprimiert und analysiert.

Die PIP2;1-Expression zeigte ein zu erwartendes vermindertes Wachstum auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. PIP1s zeigten ohne PIP2;1-Koexpression kein eingeschränktes und ein mit dem Leervektor (EV) vergleichbares Wachstum. Durch die Koexpression von PIP2;1 kam es zu einem vergleichbar reduzierten Wachstum, wie bei alleiniger PIP2;1-Expression. Es scheint also keine gesteigerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aufnahme durch die Expression der beiden Proteine stattzufinden, wobei die Koexpression auch keine Heteromerisierung erzwingt. Für die Koexpression von PIP2s mit PIP2;1 konnte ebenfalls ein weiter vermindertes Wachstum als mit der jeweiligen alleinigen Expression der Aquaporine detektiert werden. Ob dies ein additiver Effekt zweier exprimierter Aquaporine oder durch eine mögliche Heteromerisierung der Proteine in der Hefezelle bedingt ist, kann hier nicht festgestellt werden (Abb.2-25).



**Abbildung 2-25 Einfluss der Koexpression von PIP2;1 auf verschiedene PIP exprimierende Hefen.**

PIP1s zeigten mit PIP2;1 Koexpression kein stärker vermindertes Wachstum als PIP2;1 alleine. Durch die Koexpression von PIP2;1 kommt es für die getesteten PIP2s zu einem weiter verminderten Hefewachstum. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder mit verschiedenen PIPs in Kombination mit (+) oder ohne (-) PIP2;1 transformiert und die Konstrukte unter dem konstitutiv aktiven pADH-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

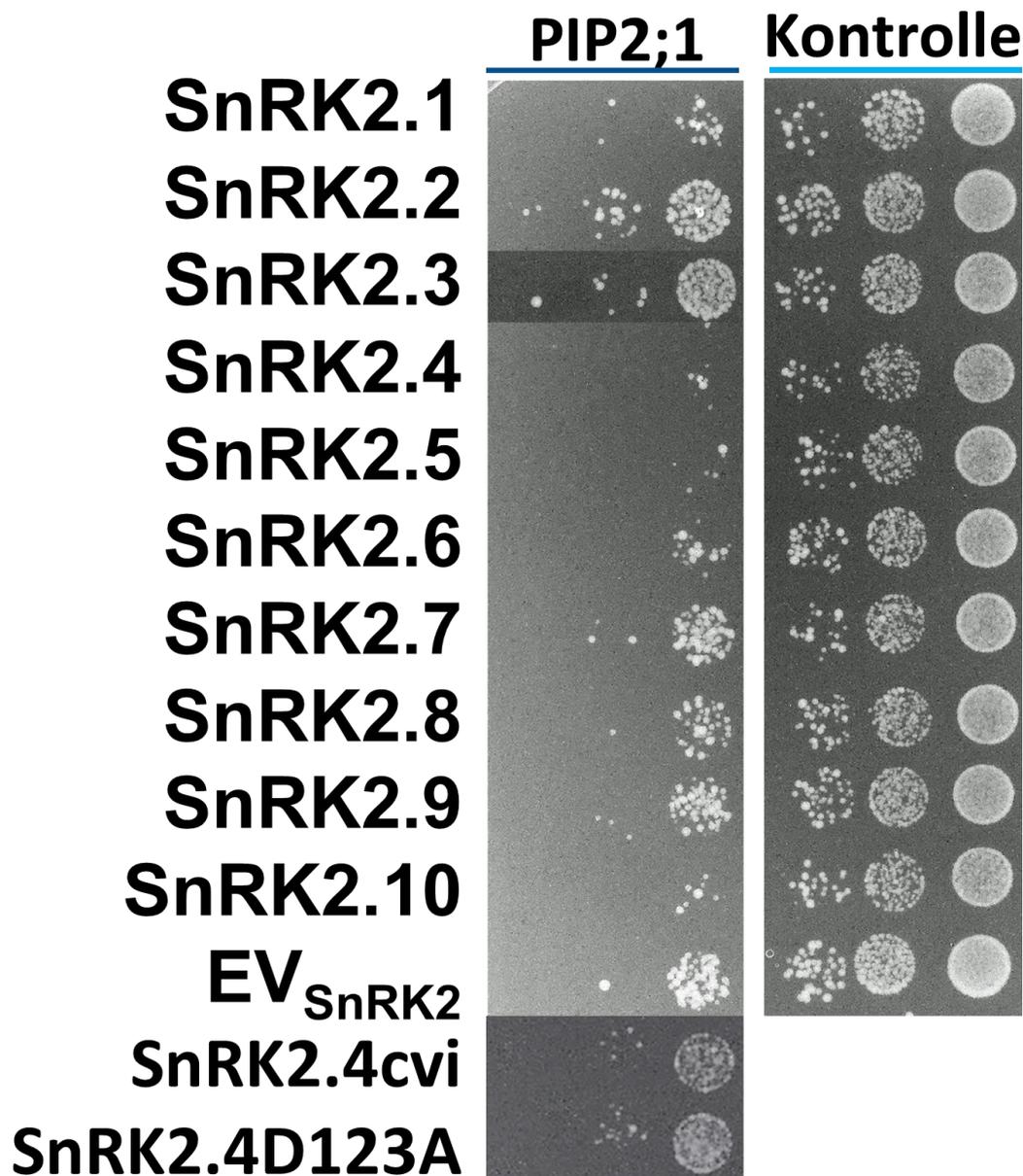


## 2.5 Analyse von Aquaporinen im ABA-Signalweg

### 2.5.1 Steigerung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von Aquaporinen durch SnRK2s

Grondin et al zeigten 2015 die Phosphorylierung des B-loops eines PIP2;1 Peptids aus Arabidopsis durch SnRK2.6 *in vitro* (Grondin et al. 2015). Um eine Aktivierung bzw. eine Öffnung des Kanals *in vivo* zu untersuchen, wurden alle Proteine der SnRK2 Familie auf einen Effekt auf PIP2;1 hin in Hefe untersucht.

Die PIP2;1-Expression ohne SnRK2-Kinase (EV<sub>SnRK2</sub>) führte, wie bereits in vorausgegangen Experimenten gezeigt, zu einem verminderten Hefewachstum auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die zusätzliche Expression der SnRK2-Kinasen SnRK2.4 und SnRK2.5 führte zu einer weiteren Reduktion des Hefewachstums, was auf eine Öffnung des Aquaporins und damit eine erhöhte Aufnahme des für Hefen toxischen Moleküls H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> schließen lässt. Für SnRK2.1, SnRK2.6 und SnRK2.10 konnte ebenfalls ein weiter vermindertes Hefewachstum festgestellt werden, wenn auch mit etwas schwächeren Effekten als mit SnRK2.4 und SnRK2.5. SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.7, SnRK2.8 und SnRK2.9 zeigten ein verglichen mit PIP2;1 alleine exprimierenden Hefen ähnliches Wachstum, was auf keinen Einfluss dieser Kinasen auf PIP2;1 hindeutet. Als Kontrollen für den SnRK-Einfluss auf das Aquaporin wurden zwei inaktive Varianten von SnRK2.4 verwendet. SnRK2.4cvi, welches eine Allel von Arabidopsis Cvi-0 darstellt, hat, verglichen mit Col-0, eine Deletion einer Aminosäure, die zu einem *frameshift* und einem vorzeitigen Stopcodon führt (Shahzad et al. 2023). Als zusätzliche Kontrolle wurde die D123A Mutante von SnRK2.4 verwendet, deren Mutation in der Aktivierungsschleife der Kinasedomäne des Proteins zur Inaktivität der Kinase führt. Folglich konnten im Assay keine Auswirkungen der beiden Kinasevarianten auf das Wachstumsverhalten im Vergleich zu PIP2;1 festgestellt werden. Weiterhin wurde getestet ob die Expression der SnRK2-Kinasen bereits ohne zusätzlich exprimiertes PIP2;1 einen Einfluss auf das Wachstum hat. Dies wurde in der Spalte „Kontrolle“ dargestellt. Verglichen mit Leervektor exprimierenden Hefen, zeigten die SnRK2-Expimierer ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten und damit keine Inhibierung des Hefewachstums, was darauf schließen lässt, dass die SnRK2-Expression nur in Verbindung mit einem Aquaporin einen Einfluss auf das Hefewachstum zeigt (Abb. 2-26).

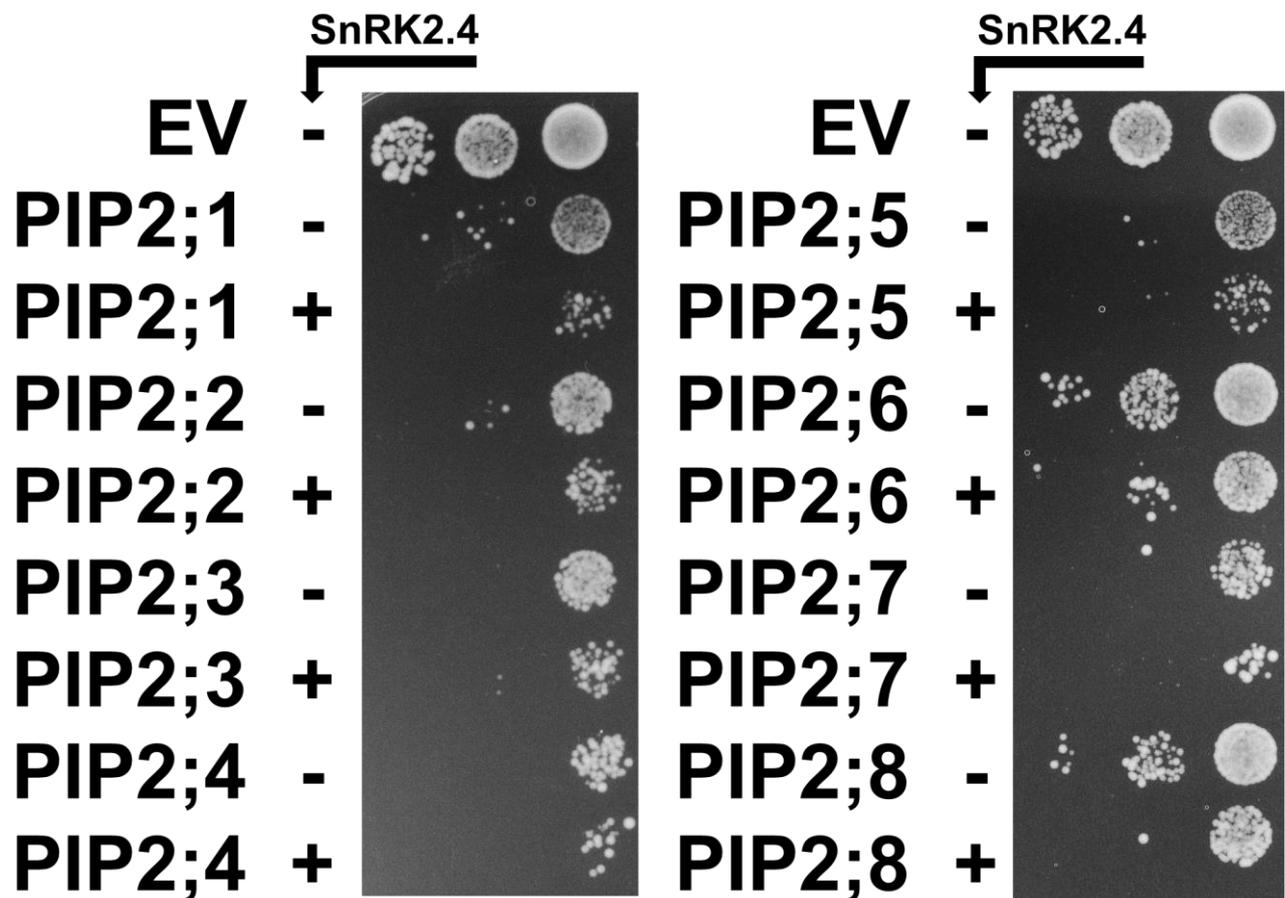


**Abbildung 2-26 Einfluss verschiedener SnRK2-Kinasen auf PIP2;1.**

Die PIP2;1 Aktivität wird durch die Expression mancher SnRK2s reguliert. Ein bereits AtPIP2;1 exprimierender Hefestamm oder der Hefestamm BMA64-1A (Kontrolle) wurden mit einem Leervektor ( $EV_{SnRK2}$ ), oder verschiedenen SnRK2-Kinasen transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2s wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

Durch die Aktivierung von PIP2;1 durch verschiedene SnRK2s stellte sich die Frage, ob der SnRK2-Effekt spezifisch für dieses Aquaporin ist, weswegen im Folgenden der Effekt von SnRK2.4 und SnRK2.1 auf verschiedene PIPs analysiert wurde. SnRK2.4

wurde aufgrund seines starken Effekts auf PIP2;1 und einer Kooperation mit Prof. Maurel (CNRS, Frankreich) im Rahmen eines DFG-Projekts (*ABAqua*) gewählt.

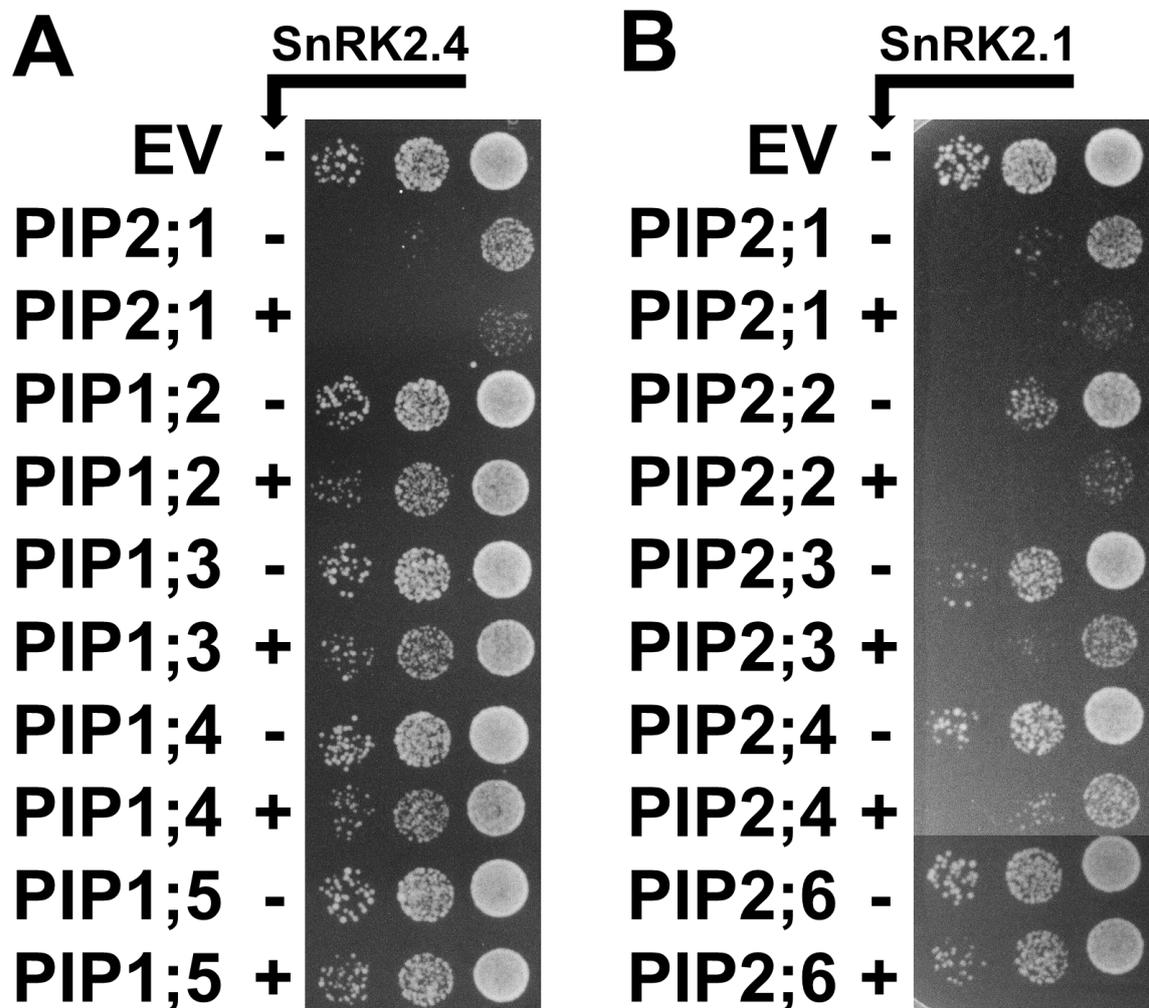


**Abbildung 2-27 Einfluss von SnRK2.4 auf das Hefewachstum von PIP2s.**

Die Aktivität verschiedener PIP2s wird durch die Expression von SnRK2.4 reguliert. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder verschiedenen PIP2s in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 transformiert. PIP2s bzw. SnRK2.4 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

Hefezellen, die verschiedene PIP2s exprimieren, wurden jeweils im direkten Vergleich mit (+) oder ohne (-) zusätzlicher SnRK2.4-Expression analysiert. Leervektor (EV) transformierte Hefezellen zeigten ein ungehindertes Wachstum auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$ . Durch die Expression der verschiedenen PIP2s kam es zu einem verminderten Wachstum der Hefezellen durch Aufnahme von  $H_2O_2$  in die Zelle. Ausnahme bildeten PIP2;6 und PIP2;8, welche ein ähnliches Wachstum zum Leervektor aufwiesen. Die Expression von SnRK2.4 führte bei allen Aquaporinen zu einem weiter verminderten

Wachstum der Hefezellen. Die stärksten Effekte waren hier für PIP2;1 und PIP2;5 sichtbar. Die anderen Aquaporine zeigten eine leichte Verstärkung der Wachstumsinhibierung durch die Koexpression von SnRK2.4 verglichen mit dem alleinigen Aquaporin (Abb. 2-27).



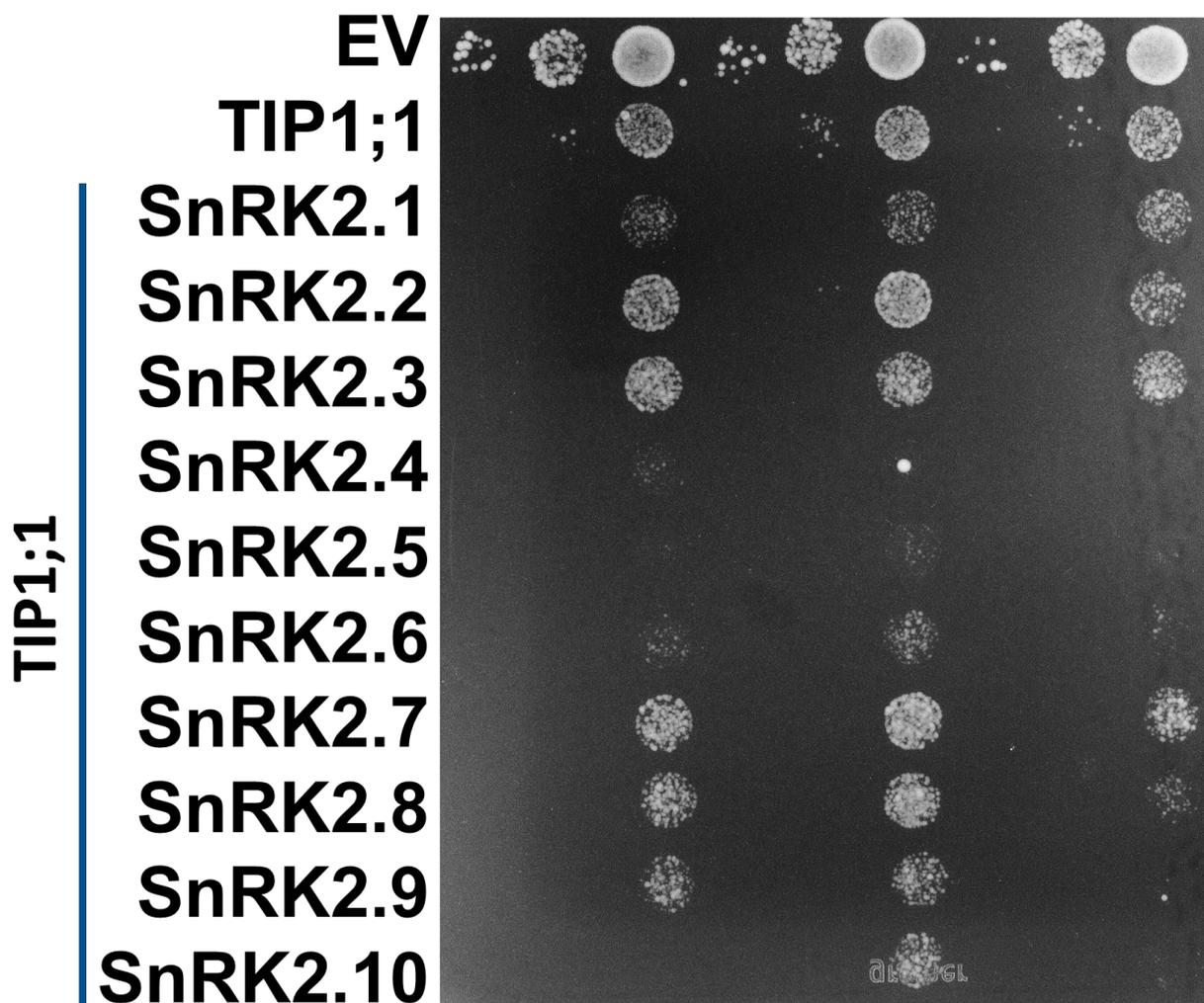
**Abbildung 2-28** Einfluss von SnRK2s auf das Hefewachstum von PIPs.

SnRK2.4-Expression zeigte keinen Einfluss auf die PIP1 Aktivität (A). Die Koexpression von SnRK2.1 reguliert die Aktivität verschiedener PIP2s (B). Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder verschiedenen PIPs in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 (A) bzw. SnRK2.1 (B) transformiert. PIPs bzw. SnRK2s wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

Der Effekt von SnRK2.4 wurde weiterhin auf Aquaporine der PIP1-Familie getestet (Abb. 2-28A). Die getesteten Mitglieder der PIP1-Familie zeigten sowohl ohne (-) als auch mit (+) zusätzlicher SnRK2.4-Expression kein vermindertes und damit ein mit

dem Leervektor (EV) vergleichbares Wachstum. Weiterhin wurde der Effekt einer weiteren SnRK2-Kinase, SnRK2;1, auf verschiedene PIP2s getestet (Abb. 2-28B). Ein weiter vermindertes Hefewachstum, welches ähnlich zu SnRK2.1 in Kombination mit PIP2;1 ist, konnte für PIP2;2, PIP2;3 und PIP2;4 festgestellt werden. Für PIP2;6 war kein Effekt der Koexpression von SnRK2.1 erkennbar.

Durch die in Abb. 2-23 gezeigte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von TIP1;1 wurde dieses eigentlich in der vakuolären Membran des Tonoplasten befindliche Protein auf eine Aktivierung durch SnRK2s getestet.



**Abbildung 2-29 Einfluss von SnRK2s auf das Hefewachstum von TIP1;1.**

TIP1;1 Aktivität wird durch die Koexpression verschiedener SnRK2s reguliert. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder TIP1;1 in Kombination mit verschiedenen SnRK2s transformiert. TIP1;1 bzw. SnRK2s wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

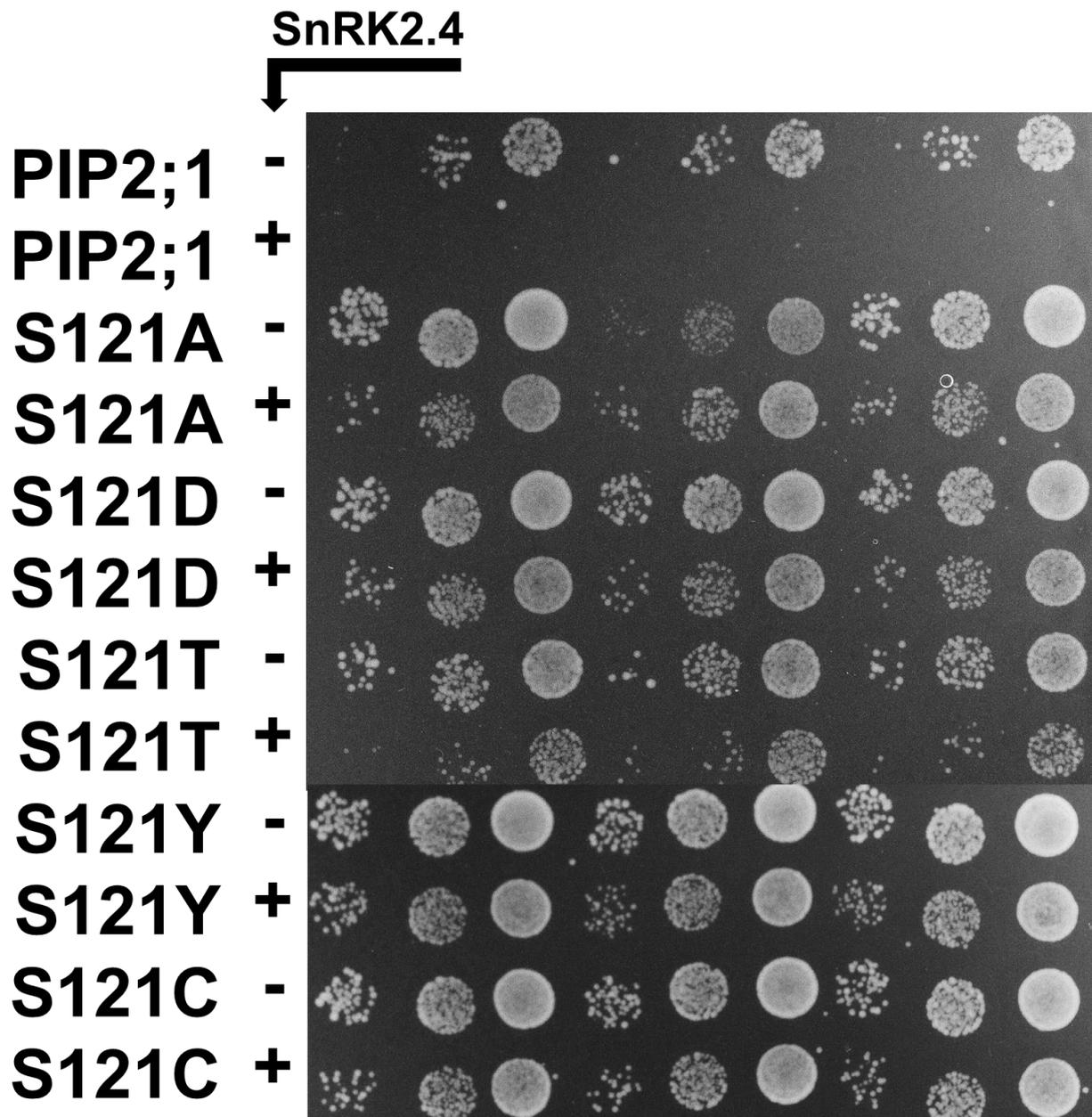
Hefezellen, die nur den Leervektor (EV) exprimieren zeigten ein uneingeschränktes Wachstum auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Die Expression von TIP1;1 führte, wie in Abb. 2-23, zu einer deutlichen Reduktion des Hefewachstums. Die zusätzliche Expression der SnRK2-Kinasen SnRK2.1, SnRK2.4, SnRK2.5, SnRK2.6 und SnRK2.10 führte, bis auf eine Wiederholung von SnRK2.10, zu einer verstärkten Wachstumsinhibierung, verglichen mit TIP1;1, was eine Aktivierung von TIP1;1 durch diese SnRK2s impliziert. Durch das aktivierte Aquaporin gelangt mehr H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in die Hefezelle, was zu einem stark verminderten Wachstum führt. Für die anderen SnRK2s konnte, bis auf eine Wiederholung mit SnRK2.8 und SnRK2.9, kein unterschiedliches Wachstum im Vergleich zu TIP1;1 und damit kein Effekt der Kinasen auf das Aquaporin festgestellt werden (Abb. 2-29).

### **2.5.2 Analyse möglicher Phosphorylierungsstellen von PIP2;1 durch SnRK2.4**

Durch die von Maurel und Kollegen gezeigte *in vitro* Phosphorylierung eines PIP2;1 Peptids an S121 durch SnRK2.6 (Grondin et al. 2015) wurden im Folgenden potenzielle Phosphorylierungsstellen bzw. deren mutierte Versionen von PIP2;1 in den verschiedenen Domänen des Proteins untersucht. Die Mutation der Aminosäuren erfolgte durch gerichtete Mutagenese (*site directed mutagenesis*, SDM) und wurde jeweils durch eine Sequenzanalyse des verwendeten Plasmids verifiziert.

#### **2.5.2.1 Mutantanalyse von Serin 121 im B-loop**

Zunächst wurde das Serin121 im B-loop näher analysiert. Dazu wurden phosphomimetische (S121D) und phosphoablative (S121A) Mutanten des Proteins generiert, um eine Phosphorylierung bzw. eine nicht mehr mögliche Phosphorylierung des Proteins durch SnRK2.4 zu imitieren. Weiterhin wurde das Serin zu einem Threonin mutiert um zu überprüfen ob die Serin/Threonin-Proteinkinase SnRK2.4 hier zwischen den Aminosäuren differenziert. Die anderen beiden Mutationen zu Tyrosin und Cystein, welche strukturell und biochemisch ähnliche Eigenschaften wie Serin aufweisen, sollten ebenfalls auf eine obligatorische Funktion des Serins an dieser Aminosäureposition hin analysiert werden. Eine eventuell weiterhin mögliche Aktivierung der Mutanten wurde durch die Koexpression von SnRK2.4 getestet.



**Abbildung 2-30 Einfluss verschiedener Mutationen von PIP2;1 S121 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.**

S121-Mutanten führen zu einem nicht funktionalem Aquaporin, welches nicht mehr durch SnRK2.4-Koexpression reguliert wird. S121T zeigt eine leicht schwächere Aktivität, verglichen mit dem wildtypischen Aquaporin. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder verschiedenen Mutanten von PIP2;1 S121 in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

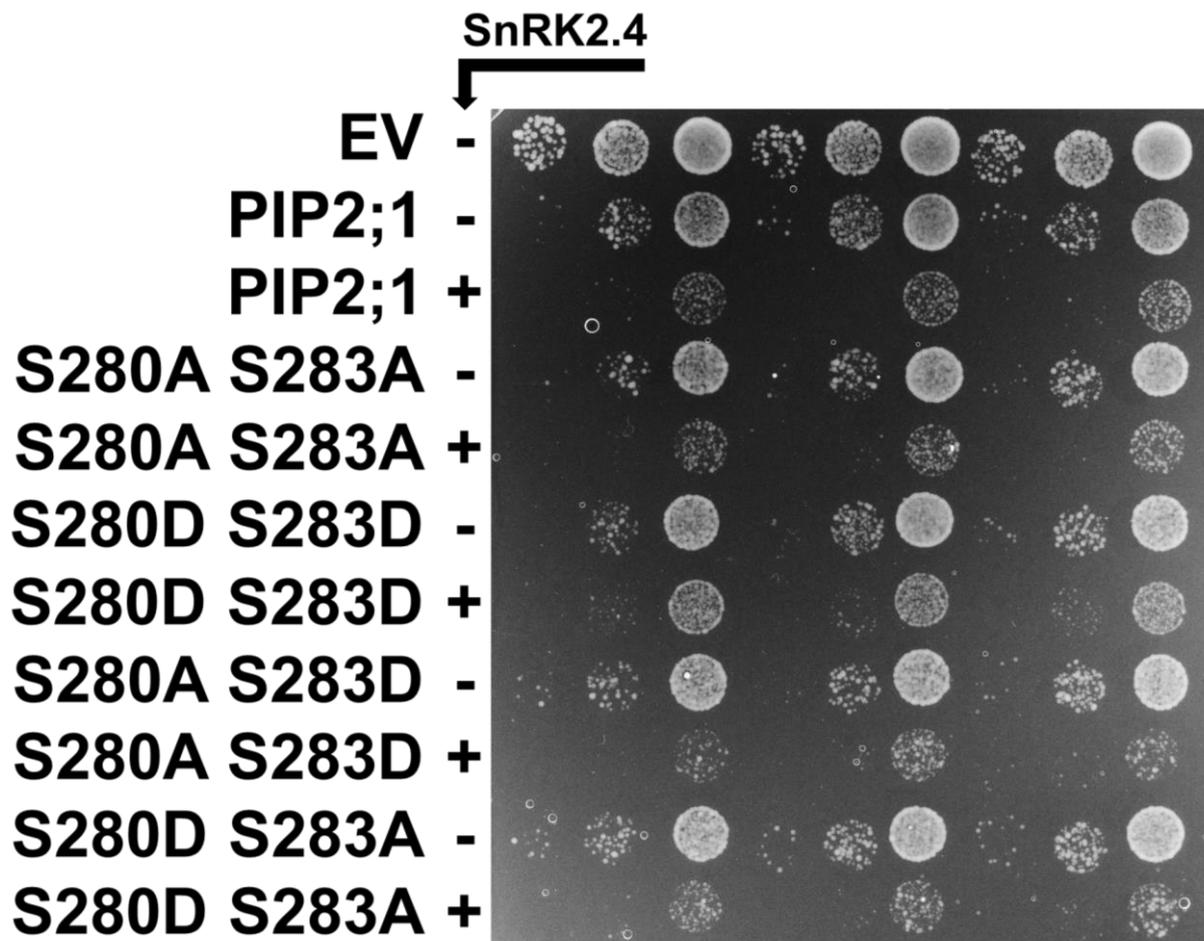
Die mutierten Varianten des Serin 121 von PIP2;1 zeigten alle nicht mehr die Eigenschaft für H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permeabel zu sein, da für alle ein uneingeschränktes Wachstum im Vergleich zum Wildtyp Aquaporin auf 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Platten detektiert wurde. Die Mutanten konnten weiterhin auch nicht durch SnRK2.4-Koexpression aktiviert werden, was auf ein nicht funktionales Protein hindeutet. Einzige Ausnahme bildete die S121T Mutation, welche, verglichen mit dem wildtypischen Aquaporin, zwar eine verminderte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit zeigte, diese jedoch durch SnRK2.4-Koexpression gesteigert werden konnte. Dies hat ein weiter vermindertes Wachstum zur Folge, welches jedoch in Intensität und Stärke nicht mit dem wildtypischen Aquaporin mit SnRK2.4-Koexpression verglichen werden kann (Abb. 2-30). Eine essentielle Funktion eines Serins an Position 121 von PIP2;1 liegt daher nahe, da eine Mutation zu einer anderen Aminosäure zu einem nicht funktionalen Protein führt. Eine Ausnahme bildet die Mutation zu einem Threonin, welches zu keinem inaktiven Kanal führt, welcher auch weiterhin noch von SnRK2.4 aktiviert wird und dadurch noch immer eine Regulation des Kanals ermöglicht.

### 2.2.2.2 Analyse des C-Terminus

In früheren Studien wurde eine Phosphorylierung von zwei Serinen S280 und S283 des C-Terminus von PIP2;1 als Antwort auf Salzstress gezeigt (Prak et al. 2008, Di Pietro et al. 2013), weshalb die Funktionalität dieser Aminosäuren mittels Mutanten analysiert wurde. Hierfür wurden die beiden Serine in die phosphomimetische (S280D, S283D) bzw. phosphoablative Form mutiert (S280A, S283A) und anschließend die beiden Mutanten in verschiedenen Kombinationen auf eine veränderte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit im Vergleich zum Wildtyp getestet.

Die Mutantenanalyse der beiden C-terminalen Serine zeigte, sowohl für die doppelphosphomimetische, und die doppelablative Version, als auch für eine Kombination aus beiden Mutanten, ein reduziertes Wachstum, welches weiter durch SnRK2.4-Koexpression vermindert werden kann, was vergleichbar mit dem wildtypischen Aquaporin ist (Abb. 2-31). Deshalb ist eine essentielle Funktion dieser Aminosäuren für ein funktionales Aquaporin sowie deren Aktivierung durch SnRK2.4 unwahrscheinlich.





**Abbildung 2-31 Einfluss verschiedener Mutationen des C-Terminus von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.**

C-terminale Mutanten von PIP2;1 zeigten ein ähnliches Wachstum, wie das wildtypische Aquaporin. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV), oder verschiedenen C-terminalen Mutanten von PIP2;1 in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

### 2.5.2.3 Analyse des N-Terminus

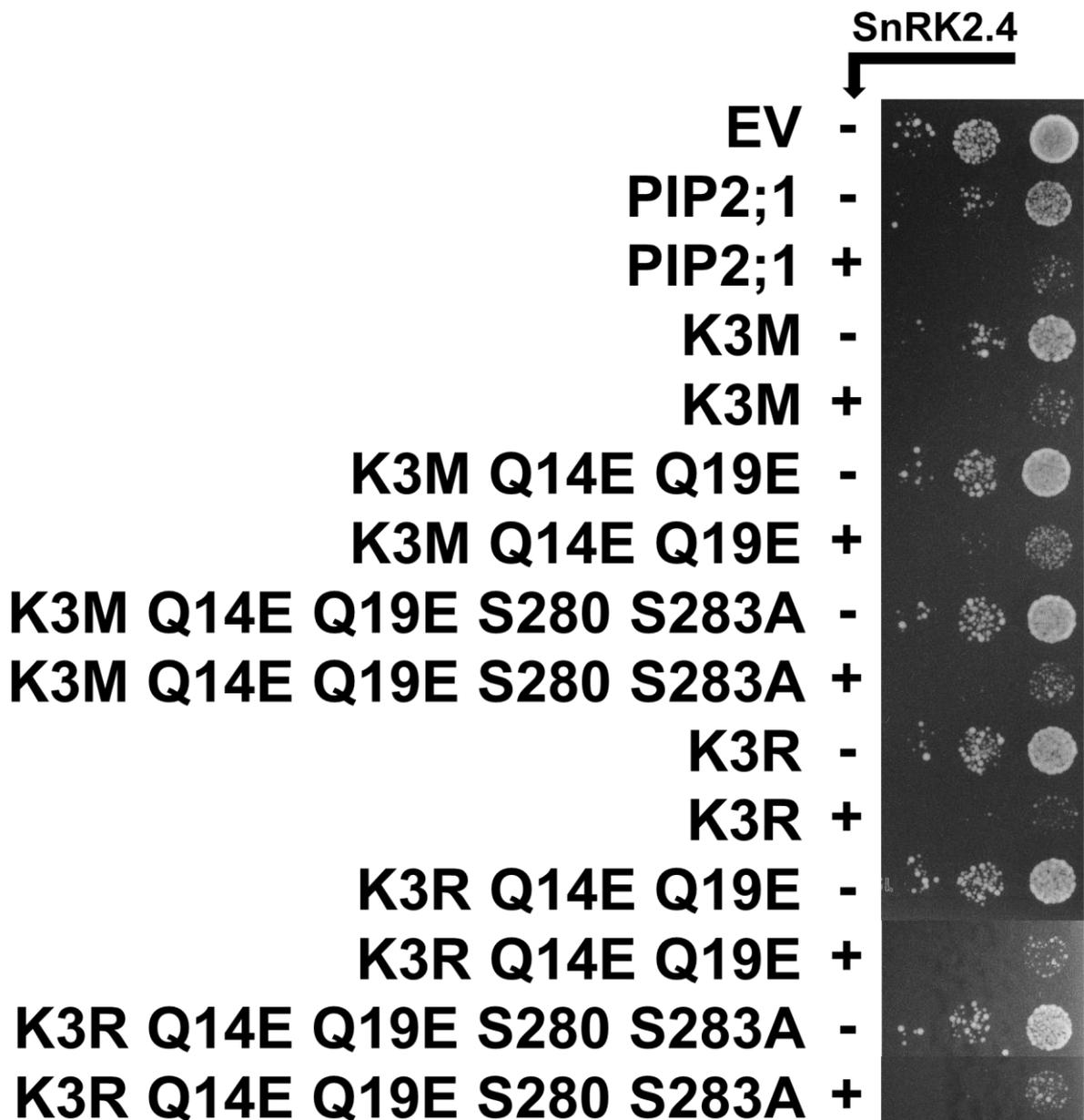
Durch den vermehrten und verbesserten Einsatz massenspektrometrischer Analysen für Membranproteine konnten auch im N-Terminus von PIP<sub>2</sub>;1 mehrere Aminosäuren identifiziert werden, mit einer beispielsweise wichtigen Funktion für den korrekten Transport des Proteins (Santoni et al. 2006). Die Effekte weiterer entdeckter posttranslationaler Modifikationen bei anderen Aminosäuren sind teilweise nicht eindeutig bestätigt. Deswegen wurden im Folgenden Mutanten vermeintlich relevanter Aminosäuren des N-Terminus generiert und auf ein verändertes Verhalten der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit getestet, auch in Kombination mit Mutanten des nicht phosphorylierbaren C-Terminus. Die Dimethylierung von Lysin 3 sollte durch die Mutation der Aminosäure zu Alanin (A) bzw. Arginin (R) verhindert werden. Glutamin 14 und 19 werden deamidiert, was durch eine Mutation zu Glutaminsäure (E) imitiert werden sollte.

Die Mutantenanalyse zeigte, sowohl für die einzelnen N-terminalen Mutationen, als auch für die Kombination von Q14E, Q19E mit K3A oder K3R sowie deren Kombination mit den nicht phosphorylierbaren C-Terminus-Mutanten, ein reduziertes Wachstum, welches weiter durch SnRK2.4-Koexpression vermindert werden konnte (Abb. 2-32, Abb. 2-33). Es konnte keine Abweichung in Wachstumsverhalten und SnRK2.4-Aktivierung im Vergleich zum wildtypischen Aquaporin festgestellt werden, weshalb eine essentielle Funktion dieser Aminosäuren unwahrscheinlich ist.



**Abbildung 2-32 Einfluss verschiedener Mutationen des N-Terminus von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.**

N- und C-terminale Mutanten von PIP2;1 zeigten ein ähnliches Wachstum, wie das wildtypische Aquaporin. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder verschiedenen N-terminalen Mutanten von PIP2;1 in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.



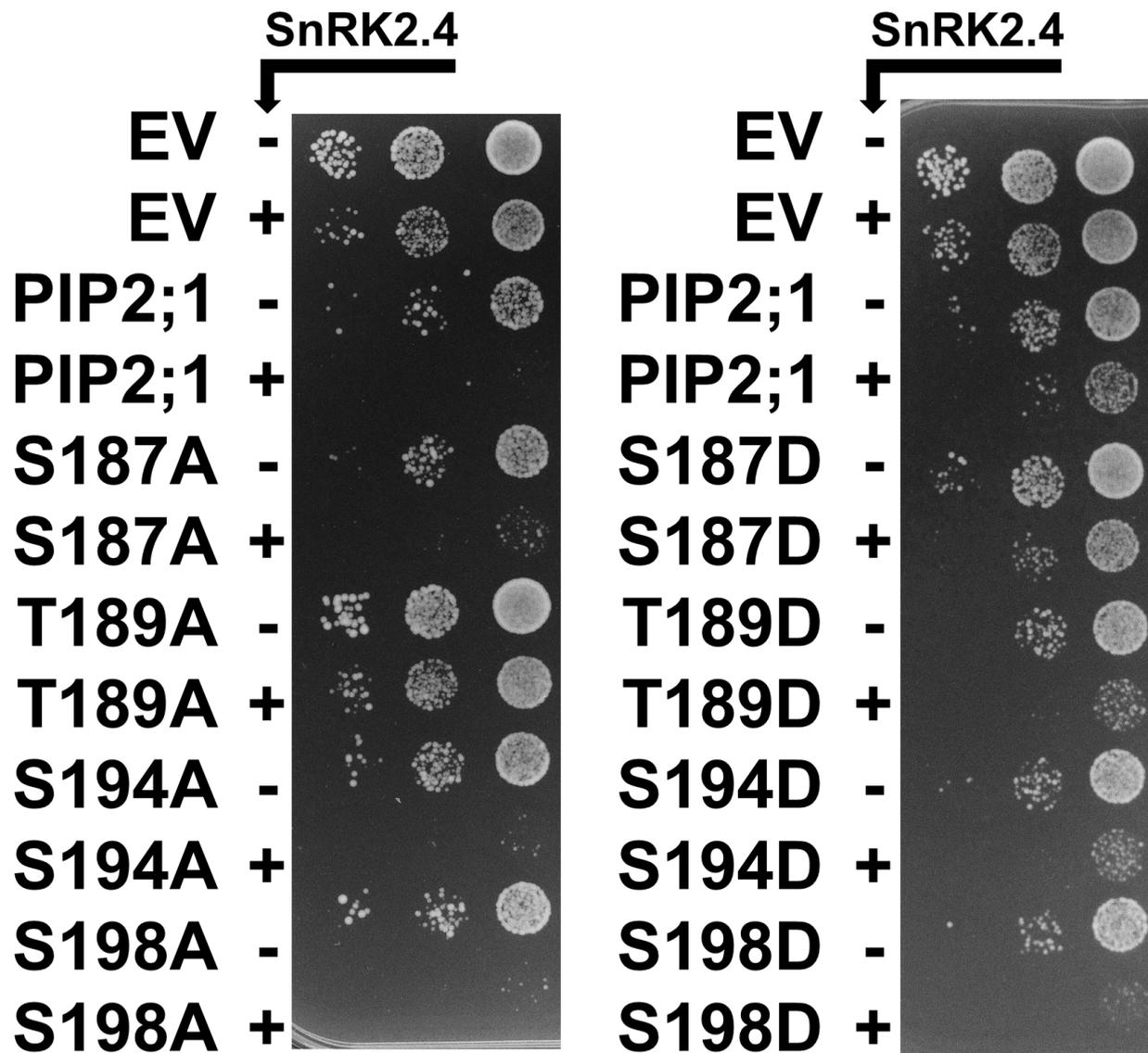
**Abbildung 2-33 Einfluss verschiedener Mutationen des N-Terminus von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.**

N- und C-terminale Mutanten von PIP2;1 zeigten ein ähnliches Wachstum, wie das wildtypische Aquaporin. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder verschiedenen N-terminalen Mutanten von PIP2;1 in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

#### 2.5.2.4 Analyse des D-loops

Im D-loop von PIP2;1 erscheinen vier Aminosäuren als potentiell für eine Phosphorylierung durch SnRK2.4 zugänglich. Die Aminosäuren S187, T189, S194 und S198 sind weiterhin in allen PIP2s konserviert. Ausnahme bilden PIP2;2, PIP2;3 PIP2;4 und PIP2;6, die an Position 194 kein Serin, sondern ein Asparagin haben. Folglich wurden die phosphomimetischen und phosphoablative Mutationen dieser Aminosäuren in verschiedenen Kombinationen auf eine veränderte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit und SnRK2.4-Aktivierung hin getestet.

Die Einzelmutanten S187A, S187D, T189D, S194A, S194D, S198A und S198D des D-loops zeigten auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ein vermindertes Wachstum, welches durch SnRK2.4-Koexpression weiter vermindert wird und allgemein mit dem wildtypischen Aquaporin vergleichbar ist. Für die T189A-Mutante war kein vermindertes Wachstum detektierbar, welches auch nicht durch zusätzliche SnRK2.4-Expression beeinflusst wurde und damit dem transformierten Leervektor, bzw. einem inaktiven Aquaporin ähnelt (Abb. 2-34).

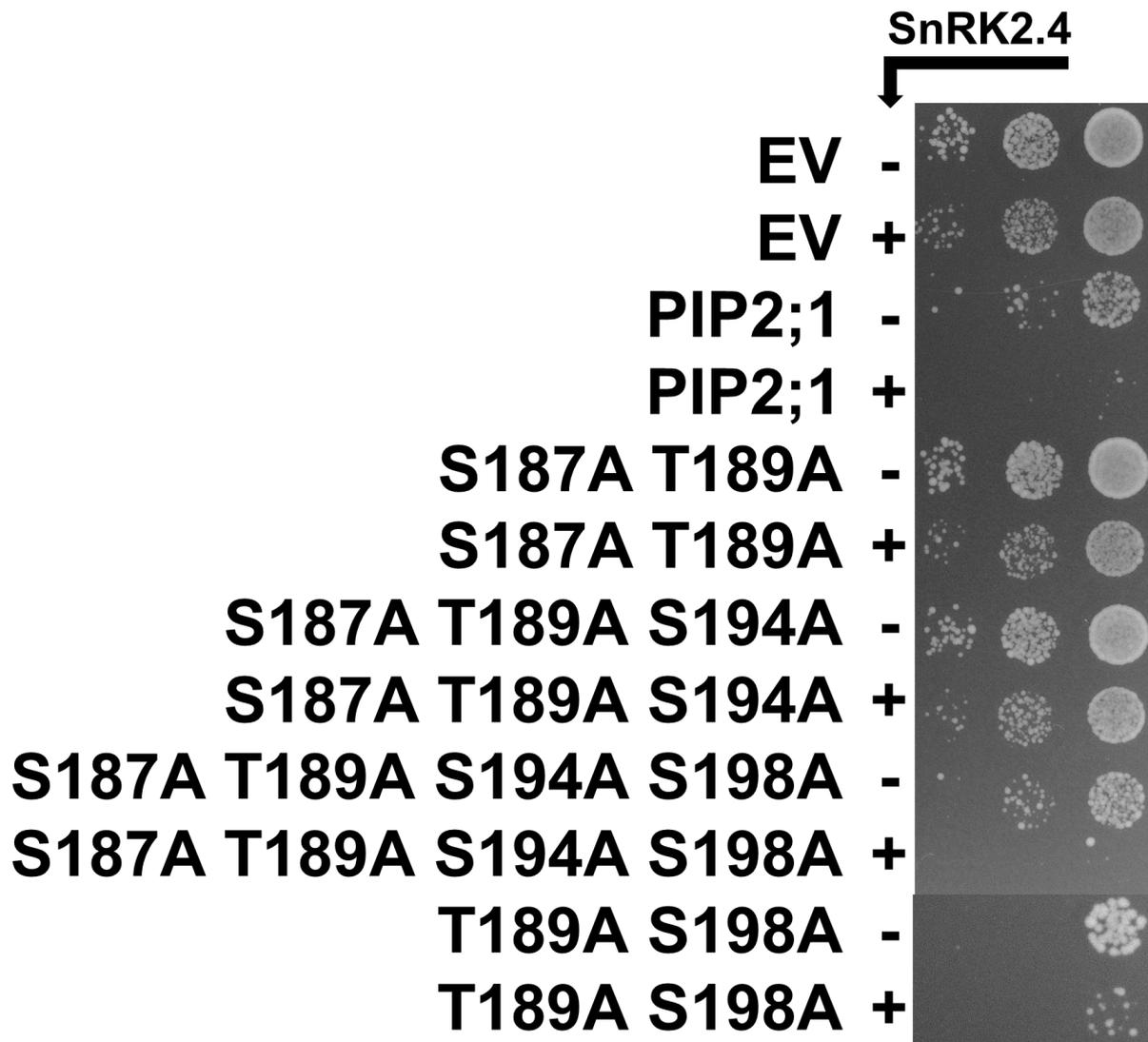


**Abbildung 2-34 Einfluss verschiedener Mutationen des D-loops von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.**

Mutanten des D-loops von PIP2;1 zeigten ein ähnliches Wachstum, wie das wildtypische Aquaporin. Die T189A-Mutante hingegen, zeigte kein inhibiertes Wachstum, welches auch nicht durch SnRK2.4-Expression beeinflusst wurde. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder verschiedenen Mutanten des D-loops von PIP2;1 in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

Die multiplen phosphoablative Mutanten des D-loops zeigten für die Kombinationen S187A, T189A und S187A, T189A, S194A kein vermindertes Wachstum auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, welches auch nicht durch SnRK2.4-Expression beeinflusst wurde und damit dem Leervektor und einem nicht funktionalen Aquaporin ähnelt (Abb. 2-35). Dies liegt wahrscheinlich an der T189A Mutante, die in allen Kombinationen vorliegt und bereits als Einzelmutante nicht funktional ist, was eine vermutlich wichtige Funktion dieser Aminosäure für die Funktionalität und SnRK2.4-Regulation des Proteins hervorhebt.

Interessanterweise zeigte die 4-fach Mutante des D-loops aus S187A, T189A, S194A, S198A wieder ein vermindertes Wachstum, welches durch SnRK2.4-Koexpression noch weiter reduziert werden kann und damit dem wildtypischen Aquaporin gleicht. Dieser Phänotyp konnte ebenfalls für die T189A, S198A-Mutante beobachtet werden (Abb. 2-35), was eine mögliche Interaktion dieser beiden Aminosäuren impliziert, die in der Lage ist die negative Funktion der T189A-Mutation auf Funktionalität und Regulation wieder aufzuheben.

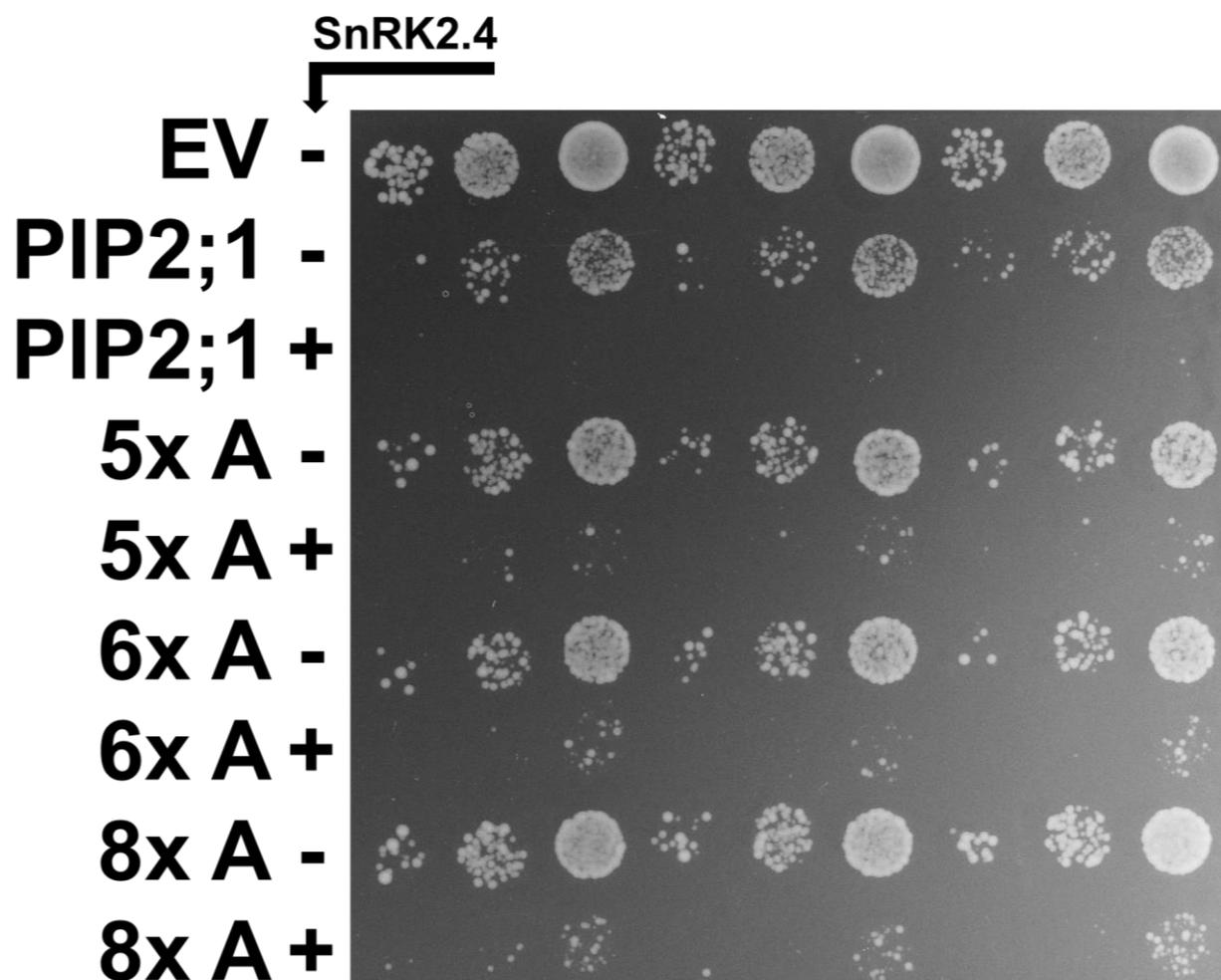


**Abbildung 2-35 Einfluss verschiedener Mutationen des D-loops von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.**

Multiple Mutanten des D-loops von PIP2;1 zeigten kein inhibiertes Wachstum, welches auch nicht durch SnRK2.4-Expression beeinflusst wurde. Die Mutantenkombinationen von S187A, T189A und S194A zeigten ein ähnliches Wachstum, wie der Leervektor (EV). Die T189A-Mutante hingegen, zeigte in Kombination mit S198A ein dem wildtypischen Aquaporin entsprechendes Wachstum. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor oder verschiedenen Mutanten des D-loops von PIP2;1 in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.



Als letzter Versuch, ein nicht mehr phosphorylierbares Aquaporin zu generieren und damit möglichst viele vermutete Phosphorylierungsstellen durch SnRK2.4 auszuschließen, wurde die 4-fach phosphoablative Mutante des D-loops mit den mutierten Aminosäuren S280A (5x A), S280A, S283A (6x A) des C-Terminus sowie zwei weiteren mutierten potenziellen Phosphorylierungsstellen im N-Terminus T15A und S36A (8x A) erweitert und deren Funktionalität sowie die SnRK2.4-Aktivierung getestet.



**Abbildung 2-36 Einfluss multipler Mutationen von PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 auf das Hefewachstum.**

Multiple Mutanten von PIP2;1 zeigten ein ähnliches Wachstum, wie das wildtypische Aquaporin. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder verschiedenen Mutanten von PIP2;1 in Kombination mit (+) oder ohne (-) SnRK2.4 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

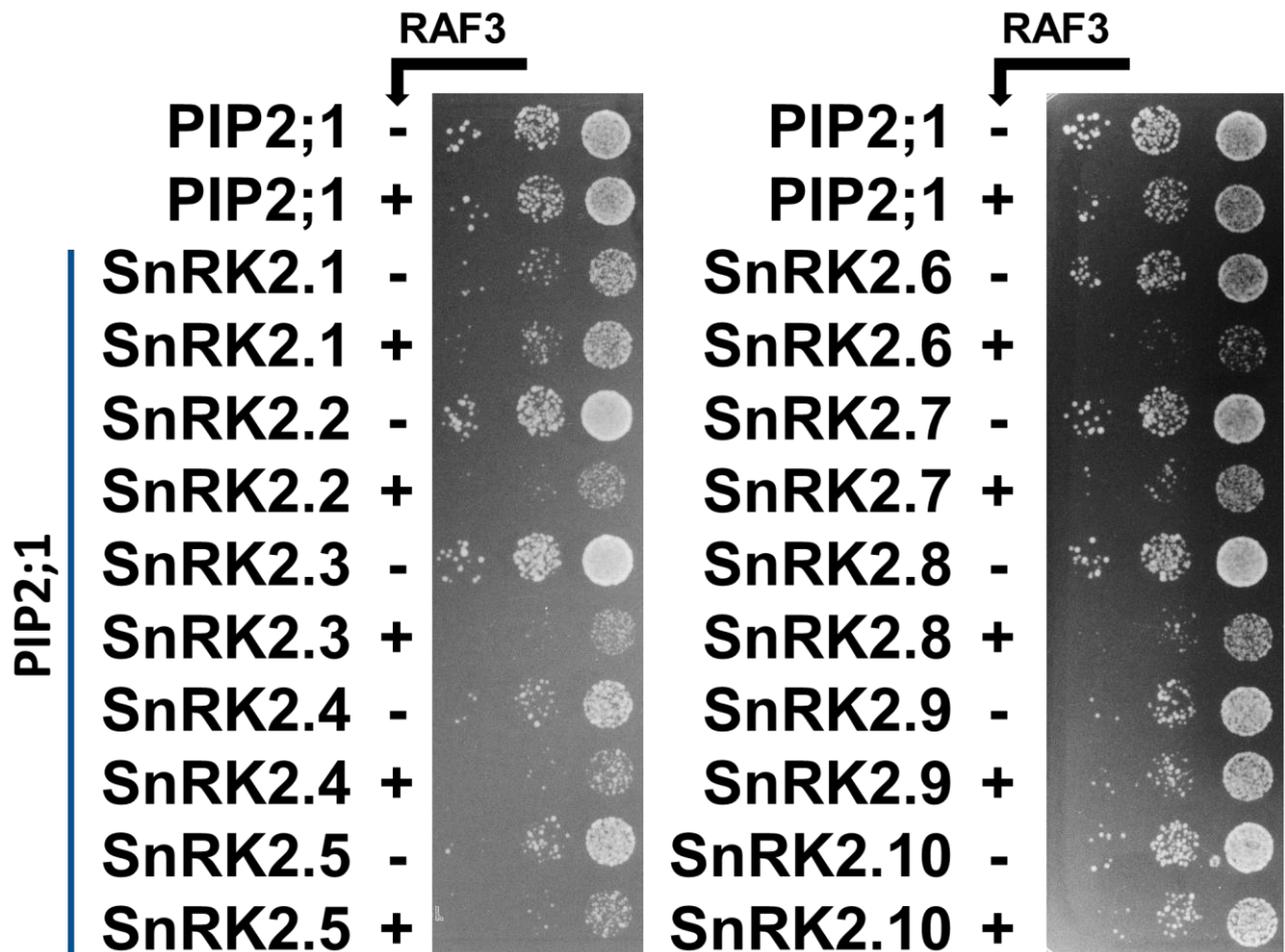
Auch für die 5x, 6x und 8x phosphoablative Mutanten konnte ein vermindertes Hefewachstum auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und eine weitere Verminderung des Wachstums durch SnRK2.4-Koexpression, welche vergleichbar mit einem wildtypischen Aquaporin ist, festgestellt werden (Abb. 2-36). So wird geschlussfolgert, dass keine der hier getesteten Aminosäuren von PIP2;1 eine essentielle Funktion für die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Permeabilität oder die Regulierung durch SnRK2.4 in Hefe aufweist.

### 2.5.3 Analyse des Einflusses von RAFs auf SnRK2s und PIP2;1

Bereits 2015 wurde von Saruhashi und Kollegen im Moos *P. patens* gezeigt, dass eine RAF-Kinase ein wichtiger Bestandteil für die ABA- und osmotischen Stressreaktionen und die damit verbundene Aktivierung von SnRK2-Kinasen ist (Saruhashi et al. 2015). In den 2020er Jahren erschienen dann mehrere Studien zu Analysen in Arabidopsis, welche eine essentielle Rolle und Funktion von RAF-Kinasen in der pflanzlichen Stressantwort und im ABA-Signalweg bestätigen (Lin et al. 2020, Soma et al. 2020, Takahashi et al. 2020).

Um einen Einfluss von RAF3 auf die SnRK2s und damit auch auf die Regulation von PIP2;1 zu untersuchen, wurde RAF3 mit verschiedenen SnRK2s in PIP2;1 exprimierenden Hefen koexprimiert.

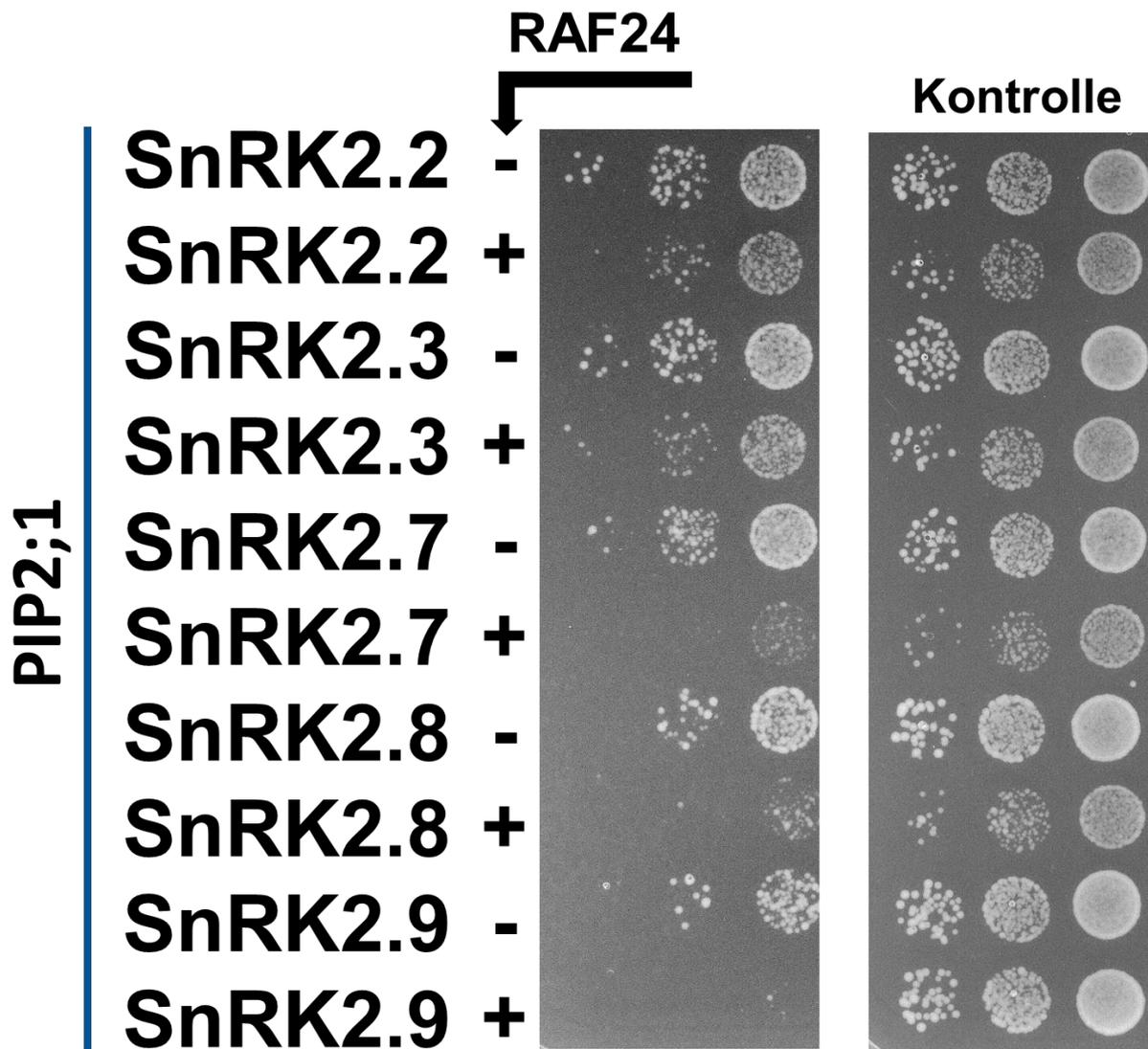
Durch die Expression von SnRK2s der Untergruppe I kam es, wie bereits gezeigt, zu einem, im Vergleich zu PIP2;1, weiter verminderten Hefewachstum. Durch Koexpression von RAF3 wurde das Wachstum dieser Hefen außer für SnRK2.6, welches deutlich schlechter wächst, kaum beeinflusst. Auch auf PIP2;1 alleine hatte RAF3 keinen Einfluss. SnRK2s der Untergruppen II und III hingegen, welche ohne RAF3 uneingeschränkt wachsen, zeigten mit RAF3-Koexpression bis auf SnRK2.9 ein deutlich reduziertes Wachstum (Abb. 2-37). Dies lässt sich durch einen möglichen direkten Effekt von RAF3 und eine damit verbundene Aktivierung spezifischer SnRK2s erklären.



**Abbildung 2-37 Einfluss von RAF3 auf das Hefewachstum von PIP2;1 und SnRK2s exprimierenden Hefen**

Die Koexpression von RAF3 führte bei SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6, SnRK2.7 und SnRK2.8 in Kombination mit PIP2;1 zu einem stärker verminderten Wachstum als ohne RAF3. Ein PIP2;1 exprimierender Hefestamm wurde mit verschiedenen SnRK2s in Kombination mit (+) oder ohne (-) RAF3 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2s und RAF3 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

Auch ein Einfluss von RAF24 auf SnRK2s sollte untersucht werden. Die Kotransformation von RAF24 in Kombination mit PIP2;1 und SnRK2s der Untergruppe I, sowie SnRK2.6 blieb ohne Erfolg, weshalb nur die übrigen SnRK2s der Untergruppen II und III hier analysiert werden konnten.



**Abbildung 2-38 Einfluss von RAF24 auf das Hefewachstum von PIP2;1 und SnRK2s exprimierenden Hefen**

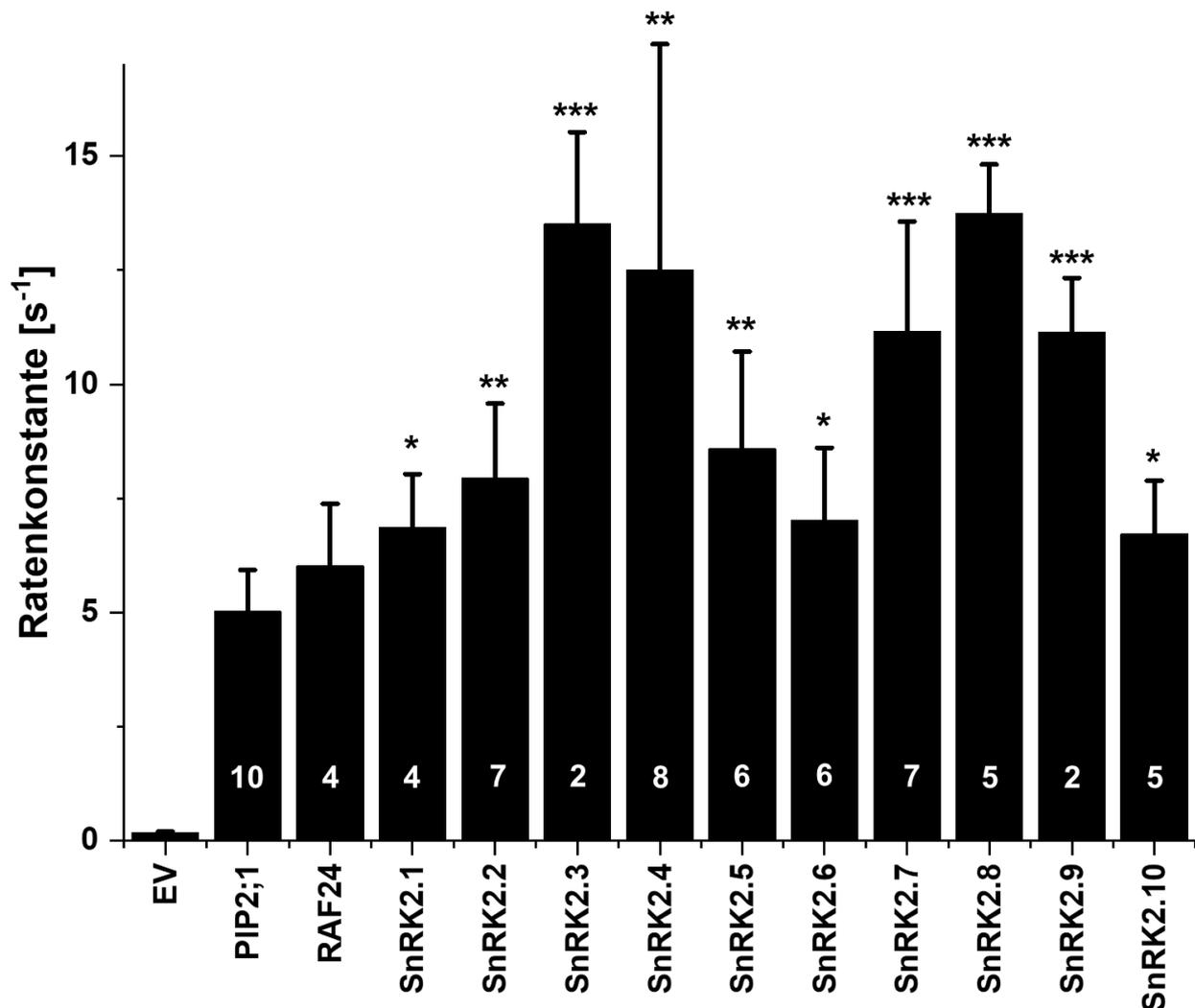
Die Koexpression von RAF24 führte bei SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.6, SnRK2.7, SnRK2.8 und SnRK2.9 in Kombination mit PIP2;1 zu einem stärker verminderten Wachstum als ohne RAF24. Ein PIP2;1 exprimierender Hefestamm wurde mit verschiedenen SnRK2s in Kombination mit (+) oder ohne (-) RAF24 transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2s und RAF24 wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0 mM (Kontrolle) oder 0,1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

SnRK2s der Untergruppen II und III zeigten ein durch die PIP2;1-Koexpression leicht vermindertes Wachstum. Dies wurde durch die Expression von RAF24 für SnRK2.7, SnRK2.8 und SnRK2.9 deutlich und für SnRK2.2 und SnRK2.3 leicht verstärkt, was auf eine Aktivierung dieser SnRK2s hindeutet, welche daraufhin in der Lage sind PIP2;1 und die damit verbundene H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Aufnahme zu regulieren. Die Kontrolle ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zeigte ein uneingeschränktes Wachstum der Hefen bei der Koexpression aller Plasmide (Abb.2-38).

Um eine Wirkung von RAF24 auf PIP2;1 bzw. dessen Aktivierung durch SnRK2s in Hefe zu bestätigen, wurde die Stopped-Flow-Methode verwendet. Hierzu wurden Hefen, mit PIP2;1 in Kombination mit verschiedenen SnRK2s transformiert. Die inaktiven SnRK2s wurden hier zusammen mit RAF24 exprimiert um eine Aktivität dieser SnRK2s zu erzeugen und damit einen möglichen direkten Einfluss der Kinasen auf PIP2;1 zu detektieren. Bei den Transformanten wurde anschließend die Zellwand lysiert und die Sphäroplasten in einer hypoosmotischen Lösung aufbereitet und anschließend in einem Gerät zur Messung schneller Kinetiken mit einer hyperosmotischen Lösung inkubiert. Durch die unterschiedlich molaren Lösungen kommt es zu einem Wasserausstrom und damit einem Schrumpfen der Zellen, was über einen Zeitraum von 8 s detektiert wird. Die Kinetikkurven wurden anschließend in Origin mit einem 2exp-decay gefittet, wobei die so für die Kinetik berechneten Ratenkonstanten direkt proportional zur Leitfähigkeit sind (Kozono et al. 2003, Calamita et al. 2005) und dadurch einen genauen Aufschluss über die theoretische Wasserleitfähigkeit der verschiedenen Konstrukte und den Einfluss von SnRK2s und RAF24 auf PIP2;1 geben.

Durch die PIP2;1-Expression kommt es zu einem starken Schrumpfen der Zellen durch Wasserausstrom was durch eine deutlich erhöhte Ratenkonstante von etwa 5 s<sup>-1</sup> im Vergleich zum Wildtyp (EV) detektiert wurde. Eine zusätzliche Koexpression von RAF24 hatte keinen signifikanten Effekt auf die Aktivität und Wasserleitfähigkeit von PIP2;1. Die Koexpression der SnRK2-Kinasen führte jedoch in allen Fällen zu einer mindestens signifikant erhöhten Wasserleitfähigkeit von PIP2;1. Für die Koexpression von SnRK2.1, SnRK2.6 und SnRK2.10 konnte eine signifikant erhöhte Leitfähigkeit von PIP2;1 detektiert werden. SnRK2.2, SnRK2.4 und SnRK2.5 zeigten eine hoch signifikante Ratenkonstante im Vergleich zur alleinigen PIP2;1-Expression mit Werten von 8, 12 und 8,5 s<sup>-1</sup>. Die höchsten Ratenkonstanten und eine damit verbundene

höchst signifikante Induktion der Ratenkonstante, wurde für SnRK2.3, SnRK2.7, SnRK2.8 und SnRK2.9 mit Werten von 11 bis 13,7 s<sup>-1</sup> gemessen (Abb. 2-39).



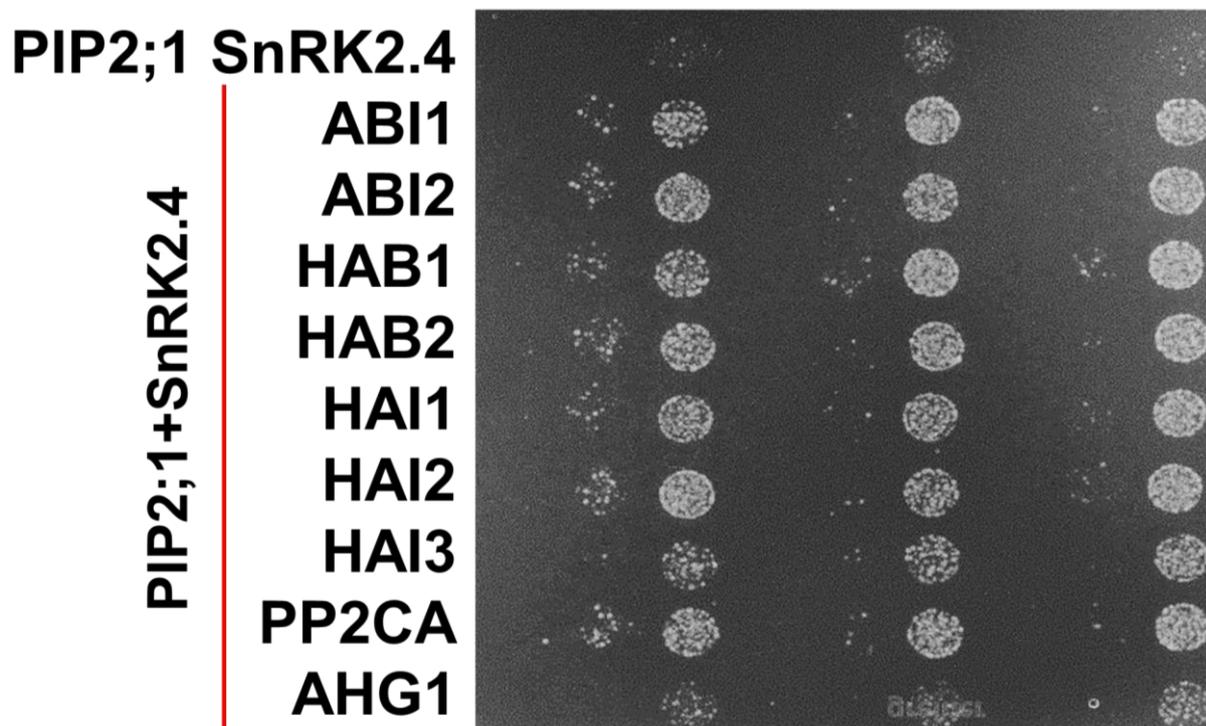
**Abbildung 2-39 SnRK2- und PIP2;1-vermittelter Wassertransport in Hefe-Sphäroplasten.**

Ein Leervektor (EV), RAF24, oder PIP2;1 in Kombination mit verschiedenen SnRK2s wurden in Hefe-Sphäroplasten exprimiert. SnRK2.2, SnRK2.3, SnRK2.7, SnRK2.8 und SnRK2.9 wurden in Kombination mit RAF24 in BMA64-1A Wildtyphefen exprimiert. PIP2;1 bzw. SnRK2s und RAF24 wurden unter dem konstitutiv aktiven pADH- bzw. pTDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden mit 1,2 M Sorbitol 100 mM Natriumphosphat (pH 6,5) resuspendiert und für die Messung mit 1,8 M Sorbitol 100 mM Natriumphosphat (pH 6,5) in einem Gerät zur Untersuchung schneller Kinetiken bei 15 °C gemischt. Die Kinetiken wurden über 8 s aufgezeichnet und ein 2exp-decay als Kurvenanpassung zur Berechnung der Ratenkonstante verwendet. Jeder Datenpunkt stellt einen Mittelwert von 10±2 Einzelmessungen dar. Fehlerbalken zeigen die SD aus n=x (Zahl im Balken) Replikaten. \*P < 0,05, \*\*P < 0,01, \*\*\* P < 0,001 (one-way ANOVA) im Vergleich zu Zellen die PIP2;1 exprimieren.

### 2.5.4 Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung von PP2Cs auf PIP2;1

Um die weitere Funktionalität des Wachstumsassays im Hinblick auf die Regulation durch den ABA-Signalweg zu testen, wurden verschiedene PP2Cs in Kombination mit PIP2;1 und SnRK2.4 koexprimiert.

Für Hefen, die PIP2;1 in Kombination mit SnRK2.4 exprimieren, konnte auf 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Platten praktisch kein Wachstum mehr detektiert werden. Die PP2C-exprimierenden Hefen zeigten alle, im Vergleich zu PIP2;1- und SnRK2.4-Exprimierern, ein deutlich verbessertes Wachstum mit dem schwächsten Effekt für AHG1 (Abb. 2-40). Dies deutet auf eine inhibitorische Wirkung der PP2Cs auf SnRK2.4 oder eine eventuelle Dephosphorylierung des Aquaporins selbst hin.

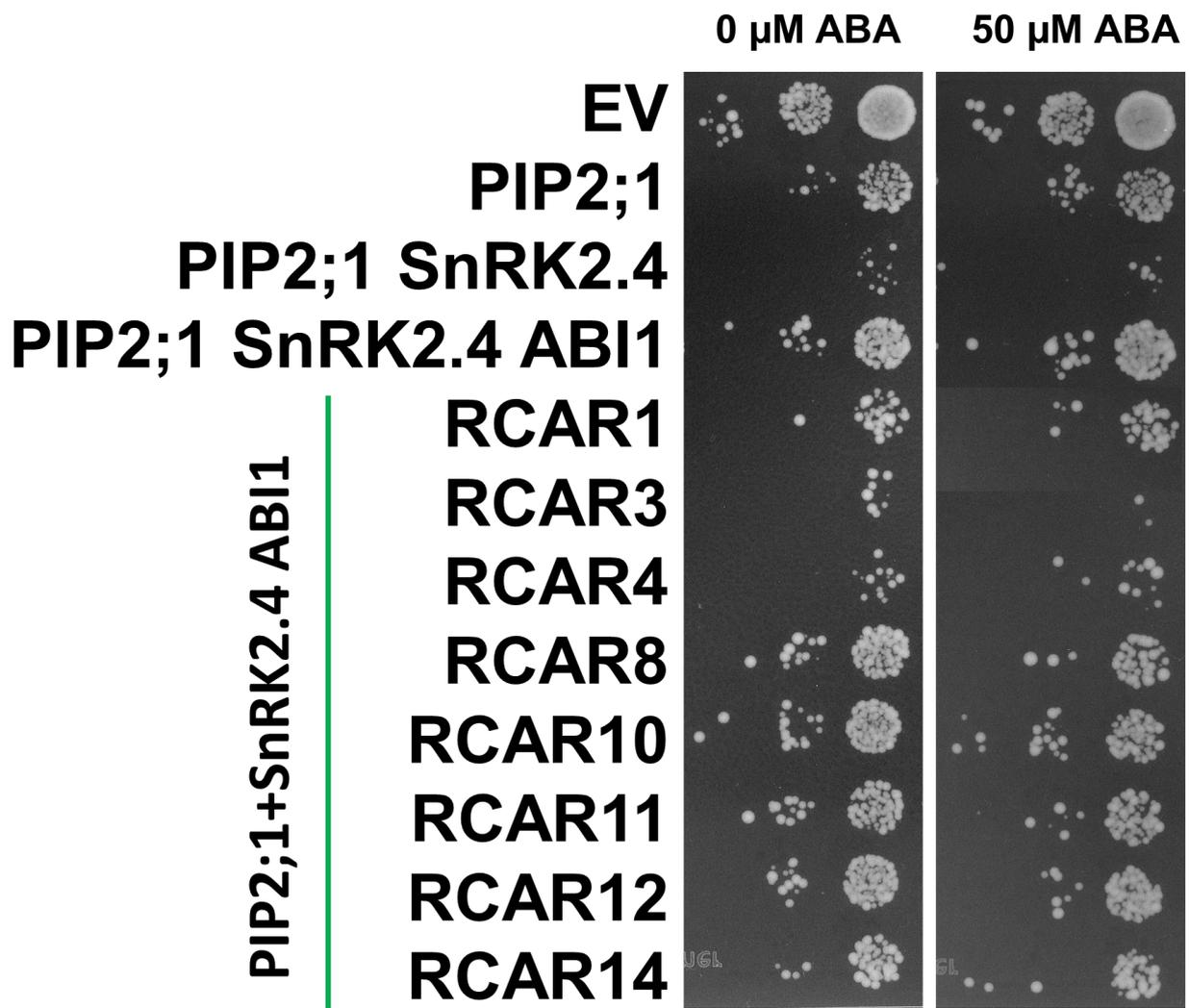


**Abbildung 2-40 Einfluss von PP2Cs auf das Hefewachstum von PIP2;1 und SnRK2.4 exprimierenden Hefen**

Die Expression von PP2Cs inhibiert die Wirkung von SnRK2.4 auf PIP2;1, was ein erhöhtes Wachstum zur Folge hat. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit PIP2;1 und SnRK2.4 in Kombination mit verschiedenen PP2Cs transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4 und PP2Cs wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.

### 2.5.6 Charakterisierung der Wirkung des ABA-Rezeptorkomplexes auf PIP2;1

Die ABA-Signalkaskade wurde in den folgenden Experimenten durch die zusätzliche Expression von RCARs vervollständigt.



**Abbildung 2-41 Einfluss von RCARs auf das Hefewachstum von PIP2;1, SnRK2.4 und ABI1 exprimierenden Hefen**

Die Expression von RCAR3 und RCAR4 führte zu einer Inhibierung von ABI1, wodurch ein vermindertes Hefewachstum festgestellt werden konnte. Die Anwesenheit von 50  $\mu$ M ABA zeigte keinen Einfluss. Der Hefestamm BMA64-1A wurde mit einem Leervektor (EV) oder mit PIP2;1, SnRK2.4 und ABI1 in Kombination mit verschiedenen RCARs transformiert. PIP2;1 bzw. SnRK2.4, ABI1 und RCARs wurden unter dem konstitutiv aktiven ADH- bzw. TDH3-Promotor exprimiert. Die Zellen wurden auf eine  $OD_{600}$  von 0,1 eingestellt und dann dreimal mit einer seriellen 10er-Verdünnungsreihe verdünnt und auf Platten mit 0,2 mM  $H_2O_2$  pipettiert. Die Bilder wurden nach 2 Tagen bei 30 °C aufgenommen.



Die zusätzliche Expression von RCAR8, RCAR10, RCAR11, RCAR12 und RCAR14 führte im Vergleich zu PIP2;1-, SnRK2.4-, und ABI1-exprimierenden Hefen zu keiner Verschlechterung des Hefewachstums. Für die Koexpression von RCAR3 und RCAR4 konnte jedoch ein leicht vermindertes Hefewachstum beobachtet werden. Das zusätzliche Vorhandensein von 50  $\mu$ M ABA hatte keinen Einfluss auf diese Ergebnisse (Abb. 2-41). Dies lässt auf einen negativ regulatorischen Effekt unabhängig von ABA von RCAR3 und RCAR4 auf ABI1 schließen.

### 3 Diskussion

Pflanzen sind mit einem Anteil von über 80% an der terrestrischen Evapotranspiration stark am globalen Wasserkreislauf beteiligt (Jasechko et al. 2013, Bernacchi and VanLoocke 2015). Pflanzen mobilisieren über ihre Wurzeln Wasser aus dem Erdreich, welches nach dem Transport durch die Pflanze, wieder durch die Transpiration an den Stomata der Atmosphäre zugefügt wird. Die Verfügbarkeit von Wasser ist weiterhin ein wichtiger limitierender Faktor für das pflanzliche Wachstum, das die Grundlage für die Ernährung von Mensch und Tier ist (Boyer 1982).

Wenn Pflanzen Wassermangel ausgesetzt sind, kommt es zur Regulation des Wasserflusses innerhalb der Pflanze über Aquaporine durch Anpassungen der Wasseraufnahme über die Wurzeln und des Wasserverlustes über Stomata. Dies wird sehr schnell durch ein hydraulisches Signal zwischen Wurzeln und Blättern ausgelöst, was weiterhin die Synthese von ABA induziert (Christmann et al. 2007, Christmann et al. 2013). Durch ABA werden verschiedene pflanzliche Stressreaktionen im Hinblick auf Dormanz, Keimung, Wurzelwachstum und Stomataschluss reguliert (Cutler et al. 2010, Li et al. 2010). Die Analyse von neu entdeckten Komponenten des ABA-Signalwegs sowie die molekularen Interaktionen dieser mit Aquaporinen, sollte in dieser Arbeit zu einem besseren Verständnis und einer später möglichen physiologischen Verbesserung der pflanzlichen Trockenstressantwort durch eine erhöhte Wassernutzeffizienz führen.

#### 3.1 Hefe als Modellsystem für die Regulation pflanzlicher Aquaporine im ABA-Signalweg

Die Analyse pflanzlicher Aquaporine im heterologen Modellsystem Hefe hat den großen Vorteil, die Redundanz der pflanzlichen Proteine zu minimieren und so die Effekte einzelner Komponenten ohne den Hintergrund des pflanzlichen Proteoms entschlüsseln zu können. In dieser Studie konnte erstmals die ABA-abhängige Regulation eines pflanzlichen Aquaporins gezeigt werden. Ausgehend von den Arbeiten von Ruschhaupt et al. (Ruschhaupt et al. 2019), die eine Regulation der ABA-Signalkaskade durch verschiedene SnRK2s mit unterschiedlichen Effizienzen, abhängig vom verwendeten Rezeptorkomplex nachwiesen, sowie von Studien, die für einzelne Vertreter von Aquaporinen, wie dem humanen AQP8, TIP1;1, TIP1;2 und

PIP2;1, eine Transportfähigkeit für Wasser dieser Proteine zeigten (Bienert et al., 2007; Dynowski et al., 2008) wurde in dieser Arbeit die Aktivierung verschiedener Aquaporine durch SnRK2s, sowie deren Regulation über ABA-abhängige Signalkomponenten gezeigt.

In weiterführenden Studien wurde für alle Vertreter der PIP2-Gruppe ein verminderter Wachstumsphänotyp auf H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Medium identifiziert, was mit der Wasserleitfähigkeit dieser Proteine korreliert und damit einem funktionalen Wasserkanal gleichgesetzt werden kann (Almasalmeh et al, 2014; Wang et al., 2020; Groszmann et al.,2023).

In dieser Studie konnte, im Gegensatz zu den eben genannten Studien, nicht für alle Aquaporine durch H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Wachstumsassays eine Wasserleitfähigkeit detektiert werden, wobei hier PIP2;6 und PIP2;8 die Ausnahme bildeten. Von den 35 Aquaporinen in Arabidopsis wurde nur eine Stichprobe aus den jeweiligen Familien auf Wasserleitfähigkeit getestet und der Fokus auf Proteine der PIP-Gruppe, welche maßgeblich am Wassertransport innerhalb der Pflanze beteiligt sind (Bienert et al., 2002), mit PIP2;1 als prototypischem Vertreter, gelegt. Grundsätzlich zeigten die in dieser Arbeit getesteten Aquaporine eine unterschiedlich starke Fähigkeit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und damit auch Wasser zu transportieren. Die PIP2-Gruppe zeigte bis auf PIP2;6 und PIP2;8 eine grundlegende Wasserleitfähigkeit, mit PIP2;3 und PIP2;4 am stärksten, ähnlich zu Wang et. al (Wang et al. 2020). Die fehlende Eigenschaft der zwei PIP2s kann nicht durch eine falsche Lokalisation der Proteine begründet werden, da beide Proteine korrekt in der Plasmamembran detektiert werden konnten. Vermutlich ist die Leitfähigkeit der beiden Proteine sehr gering, da in einer anderen Studie (Groszmann et al. 2023) gezeigt wurde, dass ebenfalls diese beiden Proteine als Ausnahme eine deutlich höhere Konzentration an zu transportierendem Substrat benötigen um einen Effekt zu detektieren. Eine erhöhte Konzentration an H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im hier verwendeten Assay hätte vermutlich zum gleichen Ergebnis geführt, so dass für alle PIP2s aus Arabidopsis eine Rolle im pflanzlichen Wasserfluss gezeigt werden konnte, wenn auch mit unterschiedlichen Effizienzen, was für eine Aktivierung unterschiedlicher PIP2s je nach Wasserbedarf und Wasserverfügbarkeit der jeweiligen Pflanzen spricht. Für Vertreter der anderen Untergruppen konnte nur für TIP1;1 nicht aber für TIP2;1, SIP1;1 und NIP5;1 eine Wassertransportfähigkeit festgestellt werden. Die Lokalisation dieser Proteine wurde nur für TIP1;1 überprüft und in der Plasmamembran festgestellt (nicht gezeigt), worauf auch immunologische Analysen in Erbse hinweisen (Robinson et al.

1996). Eigentlich wird sowohl SIP1;1, als auch TIP2;1 korrekt im ER bzw. in der Plasmamembran von Hefen exprimiert (Jahn et al. 2004, Ishikawa et al. 2005), aber es konnte zumindest für TIP2;1 bereits in früheren Studien keine H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit gezeigt werden (Bienert et al. 2007), weshalb es entweder weiterer Modifikationen des Aquaporins für die Transportfähigkeit bedarf, oder die Leitfähigkeit sehr niedrig ist und daher hier nicht detektierbar war.

Die Proteine der PIP1-Gruppe zeigten alle keine Wassertransportfähigkeit, was durch die Lokalisation der Proteine im ER begründet wird (Groszmann et al. 2023), da diese Proteine normalerweise Heterotetramere mit Vertretern der PIP2-Gruppe bilden und dadurch zur Plasmamembran geleitet werden (Jozefkowicz et al. 2017). Die hier getestete Expression von PIPs in Kombination mit PIP2;1 zeigte für die PIP1-Kombinationen keine gesteigerte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit, verglichen mit PIP2;1 alleine, was entweder an der geringen Leitfähigkeit der PIP1s, verglichen mit PIP2;1 liegt, oder aber die PIP1s eine ganz andere Rolle spielen und eventuell andere Substrate transportieren. Weiterhin wurde mit PIP2s nur in Kombination mit bereits aktiven PIP2s die Wasserleitfähigkeit weiter erhöht. Genau wie für PIP1s konnte hier nicht festgestellt werden, ob eine Heteromerisierung der Aquaporine stattgefunden hat und damit die Leitfähigkeit beeinflusst, oder ob dies lediglich durch den zusätzlichen Einbau weiterer Kanäle in die Membran bedingt ist. Um dies zu überprüfen, müssten die Proteine mit Tags exprimiert werden, um eine mögliche Expression als Tetramer in Hefe testen zu können, was zumindest für Mais PIP1;2 nicht zu einer positiven Wirkung auf die Leitfähigkeit führte (Bienert et al. 2014).

Ein wichtiger Regulator des Wasserhaushalts und damit auch von Aquaporinen ist ABA, welches unterschiedliche Einflüsse auf die jeweiligen Leitfähigkeiten in Wurzel und Spross haben kann. Eine Regulation von Aquaporinen durch spezifische Komponenten und Komplexe des ABA-Signalwegs, welche bei verschiedenen ABA-Konzentrationen an- oder abgeschaltet werden, könnte die unterschiedlichen Effekte von ABA auf die jeweiligen Leitfähigkeiten erklären und würde somit eine Regulation des Wasserhaushalts, angepasst an die individuelle Situation der Pflanze hinsichtlich ihres aktuellen Wasserbedarfs, erlauben. Eine vermeintlich positive Wirkung auf Aquaporine durch ABA bzw. durch ABA-induzierte SnRK2-Kinasen, konnte bereits *in vitro* durch die Phosphorylierung eines Serins 121 im B-loop des PIP2;1-Peptids gezeigt werden, welches in Pflanze durch die Verwendung einer nicht mehr

phosphorylierbaren Mutante S121A an dieser Stelle nicht mehr zur Schließung der Stomata führt (Grondin et al., 2015). Für eine weitere SnRK2-Kinase, SnRK2.4, konnte ebenfalls die Phosphorylierung des Peptids an der gleichen Stelle detektiert werden und eine damit einhergehende erhöhte Wasserleitfähigkeit in Oocyten, sowie Hefe-Sphäroplasten (Shazhad et al, 2023). Die Phosphorylierung von PIP2;1 an S121 konnte in diversen Studien bisher nur durch *in vitro*-Analysen eines Peptidrests detektiert und nicht durch massenspektrometrische Analysen bestätigt werden, wobei eine positive regulatorische Wirkung von SnRK2s auf Aquaporine jedoch mehrfach gezeigt werden konnte.

Die in dieser Studie getesteten SnRK2s konnten alle die Aktivität von verschiedenen Aquaporinen mit unterschiedlichen Stärken steigern, wobei es für manche, zumindest in Hefe, der Aktivierung durch RAF-Kinasen bedarf. Der größte Effekt auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Leitfähigkeit von PIP2;1 wurde durch SnRK2.1, SnRK2.4 und SnRK2.5 gezeigt, mit abgeschwächten Effekten von SnRK2.6 und SnRK2.10. Eine Regulation für das eigentlich im Tonoplasten lokalisierte TIP1;1, welches am Wassertransport der Vakuole beteiligt ist (Maurel et al. 1997), durch die in Hefe aktiven SnRK2s konnte ebenfalls gezeigt werden. Diese SnRK2s gehören zu der Untergruppe I und damit zu den ABA-unabhängigen SnRK2s, welche bereits ohne erhöhte ABA-Konzentrationen in der Pflanze und damit ohne Trockenstress den Wasserhaushalt regulieren können. Die Stärke der Effekte dieser Kinasen auf PIP2;1 ist vergleichbar mit den Effekten auf ABFs (Ruschhaupt et al. 2019), was zunächst auf keine Spezifität hinsichtlich der Regulation auf ABFs und Aquaporine schließen lässt und die Kinasen somit ihre Zielproteine möglicherweise gleichstark regulieren. Durch die Expression von RAF3 können die SnRK2s in Hefe aktiviert werden und somit zeigten folglich auch die Untergruppen II und III eine regulatorische Aktivität für PIP2;1, womöglich sogar mit stärkeren Effekten von SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6, im direkten Vergleich zur Untergruppe I. In der Analyse der Wasserleitfähigkeiten von Hefe-Sphäroplasten, die ein Aquaporin in Kombination mit SnRK2s und eventueller RAF24-Kombination exprimieren, konnte die stärkste Induktion des Wasserkanals für SnRK2.3 und SnRK2.8, gefolgt von SnRK2.4, SnRK2.7 und SnRK2.9 festgestellt werden, was eine Unterteilung der Effektivitäten in die verschiedenen Untergruppen der Kinasen, verglichen mit dem ersten Experiment, erschwert. Keine der getesteten SnRK2s zeigte eine Spezifität für PIP2;1, da alle 10 Kinasen die Aktivität des Kanals steigern konnten.

Durch die hier neu erlangte Erkenntnis, dass alle SnRK2-Kinasen PIP2;1 aktivieren können, wird der für SnRK2.4 und SnRK2.6 bereits gezeigte Zusammenhang einer Regulation des ABA-Signalwegs von Aquaporinen noch deutlicher. Die unterschiedlich starken Effekte der verschiedenen Kinasen, bzw. deren teilweise benötigte Aktivierung durch RAF, deuten auf eine Art Signalrelais oder Schaltkreislauf hin, sodass je nach aktuellem Wasserbedarf der Pflanze, unterschiedliche SnRK2-Kinasen primär im jeweiligen Organell aktiv sind und durch verschiedene RAFs aktiviert oder Phosphatasen wieder inhibiert werden, um die Leitfähigkeit und die damit verbundene Wasseraufnahme über die Wurzeln bzw. die Transpiration über Stomata möglichst genau anzupassen.

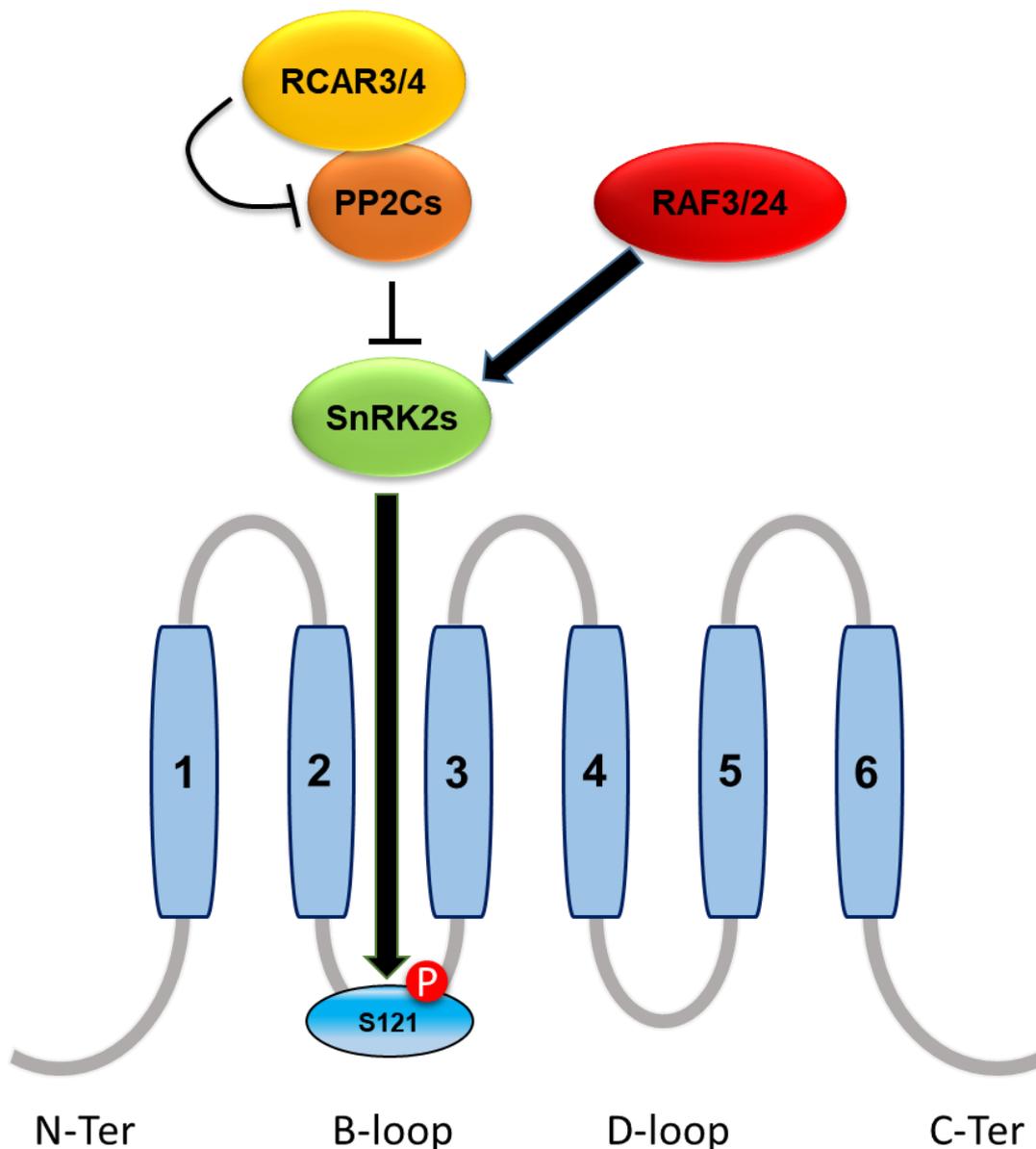
Eine Erweiterung des Signalwegs durch PP2Cs, für welche noch keinerlei Effekte auf Aquaporine gezeigt werden konnten, führt durch die Expression von PP2Cs zu einer verringerten Aktivität des durch SnRK2.4 aktivierten Kanals. Die Dephosphorylierung eines für die Aktivität essentiellen Serins im Aktivierungsloop von SnRK2s wurde für verschiedene SnRK2-PP2C-Kombinationen sowie die Interaktion von SnRK2.4 mit ABI1 gezeigt (Soon et al. 2012, Krzywińska et al. 2016). Eine regulatorische Funktion der anderen PP2Cs auf SnRK2.4 und dessen Eigenschaft PIP2;1 zu aktivieren, wurde in dieser Arbeit analysiert. Die Phosphatasen des ABI1-Typs und PP2CA-Typs zeigen ähnlich starke inhibitorische Effekte mit der schwächsten Wirkung von AHG1, was vergleichbar mit der Inhibierung von SnRK2.4 und dessen Effekt auf ABF2 ist (Ruschhaupt et al. 2019). Dies weist auf eine Regulation von, durch SnRK2 stimulierten Aquaporinen bei basalen ABA-Konzentrationen, durch alle PP2Cs hin. Die Unterscheidung, ob eine direkte Inhibierung von SnRK2.4 durch die von PP2Cs ausgelöste Verminderung der Kinaseaktivität oder eine Dephosphorylierung der vermeintlich durch SnRK2.4 phosphorylierten, zur Steigerung der Kanalaktivität relevanten Aminosäure des Aquaporins selbst vorliegt, kann nicht getroffen werden. Da eine direkte Dephosphorylierung eines Ionenkanals bereits gezeigt wurde, scheint auch eine Kombination beider Effekte möglich (Lee et al. 2007).

Die Regulation durch ABA wurde weiterhin durch die Rezeptorfamilie der RCARs vervollständigt. Durch die Bindung von ABA in der hydrophoben Bindetasche der RCARs kommt es zu einer Konformationsänderung des Rezeptors, wodurch die Affinität zur Komplexbildung mit PP2Cs gesteigert wird und die katalytische Aktivität der Phosphatase weiter inhibiert wird (Zhang et al. 2015). Über 100 verschiedene

Rezeptorkomplexe sind in Arabidopsis in der Lage den ABA-Signalweg zu regulieren (Tischer et al. 2017) und wurden, aufgrund der Komplexität, in dieser Arbeit auf eine Phosphatase, ABI1 und eine Auswahl der verschiedenen Unterfamilien an RCARs begrenzt. Nur für RCAR3 und RCAR4 der Unterfamilie I, konnte ein regulatorischer Effekt auf ABI1 festgestellt werden. Dies ist in Übereinstimmung mit Analysen, die zeigten, dass diese beiden Rezeptoren bereits ohne zusätzliches ABA am stärksten in Hefe aktiv sind (Ruschhaupt et al. 2019) und die Phosphatase inhibieren können, was in ähnlicher Weise ebenso für Protoplasten gezeigt wurde (Tischer et al. 2017). Für die Rezeptoren der Unterfamilie II und III ist eine Anwesenheit des Phytohormons für einen inhibitorischen Effekt der Rezeptoren auf die Phosphatase in Hefe nötig. Die Zugabe von 50  $\mu\text{M}$  ABA im Medium führte im Wachstumsassay jedoch zum gleichen Ergebnis, wie ohne exogenes ABA, da wieder nur RCAR3 und RCAR4 eine Inhibierung der Phosphatase zeigten. Eine Aktivität der Rezeptoren wurde in Hefe bereits im Komplex mit ABI1 gezeigt, weshalb eine mögliche Ineffizienz der ABA-Konzentration oder dessen Aufnahme in die Zelle, der Grund für die nicht beobachteten regulatorischen Effekte sein könnte. ABA wird von den Hefezellen zu ca. 10% nach 14 h aufgenommen, was einer intrazellulären Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  entsprechen würde, was zumindest für die Regulation des ABA-Signalwegs auf ABFs für eine regulatorische Wirkung ausreichen müsste (Ruschhaupt et al. 2019). Eine weitere Möglichkeit der Limitation des Wachstumsassays ist, dass die Signalkaskade bis zum Erreichen der benötigten intrazellulären ABA-Konzentration nicht aktiv ist, die RCARs ABI1 nicht inhibieren können, wodurch SnRK2.4 inaktiv gehalten wird und das Wachstum der Nichtexpression von RCARs entspricht. Das Wachstum wird entsprechend reguliert und kann bei dem Erreichen der für die RCAR-Aktivität benötigten ABA Konzentration keinen detektierbaren Einfluss auf die Änderung des Wachstumsverhaltens mehr bewirken.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass Aquaporine durch die Komponenten des ABA-Signalwegs reguliert werden können. Eine Unterteilung in besonders wichtige Komponenten kann nicht getroffen werden, da beispielsweise alle SnRK2s, manche erst nach vorheriger RAF Aktivierung, die Aktivität des Kanals steigern können (Abb. 3-1). Ebenso scheinen alle Phosphatasen die Wasserleitfähigkeit, entweder durch Inhibierung der SnRK2s oder eine Dephosphorylierung des Kanals selbst, negativ zu beeinflussen. Für die getesteten, in Hefe bereits ohne ABA aktiven RCARs, wird ebenfalls eine regulatorische Funktion hinsichtlich der PP2C-Regulation und einer

damit verbundenen erhöhten Aquaporinaktivität gezeigt, was einen Einfluss der gesamten ABA-Signalkaskade auf Aquaporine bestätigt. Vermutlich werden Aquaporine durch unterschiedliche SnRK2s in Verbindung mit verschiedenen Holorezeptorkombinationen zu spezifischen Zeitpunkten, welche dem aktuellen Wasserbedarf und dem damit verbundenen ABA-Gehalt der Pflanze entsprechen, unterschiedlich stark reguliert.



**Abbildung 3-1** Schematische Darstellung der Regulation von PIP2;1 durch den ABA-Signalweg in Hefe.

Alle bereits in Hefe aktiven SnRK2s können die Aktivität des Aquaporins stimulieren und werden weiterhin durch PP2Cs inhibiert. RCAR3 und RCAR4 konnten die inhibitorische Wirkung der Phosphatasen wieder aufheben. Nach der Aktivierung der in Hefe inaktiven SnRK2s durch RAF3 oder RAF24, konnten alle SnRK2s die Aktivität des Aquaporins, vermutlich durch die Phosphorylierung von S121 im B-loop des Proteins, steigern.



### 3.2 Analyse der Phosphorylierungsstelle von PIP2;1 durch SnRK2.4

Die Aktivität bzw. Effektivität von Wasserkanälen wird durch mehrere Eigenschaften und Modifikationen, wie Porenöffnung, subzelluläre Lokalisation, Phosphorylierung, Ionen und Protein-Protein-Interaktionen, bestimmt bzw. reguliert. Das humane AQP4 wird beispielsweise durch die Phosphorylierung von S180 im D-loop oder durch die Interaktion von Metallionen mit Cystein 178 inhibiert und durch Phosphorylierung von S111 im B-loop aktiviert (Yukutake and Yasui 2010). Durch Molekulardynamiksimulationen der humanen Aquaporine AQP5 und AQP2 konnte weiterhin die Rolle eines Histidinrests 172 bzw. 173 im Selektivitätsfilter identifiziert werden, welcher je nach Ausrichtung der Seitenketten einen offenen oder geschlossenen Kanal hervorruft (Janosi and Ceccarelli 2013, Hadidi et al. 2021). In Aquaporinen aus Pflanze bzw. Hefe konnte ein anderer Mechanismus identifiziert werden. So verschließt in Hefe der N-Terminus den Kanaleingang, indem ein Tyrosin 31 Wasserstoffbrücken mit Wassermolekülen im Inneren der Pore bildet. Durch Entfernen des N-Terminus oder des koordinierenden Tyrosinrests aber auch durch Phosphorylierung eines Serins im B-loop kommt es zu einer gesteigerten Aktivität des Kanals (Fischer et al. 2009). Auch im menschlichen AQP8 bzw. in PIP2;1 aus Spinat konnten Aminosäuren identifiziert werden, die an gleicher Stelle wie das Tyrosin 31 aus Hefe, den Kanal blockieren. Interessanterweise unterscheiden sich die Aminosäuren sowohl in der Lokalisation des Rests als auch in der Aminosäure selbst. So wird in AQP8 die Pore durch ein Tyrosin des B-loops blockiert, wohingegen in Spinat ein Leucin des D-loops diese Funktion erfüllt (Törnroth-Horsefield et al. 2010), was zeigt, dass sich der gleiche Mechanismus in drei verschiedenen Organismen mit unterschiedlicher Verwendung von Aminosäuren aus unterschiedlichen Proteindomänen zum gleichen Lösungsansatz hin entwickelt hat. Weiterhin konnte in Pflanze gezeigt werden, dass sowohl SnRK2.4 als auch SnRK2.6 zu einer gesteigerten Wasserleitfähigkeit des Kanalproteins führen können, wobei die Phosphorylierungsstelle des Aquaporins durch diese Kinasen nicht eindeutig *in planta* gezeigt werden konnte, aber S121 als vermeintliche Stelle gehandelt wird (Grondin et al. 2015, Shahzad et al. 2023).

Es scheint, dass die Öffnung des Kanals hauptsächlich einerseits durch die Blockierung der Pore über die Interaktion verschiedener Aminosäuren als auch durch die Phosphorylierung von Serinen reguliert wird.

Da massenspektrometrische Untersuchungen möglicherweise aufgrund der Erschwernis durch die Membranständigkeit des Proteins bisher *in vivo* keine Phosphorylierung spezifisch durch SnRK2 nachweisen konnten, wurden potenzielle Aminosäuren, welche als Ziel von SnRK2s dienen könnten, durch Mutation in phosphomimetische und phosphoablative Varianten auf ihre biochemischen und funktionalen Eigenschaften untersucht. Um eine Reduktion der für Aquaporine als wichtig erachteten regulatorischen Aminosäuren zu erzielen, wurde der Fokus auf Serine und Threonine als mögliche Ziele von SnRK2s gelegt.

Die verschiedenen Domänen und die darin spezifisch modifizierten Aminosäuren des Aquaporins haben unterschiedliche Funktionen hinsichtlich Lokalisierung und Aktivität des Kanals. Für die nicht bekannte Funktion der Deamidierung von Glutamin Q14 und Q19 (Maurel et al. 2015) konnte auch hier durch eine vermeintliche Imitation zu Glutaminsäure keine alleinige tragende Eigenschaft für die Funktionalität des Aquaporins oder für dessen Aktivierung durch SnRK2.4 festgestellt werden. Weiterhin zeigten sowohl die Einzelmutanten von Lysin zu Methionin und Arginin als auch die Kombination mit beiden mutierten Glutaminen und den N-terminalen phosphoablativen Mutanten keinen Effekt auf die Funktionalität von PIP2;1, was in ähnlicher Weise schon für die Mutanten von Lysin 3 gezeigt wurde (Santoni et al. 2006).

Für die im C-Terminus lokalisierten S280 und S283 wurde eine Rolle in der Lokalisation in die Plasmamembran gezeigt, da die Mutation zu S283A eine Retention des Proteins im Inneren der Zelle herbeiführt (Prak et al. 2008) und die Phosphorylierung beider Aminosäuren zu einer erhöhten Lokalisation in der Plasmamembran von Hefezellen führt (Qiu et al. 2020). In den hier gezeigten Analysen konnte durch die Verwendung der phosphoablativen Versionen S280A und S283A weder ein Einfluss auf die Aktivität des Aquaporins noch auf die Aktivierung durch SnRK2.4 festgestellt werden, weshalb diese C-terminalen Aminosäuren zumindest in Hefe vermutlich keinen Einfluss auf die Funktionalität des Proteins oder die Regulierbarkeit durch SnRK2.4 haben.

Die Analyse der vermeintlich sehr wichtigen Aminosäure S121 (Grondin et al. 2015) gestaltete sich als schwierig, da in heterologen Systemen die Mutation zu Alanin oder Asparaginsäure zu einem nicht aktiven Aquaporin führt (Bellati et al. 2016). Dies wurde auch durch die hier durchgeführten Analysen bestätigt und weiterhin auch zusätzliche Mutationen identifiziert, wie Cystein und Tyrosin, die das Aquaporin inaktivieren. Einzig

die Mutation zu Threonin scheint die Effektivität des Kanals nur abzuschwächen und dieser kann weiterhin durch die Serin-/Threoninkinase SnRK2.4 aktiviert werden.

Über Molekulardynamiksimulationen von PIP2;1 aus Spinat wurde eine essentielle Funktion des D-loops, welcher den Wasserfluss durch die Pore blockiert und als eine Art Deckel fungiert, gezeigt (Törnroth-Horsefield et al. 2006). Weiterhin wird eine starke Interaktion des D-loops mit dem C-Terminus vermutet, da eine Mutation von S115 und S274 (S121 und S280 in A.t.) zur phosphomimetischen Version, zu einer Aufhebung der Blockade der Pore durch den D-loop, durch dessen Dislokation führt und damit eine Vergrößerung des Durchmessers der Pore und ein dadurch aktiver Kanal erreicht wird (Törnroth-Horsefield et al. 2006). Eine Dephosphorylierung der beiden Aminosäuren führt hingegen zu einer Schließung des Kanals (Johansson et al. 1998).

Weiterhin wird die Wichtigkeit eines Kations, Cadmium ( $\text{Cd}^{2+}$ ), in den Simulationen gezeigt, welches *in vivo* vermutlich durch Calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) ersetzt ist und die Position des D-loops verstärkt, was den inaktiven Status des Kanals festigt. Als, für die Koordination des Kations wichtige Aminosäure, wurde E31 identifiziert, welches eine spezifische Interaktion von  $\text{Ca}^{2+}$  in Kombination mit phosphoryliertem S115 zeigt, was zur Aufhebung der Blockade der Pore durch den D-loop und damit einer Öffnung des Kanals führt.

In einer später veröffentlichten Studie der gleichen Arbeitsgruppe wird die Doppelmutante von S115 und S274 hinsichtlich Kristallstruktur und Wassertransport in Oozyten analysiert, wobei in beiden Experimenten keine Steigerung der Aktivität festgestellt werden konnte (Nyblom et al. 2009). Dies konnte jedoch durch die S188E-Mutante gezeigt werden und weiterhin die Rolle und Interaktion von S115 mit  $\text{Ca}^{2+}$  bestätigt werden.

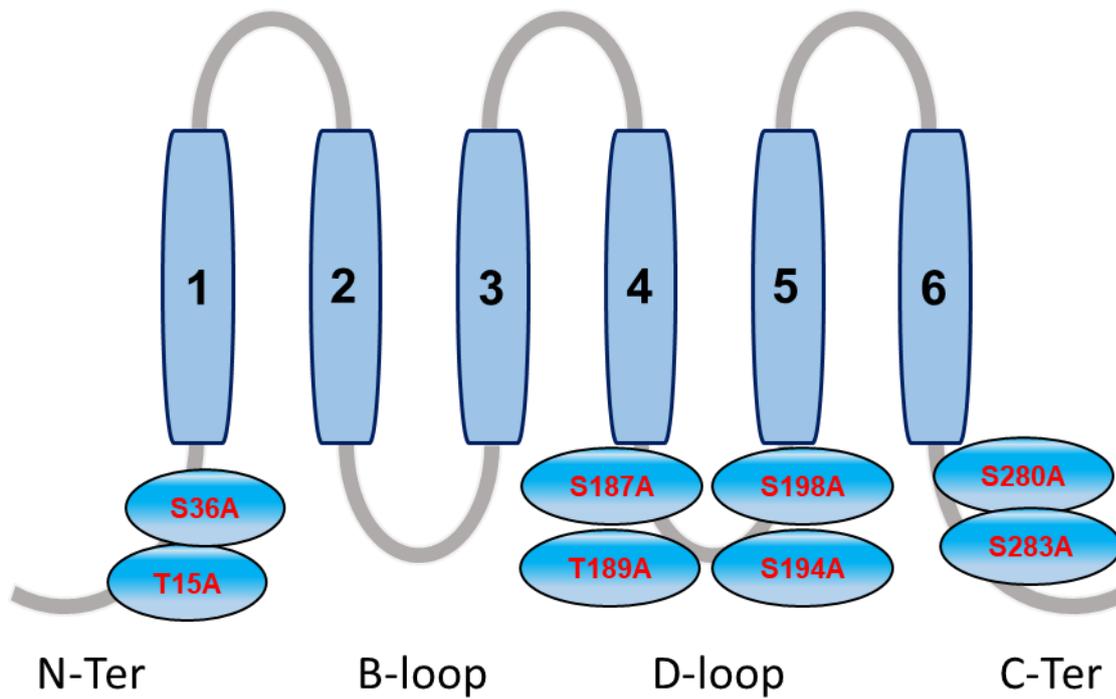
Durch die beschriebenen positiven Eigenschaften der phosphomimetischen Version auf die Aktivität des Kanals wurde diese Aminosäure in Verbindung mit anderen mutierten Aminosäuren des D-loops genauer analysiert. Hier kann in Hefe für die entsprechende Aminosäure aus Arabidopsis kein Unterschied zum wildtypischen Aquaporin festgestellt werden, wobei grundsätzlich die Phosphorylierung einer Aminosäure nicht komplett durch die Substitution zu Asparaginsäure oder Glutamin imitiert werden kann, was durch die Ladungsdifferenzen und Größenunterschiede von

Phosphatgruppe zu Aminosäure begründet wird, welche zu lokalen Veränderung des elektrischen Feldes und zu Störungen der Wasserstoffbrücken führen (Connell-Crowley et al., 1993; Eli S Groban et al., 2006).

Eine andere Aminosäure, T189, zeigte zum ersten Mal in den hier durchgeführten Analysen verschiedene Ergebnisse für die phosphomimetische und phosphoablative Version. Während T189D dem Wildtyp entsprach, führte die T189A Mutation zu einem nicht aktiven Aquaporin. Die Inaktivität dieser Mutante konnte letztendlich durch die Mutation eines benachbarten Serins 198 zu Alanin wiederhergestellt werden.

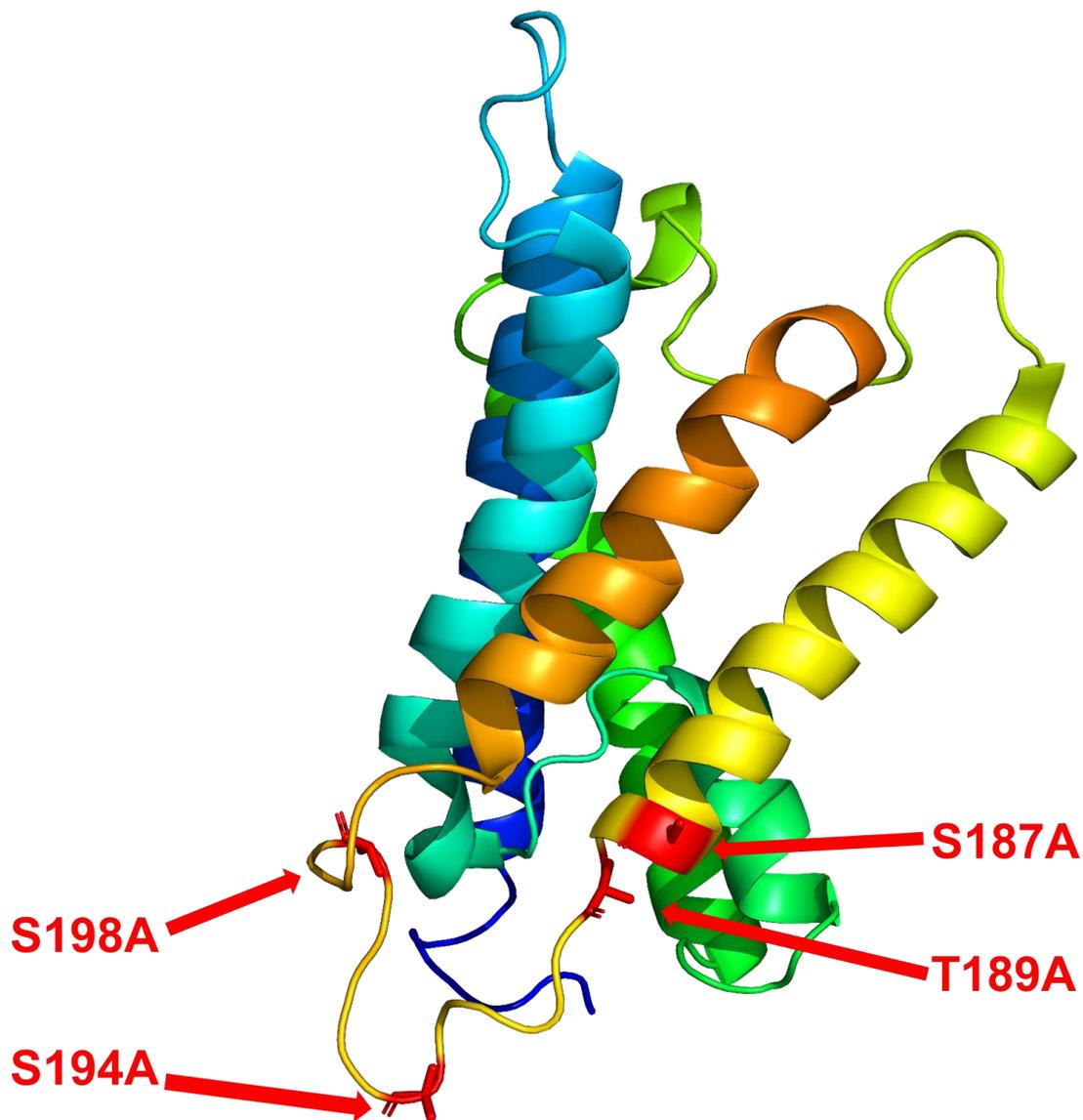
Die Mutation des polaren Threonin zum unpolaren Alanin, welches strukturell ähnlich ist und sich hauptsächlich durch das Wegfallen einer Hydroxylgruppe von Threonin unterscheidet, führt zu einem drastischen Effekt, wodurch der Wasserkanal nicht mehr funktional ist. Durch die Änderung der Größe und wahrscheinlich vor allem durch die Polarität der ersetzten Aminosäure können Wasserstoffbrückenbindungen schwieriger eingegangen werden, was zur Destabilisation des Kanals zu führen scheint und diesen impermeabel macht. Eine Zerstörung des Proteins durch diese Mutation scheint unwahrscheinlich, da die Einführung einer weiteren Mutation, S198A, den negativen Effekt wieder aufheben kann. Ob eine direkte Interaktion von S198A mit T189A durch elektrostatische Wechselwirkungen vorliegt oder die Mutante zur Stabilisierung anderer Aminosäuren führt, welche für die Funktionalität des Kanals von Bedeutung sind, konnte hier nicht gezeigt werden. Auch welche möglichen Aminosäuren der verschiedenen Domänen beteiligt sein könnten, ist aufgrund der Neuentdeckung der möglichen Interaktion dieser Stellen unklar.

Die 8-fach Mutante (T15A, S36A, S187A, T189A, S194A, S198A, S280A, S283A) mit den meisten hier getesteten, zum nicht phosphorylierbaren Alanin mutierten Serinen und Threoninen von PIP<sub>2</sub>;1, zeigte immer noch eine ähnliche Aktivität wie der Wildtyp, welche weiterhin durch SnRK2.4 gesteigert werden konnte, woraus gefolgert wird, dass diese Aminosäuren keine essentielle Funktion für die Aktivität des Aquaporins, sowie dessen Aktivierung durch SnRK2.4 in Hefe haben und dadurch als potentielle phosphorylierbare Ziele von SnRK2.4 ausgeschlossen werden können (Abb. 3-2).



**Abbildung 3-2 Schematische Darstellung der eingeführten Mutationen des Aquaporins PIP2;1.**

Dargestellt sind die sechs Transmembrandomänen mit fünf verbindenden Loops des Membranproteins. Die acht simultanen phosphoablative Mutationen, die in Hefe weiterhin zu einem funktionalen Aquaporin führen, sind rot markiert.

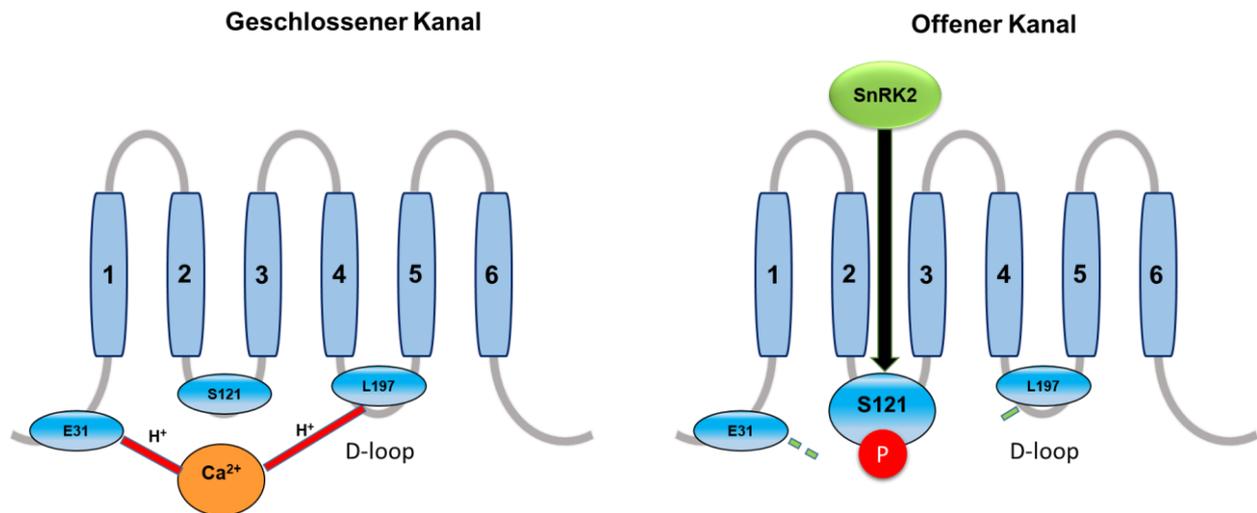


**Abbildung 3-3 Schematische Darstellung der Kristallstruktur von *SoPIP2;1*.**

Die im D-loop befindlichen Aminosäuren, welche zu Alanin mutiert wurden, sind entsprechend der Nummerierung aus Arabidopsis rot markiert. Die Abbildung wurde mittels PyMOL auf Basis des PDB Eintrags 2B5F erstellt.

Weiterhin kann eine entscheidende Rolle der Phosphorylierung der an der Koordination des für die Aktivität des Kanals wichtigen  $\text{Ca}^{2+}$  beteiligten Aminosäuren, durch die Interaktion von E31 mit den phosphoablative Mutanten des D-loops und C-Terminus, nicht gezeigt werden, da diese Mutanten weiterhin funktional und aktivierbar sind. Vermutlich bedarf es der zusätzlichen Phosphorylierung von S121 um die Koordination des Ions zu stören und eine Dislokation des D-loops zu bewirken, was

einen konstitutiv aktiven Kanal generiert aber, wie vorher beschrieben, in Hefe nicht analysierbar ist (Abb. 3-4). Ein additiver Effekt von Mutationen, die zur Steigerung der Aktivität des Kanals führen, scheint *in vivo* das Öffnen bzw. Schließen des Kanals zu regulieren.

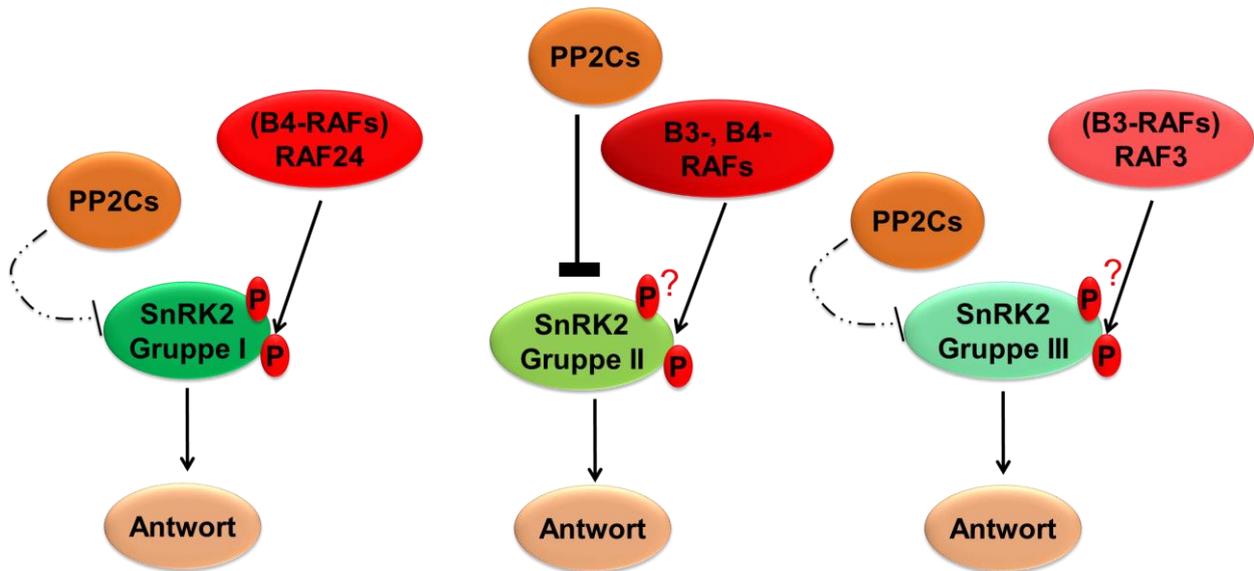


**Abbildung 3-4 Darstellung eines möglichen Schließmechanismus von PIP2;1**

In der geschlossenen Form wird der D-loop des Proteins mit dem blockierenden L197 in der Mitte des Kanals über E31 und dessen Wechselwirkungen mit einem Calciumion (Ca<sup>2+</sup>) verankert (links). Durch die Phosphorylierung von S121 im B-loop durch eine SnRK2-Kinase kommt es zur Aufhebung der Wasserstoffbrücken (H<sup>+</sup>) zwischen dem Serin und dem koordinierenden E31, wodurch die Verankerung des D-loops aufgehoben wird und der Kanal aktiv wird.

### 3.3 Einfluss von RAFs auf den ABA-Signalweg

Durch die Erkenntnisse der letzten Jahre, die einzelne RAF-Kinasen als Teil der ABA-Antwort und als Aktivator von SnRK2s, insbesondere nach deren Inaktivierung durch PP2Cs identifizierten (Lin et al. 2020, Takahashi et al. 2020, Lin et al. 2021), wurde in dieser Studie die Aktivität der *B2- B3- und B4-RAF-like kinases* in einem quantitativen Assay zur Aktivierung von SnRK2-Kinasen getestet. 13 von 18 getesteten Mitgliedern der *RAF-like kinases* waren einerseits in der Lage die in Hefe inaktiven SnRK2s zu aktivieren, zeigten aber auch eine spezifische Funktion von RAF3 bzw. RAF24 auf die verschiedenen SnRK2-Untergruppen. So konnte RAF3 eine Inhibierung der Kinasen durch PP2Cs für SnRK2s der Untergruppe III und RAF24 für SnRK2s der Untergruppe I verhindern (Abb. 3-5).



**Abbildung 3-5 Schematische Darstellung der Wirkungsweise der verschiedenen RAFs auf die Untergruppen von SnRK2s**

Die Phosphorylierung von RAF3 auf SnRK2s der Untergruppe III führt dazu, dass diese nicht mehr durch PP2Cs inhibiert werden können. Das Gleiche ist für RAF24 und die Untergruppe I der Fall. Beide RAF-Gruppen können SnRK2s der Untergruppe II aktivieren, welche dann durch PP2Cs und den ABA-Signalweg regulierbar sind.

Eine Aktivierung spezifischer SnRK2s durch bestimmte RAF-Untergruppen wurde bereits gezeigt. Speziell für RAF3 wurde einerseits eine starke Aktivierung der Untergruppe III Kinasen SnRK2.2 und SnRK2.3 detektiert (Takahashi et al. 2020) und andererseits konnte die Kinaseaktivität von SnRK2.4 durch RAF24 nicht gesteigert werden, was im Einklang mit den hier gezeigten Hefeassays ist. Weiterhin wurde die schwache Autophosphorylierungsaktivität von SnRK2.4 nach dessen Dephosphorylierung durch RAF24 deutlich induziert (Lin et al. 2020), wobei in Hefe die Koexpression von RAF24 zu gar keiner Inhibierung durch PP2Cs mehr führt. Die Kinasedomänen der B3-RAFTs, RAF5 und RAF6, konnten die Phosphorylierung von SnRK2.6 nach dessen Dephosphorylierung durch ABI1 induzieren, nicht aber RAF24 und RAF40, wobei ebenfalls in weiterführenden Hefeanalysen die Interaktion von B2- und B3-RAFTs mit SnRK2.6, jedoch nicht mit SnRK2.4, detektiert werden konnte (Lin et al. 2020), wobei diese RAFs in dieser Studie auch keinen Effekt auf SnRK2.4 zu haben scheinen. Das hier getestete B3-RAF, RAF3, konnte wiederum in Hefe SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6 so beeinflussen, dass diese nicht mehr durch ABI1 inhibiert werden konnten. Interessanterweise führte die RAF24-Koexpression für SnRK2.6 zu einer erhöhten ABA-Sensitivität, im Gegensatz zu dem publizierten, nicht



vorhandenen Effekt von RAF24 auf SnRK2.6. Die publizierten Ergebnisse der Reaktivierung von SnRK2.6 (Untergruppe III) durch B3-RAFTs werden im hier verwendeten Assay vermutlich durch eine nicht mehr vorhandene Inhibierbarkeit dargestellt, da alle Proteine in der Hefe permanent synthetisiert werden und somit der PP2C-Effekt dem RAF3-Effekt unterliegt. Weiterhin wird dieser beobachtete Effekt durch ein B4-RAF, nämlich RAF24, auf SnRK2.4 der Untergruppe I erweitert. Der Mechanismus der Reaktivierung von SnRK2s durch RAFTs basiert vermutlich auf der Phosphorylierung eines spezifischen Serins, 171 für SnRK2.6, im *activation loop* des Proteins, welches nicht durch dessen Autophosphorylierungsaktivität phosphoryliert wird (Lin et al. 2020, Takahashi et al. 2020, Lin et al. 2021). Interessanterweise dephosphorylieren PP2Cs SnRK2.6 an der typischen Dephosphorylierungsstelle S175, wobei bei den durch RAF aktivierten SnRK2s diese Modifikation vermutlich keinen Effekt mehr hat und somit eine Inhibierung durch PP2Cs umgangen wird (Soon et al. 2012).

Eine Unterteilung der verschiedenen RAF-Untergruppen und deren spezifische Wirkung auf verschiedene SnRK2-Untergruppen scheint dadurch wahrscheinlich und wurde durch die präferentielle Phosphorylierung von ABA-unabhängig wirkenden SnRK2s durch B4-RAFTs bzw. der ABA-abhängigen SnRK2s durch B2- und B3- RAFTs weiter gefestigt (Lin et al. 2020). Weiterhin scheinen die unterschiedlichen Gruppen unterschiedliche Serine von SnRK2.6 zu bevorzugen, so wird S171 hauptsächlich durch B2-RAFTs und S175 überwiegend durch B3-RAFTs phosphoryliert, wobei beide Gruppen teilweise redundante Funktionen in der Aktivierung von SnRK2s zeigen, aber auch teils unterschiedliche Wirkungen auf ABA-abhängige zelluläre Prozesse (Lin et al. 2021).

Die Aktivierung von SnRK2s durch Mitglieder der RAF B2-, B3- und B4-Familie zeigte, für 13 der 18 getesteten Proteine, eine Aktivierung von, in Hefe inaktiven SnRK2s. Die fünf RAFTs, für die keine Induktion der SnRK2s detektierbar war, könnten allerdings spezifisch nur einzelne SnRK2s aktivieren, welche nicht unter den hier getesteten SnRK2.2 und SnRK2.7 waren, oder es bedarf einer Aktivierung dieser RAFTs durch *upstream* liegende Signalkomponenten, wie z.B. ETR1, um deren regulatorische Funktion ausüben zu können. Die Kinasedomänen von RAF8 und RAF9 zeigten keine Kinaseaktivität *in vitro*, was zumindest für RAF9 mit den hier gezeigten Ergebnissen im Einklang ist und weiterhin wurden für RAF12 niedrige Aktivitäten in Protoplasten

detektiert (Lin et al. 2021). Eine Aktivierung von RAF5 erfolgt unter Wassermangel, wobei die Voraussetzungen für diese Stressbedingung möglicherweise in Hefe nicht gegeben ist und dadurch die Inaktivität im hier getesteten System begründet werden kann (Soma et al. 2023).

Die wahrscheinlich bemerkenswerteste Erkenntnis der vorliegenden Studie ist die unterschiedliche Regulation von SnRK2s der Untergruppe III durch RAF3 bzw. die Regulation von SnRK2s der Untergruppe I durch RAF24 in Kombination mit PP2Cs. So zeigten, die durch RAF3 aktivierten SnRK2s der Untergruppe III, SnRK2.2, SnRK2.3 und SnRK2.6 sowie SnRK2.8, keine Inhibierung mehr durch HAB1, was auch im vollständigen Signalweg mit RCAR12 und Titration von ABA erkennbar war. Die in Hefe durch RAF3 aktivierten SnRK2s, SnRK2.7 und SnRK2.9 konnten hingegen durch den Holorezeptorkomplex ABA-abhängig reguliert werden.

Ein ähnliches, wenn auch gegenteiliges Ergebnis konnte für RAF24 festgestellt werden. So wird SnRK2.4 der Untergruppe I nach vorheriger RAF24-Aktivierung nicht mehr durch den ABA-Signalweg reguliert. SnRK2.7 und SnRK2.8 werden ebenfalls durch RAF3 in Hefe aktiviert und können durch die Signalkaskade reguliert werden. Für SnRK2.6 konnte eine gesteigerte Kinaseaktivität und eine erhöhte Sensitivität des Komplexes gegenüber ABA, verglichen ohne RAF24, festgestellt werden.

Die beiden RAF-Kinasen scheinen unterschiedliche Effekte auf die verschiedenen Untergruppen von SnRK2s zu haben. Hier konnte stichprobenartig gezeigt werden, dass für SnRK2.4 der Untergruppe I durch RAF24 keine Inhibierung der Kinaseaktivität mehr stattfinden kann, was im Gegensatz zu den nicht mehr inhibierbaren SnRK2s der Untergruppe III durch RAF3-Aktivierung steht. Dies ist im Einklang mit früheren Studien, bei denen RAF3 eine starke Aktivierung von SnRK2.2 und SnRK2.3 zeigte und RAF24 keine weitere Aktivierung von SnRK2.4, was hier weiter durch einen Verlust der Inhibierbarkeit durch PP2Cs ergänzt wird (Lin et al. 2020, Takahashi et al. 2020). Ein direkter Effekt von RAFs auf SnRK2s und nicht auf PP2Cs scheint wahrscheinlich, da erstens eine Interaktion und Phosphorylierung von SnRK2s durch RAFs bereits gezeigt wurde und weiterhin im verwendeten Assay, die PP2Cs ihre inhibierende Wirkung auf andere SnRK2s noch entfalten können.

Um die hier beschriebene Wirkung der beiden RAFs auf die verschiedenen Untergruppen an SnRK2s zu bestätigen, ist ein Test aller SnRK2s mit den jeweiligen RAFs nötig.

### 3.4 Potential von ABA-Analoga

Die Analyse von ABA-Analoga, die im Idealfall chemisch stabiler und effektiver als das natürliche Phytohormon sind, hat das Potential die Wassernutzeffizienz von Nutzpflanzen auf molekularer Ebene zu modifizieren. Die Fortschritte in der Strukturbiologie führten zur Synthese von ABA-Agonisten, bei denen Cyclohexanon durch eine Cyanocyclopropylgruppe ersetzt wurde, was zu einer starken Aktivität dieser Substanzen *in vitro und in vivo* führte (Frackenpohl et al. 2018). Die in dieser Arbeit analysierten Substanzen zeigten in den Hefeanalysen für drei Proben, CCP1, CCP2 und CCP3, einen ähnlich oder sogar leicht stärkeren Effekt als ABA. Die CCPs wurden vor ihrer Analyse mit Esterase aus der Schweineleber behandelt, um die Veresterung der Carboxylgruppe dieser Substanzen aufzuheben, welche normalerweise wichtig für die Koordination des Liganden in die Bindetasche ist (Santiago et al. 2009). Eine Funktionalität konnte somit nur für CCP3 generiert werden, da CCP1 und CCP2 bereits ohne Esterase aktiv waren.

Nach der Verseifung konnten in *in vitro*-Analysen bis auf CCP7, CCP8 und CCP9 alle CCPs teilweise ähnliche starke Effekte wie ABA im Holorezeptorkomplex mit RCAR11 ausüben, was für die veresterten Substanzen nicht der Fall war (Roeder et al. 2023), wobei erwähnt werden muss, dass die Substanzen nicht vollständig umgesetzt wurden und der Effekt der vollständig verseiften Liganden mit stabilisierender Carboxylgruppe möglicherweise noch stärker als mit ABA selbst ist.

Weiterhin zeigten die getesteten Liganden unterschiedlich starke regulatorische Eigenschaften, abhängig vom im Holokomplex verwendeten RCAR, was die Wichtigkeit und Spezifität der strukturellen Eigenschaften des Liganden in der Regulation bzw. der Interaktion von Rezeptor und Phosphatase hervorhebt.

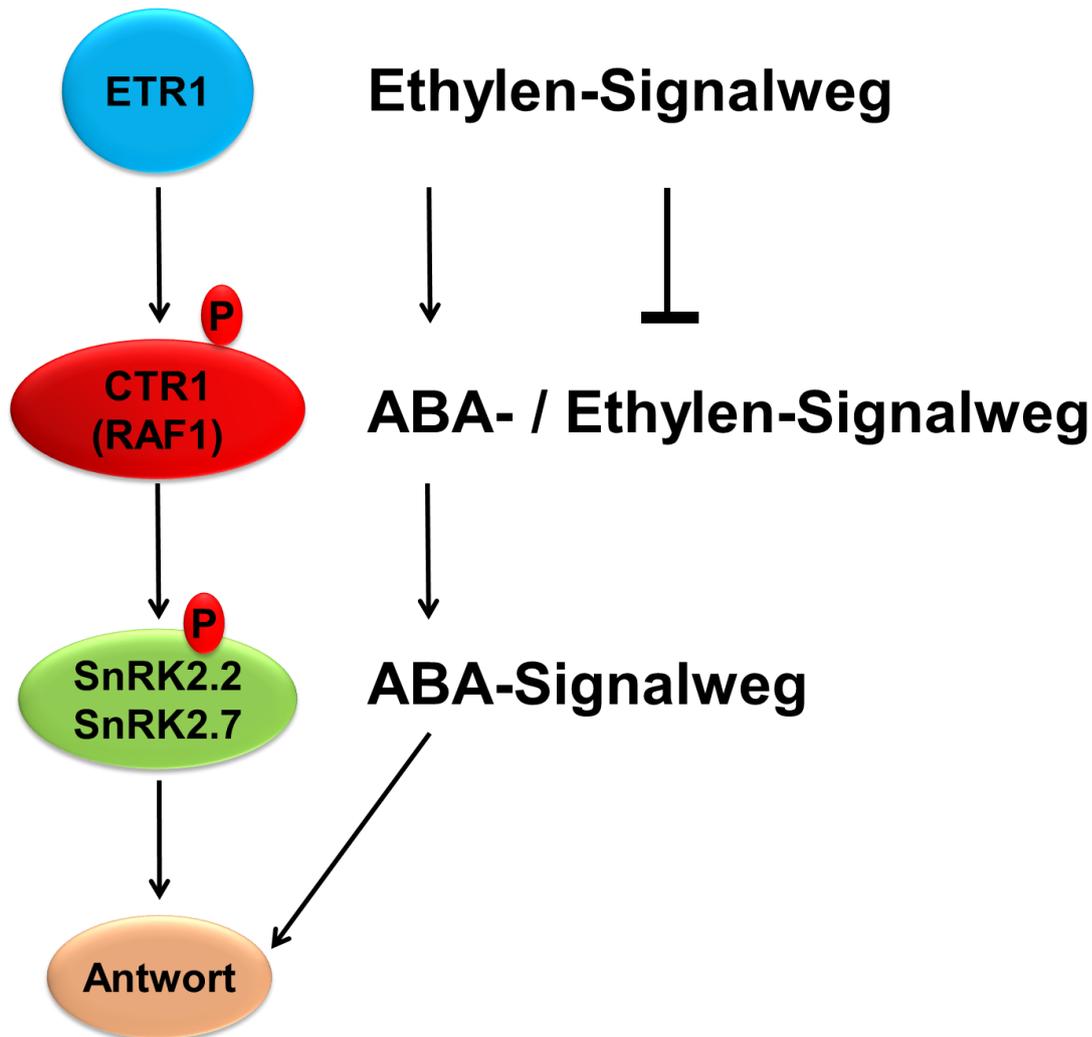
Die Funktionalität der synthetischen Liganden konnte weiterhin im pflanzlichen System bestätigt werden, wo im Vergleich zur *in vitro*-Analyse, zusätzlich CCP7 eine agonistische Wirkung zeigte. Verglichen mit dem Modellsystem der Protoplastenanalyse aus Arabidopsis, wo CCP5 die ABA-Antwort stärker als das

Phytohormon selbst induzieren konnte, zeigte diese Substanz in Versuchen in Weizen wiederum schwächere Effekte als ABA oder andere CCPs (Roeder et al. 2023).

Die Analyse von ABA-Analoga in heterologen Systemen, wie Hefe, oder in *in vitro*-Analysen, kann somit nur ein Indiz auf die molekularen Interaktionen der einzelnen Komponenten geben und im natürlichen System, mit dem Hintergrund aller Komponenten der jeweiligen Proteinfamilien, Enzymen und anderer unbekannter Faktoren, ganz andere oder veränderte Eigenschaften und Funktionen aufweisen, da selbst in *in planta*-Analysen noch Unterschiede bei der Verwendung von verschiedenen Modellpflanzen auftreten. Trotzdem ist die Erforschung der grundlegenden biochemischen und strukturellen Eigenschaften von ABA-Analoga, welche durch gezielte Manipulationen zu einem stärkeren Effekt in der ABA-Signalkaskade und dadurch zu einer für die Pflanze im besten Fall erhöhten WUE führen, von entscheidender Bedeutung.

### **3.5 Zusammenhang des ABA- und Ethylen-Signalwegs**

Die Familie der Ethylen-Rezeptoren besteht in Arabidopsis aus fünf Mitgliedern (Bleecker et al., 1998). Diese Rezeptoren bestehen aus einer Rezeptordomäne und einer Transmitterhistidinkinase, ähnlich dem bakteriellen Zweikomponentensystem (Chang et al. 1993). In der Abwesenheit von Ethylen sind die Rezeptoren aktiv und aktivieren CTR1 (Hua and Meyerowitz 1998). Wird Ethylen gebunden und CTR1 dadurch durch ETR1 inaktiviert, kann es das Membranprotein EIN2 nicht mehr inhibieren und die Ethylen-Signalkaskade wird aktiviert, wobei die molekulare Funktion von EIN2 bisher ungeklärt ist (Binder 2020). Nur für ETR1 ist eine Histidinkinasefunktion beschrieben, ETR2, ERS2 und EIN4 zählen zu den Serin-/Threoninkinasen und ERS1 scheint möglicherweise beide Kinaseaktivitäten auszuüben (Moussatche and Klee 2004).



**Abbildung 3-6 Zusammenhang des ABA- und Ethylen-Signalwegs.**

Der Ethylen-Rezeptor ETR1 kann durch seine Histidinkinaseaktivität CTR1, welches auch eine Rolle im ABA-Signalweg als RAF1 spielt, phosphorylieren und aktivieren. Die so aktivierte Kinase kann folglich SnRK2-Kinasen des ABA-Signalwegs aktivieren, was eine gegenseitige Beeinflussung der beiden Signalwege hervorhebt.

Die Aktivierung verschiedener SnRK2s durch RAF1 konnte in dieser Arbeit im Hefesystem bereits gezeigt werden. Eine Koexpression von ETR1 führte nur in Kombination mit RAF1 zu einer durch SnRK2s vermittelten stärkeren Reporterinduktion, was eine direkte Interaktion von ETR1 mit RAF1 und dessen positive regulatorische Wirkung auf die Kinase bestätigt. Interessanterweise konnte ETR1 in Kombination mit RAF1 für die hier analysierten SnRK2s nur für SnRK2.2 und SnRK2.7 eine Stimulation bewirken, was durch die erhöhte Kinaseaktivität und die dadurch verbundene SnRK2-Aktivierung bedingt ist (Abb. 3-6). SnRK2.1 ist bereits ohne RAF1 in Hefe aktiv, weshalb selbst die erhöhte Kinaseaktivität von RAF1 durch

ETR1 keinen Einfluss auf die Induktion des Reporters nimmt. Die Analyse einer anderen RAF-Kinase, RAF3, in Kombination mit ETR1 führte ebenfalls zu keiner veränderten SnRK2.7-Induktion, wobei anzumerken ist, dass hier nur stichprobenartig vereinzelte Komponenten der spezifischen Proteinfamilien getestet wurden und eine spezifische Aktivierung anderer SnRK2s oder deren Aktivierung mittels anderer RAF-ETR-Kombinationen möglich ist.

Weiterhin interessant ist die inhibitorische Wirkung der anderen vier ETR-Rezeptoren auf RAF1. Alle vier Rezeptoren konnten die durch RAF1 vermittelte Induktion von SnRK2.7 um über 50% inhibieren, was im Gegensatz zu der aktivierenden Funktion von ETR1 steht. Als erster augenscheinlicher Unterschied ist hier zu nennen, dass nur ETR1 eine Histidinkinase zu sein scheint und damit möglicherweise als einziger Rezeptor eine aktivierende Funktion auf RAF1, durch die Phosphorylierung eines Histidinrests, zeigt, wobei die Histidinkinasefunktion nicht essentiell für die Regulation des Signalwegs zu sein scheint (Wang et al. 2003). Die anderen vier Rezeptoren zeigten hingegen keine Histidinkinase- sondern Serin-/Threoninkinaseaktivität, was vermuten lässt, dass diese eine regulatorische Aminosäure von RAF1 phosphorylieren könnten, welche die Aktivität der Kinase reduziert. Eine Unterteilung der funktionalen Eigenschaften von ETR1, verglichen mit den anderen vier Rezeptoren, konnte bereits bei der Ethylen-abhängigen Antwort der Krümmung des Hypocotyls beobachtet werden. ETR1 zeigte hier eine positive regulatorische Funktion, wohingegen die anderen Rezeptoren diese Antwort inhibierten (Brad M. Binder et al. 2006). Hierdurch scheint eine Sonderfunktion von ETR1 im Gegensatz zu den anderen Rezeptoren durchaus wahrscheinlich.

Eine Veränderung der regulatorischen Eigenschaften der Rezeptoren durch Zugabe von Ethefon sollte für ETR1 zu einer Verringerung der RAF1-Induktion führen, durch die Inhibierung der positiv wirkenden Kinaseaktivität, was nicht beobachtet werden konnte. Begründbar ist dies unter anderem dadurch, dass Ethefon nicht in ausreichender Konzentration im Medium vorhanden war und daher nicht ausgereicht hat, um den Rezeptor zu stimulieren, da Hefen allgemein eine schlechte Aufnahmerate von z.B. ABA von nur 10% nach 14 h zeigen (Ruschhaupt et al. 2019). Weiterhin möglich wäre eine nicht korrekte Lokalisation des Rezeptors, der dennoch in der Lage ist mit RAF1 zu interagieren und dessen Aktivität stimulieren, aber nicht an das verfügbare Ethefon binden kann. Es besteht weiterhin die Möglichkeit, dass in der

Pflanze weitere Faktoren notwendig sind, die in der Hefezelle nicht vorhanden oder nicht gegeben sind.

Um zu überprüfen ob der stimulierende Effekt von ETR1 auch durch andere Histidinkinasen hervorgerufen werden kann, wurden drei weitere allgemeine Histidinkinasen aus *Arabidopsis* getestet, welche nicht am ETR-Signalweg beteiligt sind, wobei keine der getesteten Kinasen einen Effekt wie ETR1 hervorrufen konnte. Dies deutet auf eine spezifische Regulation von ETR1 auf RAF1, was nicht durch die hier getesteten allgemeinen Histidinkinasen übernommen werden kann, und damit auf eine direkte Interaktion des ABA- und Ethylen-Signalwegs hin.

Über einen molekularen Zusammenhang der beiden Hormonsignalwege wurde schon oft spekuliert und diskutiert. Die Vermutung, dass ETR1 aufgrund seiner strukturellen und biochemischen Eigenschaften sowie seiner Histidinkinaseaktivität einen Einfluss auf andere Signalwege und dessen Komponenten haben kann, wurde bereits vor 25 Jahren erwähnt (Gamble et al. 1998). Mittlerweile wurden verschiedene Überschneidungen der beiden Signalwege gezeigt, teils mit unabhängigen aber auch komplementären oder gegensätzlichen Ergebnissen der beiden Phytohormone, was unter anderem abhängig vom untersuchten Pflanzenorgan war (Kende et al. 1998, Beaudoin et al. 2000, Anderson et al. 2004, Tanaka et al. 2005, Abeles et al. 2012). So wurde gezeigt, dass Ethylen teilweise einen Einfluss auf die durch ABA ausgelösten Stressantworten in *Arabidopsis* ausübt. Folglich zeigten Mutanten, die nicht auf Ethylen reagierten auch eine veränderte Reaktion auf ABA, was ein Zusammenspiel der beiden Phytohormone und eine gegenseitige Hoch- bzw. Runterregulation im Hinblick auf verschiedene Stressantworten impliziert. Weiterhin ist bekannt, dass Ethylen den ABA-Signalweg negativ regulieren kann, was jedoch in der Abwesenheit von Ethylen auch zu positiven regulatorischen Wirkungen führen kann (Ghassemian et al. 2000). Werden Pflanzen niedrigen Konzentrationen an ABA oder Ethylen ausgesetzt, kann es beispielsweise für das Wurzelwachstum für beide Phytohormone auch zu einem ähnlichen Phänotyp kommen. Bei höheren Konzentrationen wirkt ABA hingegen antagonistisch, weshalb davon ausgegangen werden kann, dass beide Hormone sich gegenseitig beeinflussen und teilweise auf die gleichen Proteine in der Pflanze abzielen (Ghassemian et al. 2000, Luo et al. 2014).

Ethylen kann weiterhin, ähnlich wie Gibberelinsäure, die ABA-Empfänglichkeit im Hinblick auf die Keimung verringern (Beaudoin et al. 2000). Interessanterweise wurde

gezeigt, dass die Rezeptordomäne von ETR1 an der Induktion von Komponenten des ABA-Signalwegs beteiligt ist (Arkadipta Bakshi et al. 2018).

Im Moos *Physcomitrella* konnte eine direkte Interaktion von CTR1 und den Ethylen-Rezeptoren gezeigt werden, ebenso wie eine Funktion im ABA-Signalweg durch die direkte Interaktion von CTR1 mit SnRK2 (Yasumura et al. 2015, Toriyama et al. 2022). Eine Funktion von ETR1 im Ethylen- als auch im ABA-Signalweg scheint durch dessen Regulation von CTR1/RAF1, welches sowohl regulatorische Eigenschaften auf *downstream targets* der beiden Signalwege, wie EIN2 oder SnRK2s, ausübt und der Tatsache, dass dies in Moosen bereits nachgewiesen wurde, sehr wahrscheinlich.



## 4 Material und Methoden

### 4.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien von Carl Roth GmbH & Co. KG (München, Deutschland), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (München, Deutschland) und Merck (Grafing, Deutschland) bezogen. Für molekularbiologische Untersuchungen wurden Kits der Firma Macherey-Nagel GmbH & Co. KG (Düren, Deutschland) verwendet.

### 4.2 Geräte

Tabelle 4-1 Geräteliste

Gerät	Modell	Hersteller
Blot-Kammer	Trans Blot Semi Dry	Bio Rad
Chemilumineszenz Kamera	Image Quant LAS 4000 mini	GE Healthcare
Elektrophorese	EPS200	Pharmacia Biotech
Feinwaage	AC210S	Sartorius
Gelelektrophorese	E844	Consort
Heizblock	Thermomixer comfort	Eppendorf
Inkubator	Thermoshake/Laboshake	Gerhardt
Konfokales Lasermikroskop	Fluoview 3000	Olympus
Kugelmühle	TissueLyser II	Qiagen
Luminometer	Plate Chameleon	Hidex
Magnetrührer	SB 161	Bibby stuart
Mehrkanalpipette	Transferpipette S-12	Brand
Microplate Reader	Synergy 2	BioTek
Mikrowelle	MC-9287	LG
Mini Zentrifuge	Color sprout plus	Biozym
Nanophotometer	Pearl	Implen
PAGE-Laufkammer	Mini Protean Tetra System	Bio Rad
PCR-Cycler	T-Gradient	Biometra

Photometer	Ultrospec 2000	Pharmacia Biotech
pH-Meter	pH 526	WTW
Sterilbank	Microflow Laminar Flow Work Station	Nunc
Stopped-Flow- Spektrophotometer	SFM-3000	BioLogic
Swing out Zentrifuge	Rotina 420R	Hettich Zentrifugen
Vakuumpumpe	Membran-VP	Vacuubrand
Vortexer	MS1	IKA
Zentrifuge	Avanti J-25	Beckmann Coulter
	Typ 5242	Eppendorf
	Typ5415R	Eppendorf

#### 4.3 Software und Datenbanken

Für die *in silico* Analysen und Auswertungen wurden folgende Programme verwendet:

##### TAIR

<https://www.arabidopsis.org>

Datenbank für Arabidopsis DNA-Sequenzen

##### Araport

<https://www.araport.org>

Datenbank für Arabidopsis DNA-Sequenzen

##### Uniprot

<http://www.uniprot.org>

Datenbank für Proteinsequenzen

##### PDB

<http://www.rcsb.org/pdb>

Datenbank für Kristallstrukturen von Proteinen

### **pyMOL v1.1**

<https://www.pymol.org>

Darstellung von Proteinstrukturen

### **Origin2020**

<http://www.originlab.com>

Statistische Auswertung und Kurvenanpassung

### **Microsoft Office2016**

Erstellen von Texten, Tabellen, Grafiken und Präsentationen

### **Citavi6**

<https://www.citavi.com/de>

Literaturverwaltung und Wissensorganisation

### **Gentle**

<http://gentle.magnusmanske.de/>

*In silico* Klonierung und Erstellung von Vektorkarten

### **Adobe Photoshop Elements 12**

<https://www.adobe.com/de/products/photoshop-elements.html>

Erstellung und Bearbeitung von Bildcollagen

### **Enzyme**

Die verwendeten Enzyme wurden von ThermoFisher Scientific (München, Deutschland), New England BioLabs GmbH (Erlangen, Deutschland) und Promega GmbH (Mannheim, Deutschland) bezogen.

### **Plasmide und Vektoren**

Die in dieser Arbeit verwendeten Vektoren basieren auf dem Golden Gate System von Chiasson et. al (Chiasson et al. 2019).

Die cDNAs der analysierten Gene wurden in den LI Vektor (LI\_Bpi) kloniert und durch Sequenzierung der Plasmide überprüft.

Grundsätzlich wurden für Hefekonstrukte die SnRK2-Kinasen in den (LII) pYEAST\_LII\_2-3\_CEN\_TRP kloniert, unter der Kontrolle des GAL1-Promotors, zur Galaktose-induzierten Expression. Aquaporine und ABF2 wurden unter dem ADH-Promotor in (LII) pYEAST\_LII\_2-3\_CEN\_HIS kloniert. PP2Cs und RAFs wurden unter konstitutiver Expression des TDH3-Promotors in (LII) pYEAST\_LII\_2-3\_CEN\_LEU exprimiert und RCARs im (LII) pYEAST\_LII\_2-3\_CEN\_URA. Die Expression des N-terminalen meGFP-Tags erfolgte durch den TDH3-Promotor. Alle Hefekonstrukte wurden durch den TDH1-Terminator in Hefe terminiert.

Für die Klonierung der Protoplastenkonstrukte wurde der LII Vektor LIIc\_F\_1-2 verwendet und die jeweiligen Gene durch den viralen 35S-Promotor exprimiert und durch den NOS-Terminator terminiert.

#### 4.4 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von MWG Eurofins (Ebersberg, Deutschland) synthetisiert. Vor der Verwendung wurden die Oligonukleotide mit sterilem Wasser auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt. Die Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide erfolgt im Anhang.

#### 4.5 Verwendete Organismen

Tabelle 4-2 Verwendete Organismen

Stamm	Organismus	Genotyp	Referenz
DH5α	<i>E. coli</i>	F– endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG purB20 φ80dlacZΔM15 Δ(lacZYA-argF)U169, hsdR17(rK–mK+), λ–	Invitrogen
TOP10	<i>E. coli</i>	F- mcrA Δ(mrr-hsdRMS- mcrBC) φ80lacZΔM15 ΔlacX74 nupG recA1 araD139 Δ(ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ-	Thermo Fischer Scientific

XL1Blue	<i>E. coli</i>	endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F' ::Tn10 proAB+ lacIq $\Delta$ (lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)	Stratogene
BMA64-1A	<i>S. cerevisiae</i>	MATa; ura3-1; trp1 $\Delta$ 2; leu2- 3,112; his3-11,15; ade2-1; can1-100	<a href="http://www.euroscarf.de">http://www.euroscarf.de</a>
pSAR- Reporterhefe (BMA64-1A)	<i>S. cerevisiae</i>	MATa; ura3-1; trp1 $\Delta$ 2; leu2- 3,112; his3-11,15; ade2-1; can1-100; lys2::pSAR:LUC:tNOS	Ruschhaupt et. al, 2019
	<i>A. thaliana</i>	Col-0	abrc.osu.edu
	<i>A. thaliana</i>	<i>aba2-1</i>	arabidopsis.info

#### 4.6 Kultivierung von Mikroorganismen und Pflanzen

Die verwendeten Mikroorganismen wurden sowohl in Flüssig- als auch auf Festmedium angezogen. Die nachfolgend beschriebenen Medien wurden mit Milli-Q Wasser aufgefüllt und autoklaviert. Das zur Aufzucht verwendete Medium und die zur Selektion verwendeten Platten wurden durch die Zugabe von 15 g/L Agar, sowie entsprechender Antibiotika, bzw. Aminosäuren in das Medium präpariert und gegossen.

##### 4.6.1 Kultivierung von *E. coli*

Die Anzucht und Selektion von *Escherichia coli* erfolgte entsprechend der Plasmideigenschaften in LB-Medium bei 37 °C und 200 rpm für die Flüssigkulturen, bzw. auf LB-Platten.

LB-Medium	[g/L]
Hefeextrakt	5
Pepton	10
NaCl	10

Tabelle 4-3 Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Konzentration [ $\mu\text{l/ml}$ ]	Stammlösung [mg/ml]
Ampicillin	100	100, in sterilem mQ H <sub>2</sub> O
Gentamycin	25	25, in sterilem mQ H <sub>2</sub> O
Kanamycin	50	50, in sterilem mQ H <sub>2</sub> O
Spectinomycin	50	50, in sterilem mQ H <sub>2</sub> O

#### 4.6.2 Kultivierung von *S. cerevisiae*

Die Kultivierung von *S. cerevisiae* erfolgte entsprechend der Plasmid Eigenschaften in selektivem SD-Medium bei 30 °C. Die Flüssigkulturen wurden bei 200 rpm inkubiert. Für das SD-Medium wurden verschiedene Zuckerquellen verwendet: Für die Transformation und Anzucht Glucose, für die Induktion des Luciferasereporters Galactose.

#### SD-Medium

Makrosalze (10x, steril)	100 ml/l
Mikrosalze (1000x, steril)	1 ml/l
mQ H <sub>2</sub> O	800 ml/l
pH (KOH)	5,8

Nach dem Autoklavieren und Abkühlen des Mediums wurde Folgendes hinzugefügt:

Dropout-Lösung (10x, steril)	100 ml/l
Supplement (100x, steril)	10 ml/l
Glucose (20%)	100 ml/l

<b>1000x Mikrosalze für SD [mg/ml]</b>		<b>10x Makrosalze für SD [g/l]</b>	
Biotin	2	Kaliumhydrogenphosphat	10
Ca <sup>2+</sup> -Pantothersäure	400	Magnesiumsulfat Heptahydrat	10,24
Folsäure	20	Natriumchlorid	1
Myo-Inositol	2000	Calciumchlorid Anhydrat	1
Nicotinsäure	400	Ammoniumsulfat	50
p-Aminobenzolsäure	200		
Pyridoxinhydrochlorid	400		
Riboflavin	200		
Thiamin HCl	400		
Borsäure	500		
Kupfersulfat	40		
Kaliumiodid	100		
Eisen-II-chlorid	200		
Mangansulfat	400		
Natriummolybdän	200		
Zinksulfat	400		
<b>10x Dropout Lösung [mg/l]</b>		<b>Aminosäure Supplements [g/l]</b>	
L-Adenin Hemisulfatsalz	200	100x L-Histidin	2
L-Arginin HCl	200	100x L-Leucin	10
L-Isoleucin	300	100x L-Tryptophan	2
L-Lysin HCl	300	100x L-Uracil	2
L-Methionin	200		
L-Phenylalanin	500		

---

L-Threonin	2000
L-Tyrosin	300
L-Uracil	200
L-Valin	1500

#### 4.6.3 Kultivierung von *A. thaliana*

Für die Protoplastenanalysen wurden *A. thaliana*-Pflanzen der Ökotypen Columbia (Col-0), sowie die Mutante *aba2-1*, welche einen grundlegend niedrigen endogenen ABA-Gehalt durch eine gestörte ABA-Biosynthese aufweist, verwendet.

Die Pflanzenanzucht erfolgte in Töpfen mit einer Perlit-Einheitserdemischung (Typ7), in Phytokammern unter Langtagbedingungen von 16 h Belichtung mit  $180 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ , 22 °C und 65% Luftfeuchtigkeit und 8 h Dunkelheit mit 17 °C und 75% Luftfeuchtigkeit.

#### 4.7 Arbeiten mit DNA

##### 4.7.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Mini-Plasmidisolierung aus *E. coli* wurde das Kit *NucleoSpin Plasmid easy pure* der Firma Macherey-Nagel verwendet. Bei größeren Mengen benötigter DNA wurde das *JETSTAR Kit* der Firma Genomed (Löhne, Deutschland) benutzt. Die Reinheit und Konzentration der so präparierten Plasmide wurde am *NanoDrop* bestimmt.

##### 4.7.2 Golden-Gate-Klonierung

Für die Klonierung der in dieser Arbeit erzeugten Plasmide wurde das modulare System, basierend auf Chiasson et. al (Chiasson et al. 2019), verwendet. Hierzu wird zunächst die gewünschte cDNA in einen Anfangsvektor (LI\_Bpi) kloniert. Von diesem ausgehend, kann die CDS (*coding sequence*) in verschiedene Zielvektoren, wie z.B. für Hefe und Pflanzenexpression, kloniert werden. Dazu werden die für den jeweiligen Organismus spezifischen Komponenten, wie Promotoren, Terminatoren und Tags, sowie Resistenzen in einem modularen Prinzip im Zielvektor zusammengefügt. Dies



wird durch die bei der Klonierung verwendeten S2-Endonukleasen und deren Generation klebriger Enden erreicht. Diese Enzyme schneiden außerhalb ihrer Erkennungssequenz, wodurch eine flexible Anpassung der Schnittsequenz möglich ist. Hierzu wurden abwechselnd Bpil (LI) und Bsal (LII) verwendet, welche nach der Ligation die jeweilige Erkennungssequenz des anderen Enzyms generieren und somit für die weitere Klonierung verwendet werden können. Dazu mussten jedoch zuerst aus der CDS möglicherweise vorhandene Schnittstellen von Bpil und Bsal durch Mutagenese, unter Verwendung spezifischer Primer, substituiert werden (Binder et al. 2014).

#### 4.7.3 Cut-Ligation

Die Klonierung erfolgte mittels Cut-Ligation bei der die Restriktion und Ligation des Konstrukts im Wechsel stattfand. Dazu wurden entweder 100 ng PCR-Produkte für die LI-Klonierung oder je 100 ng der Komponenten für die LII Klonierung mit dem entsprechenden Enzym und T4-Ligase gemischt und im Thermocycler inkubiert.

**Tabelle 4-4 Ansatz Cut-Ligation**

<b>Cut-Ligation</b>	<b>LI</b>	<b>LII</b>
Zielvektor 100ng/ $\mu$ l	1 $\mu$ l	1 $\mu$ l
PCR-Produkte (100 ng/ $\mu$ l)	Je 1 $\mu$ l	
LI-Plasmide (100ng/ $\mu$ l)		6x 1 $\mu$ l
Buffer G	1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l
ATP (10 mM)	1,5 $\mu$ l	1,5 $\mu$ l
Bpil (10 u/ $\mu$ l)	0,75 $\mu$ l	
Bsal (10 u/ $\mu$ l)		0,75 $\mu$ l
T4-Ligase	0,75 $\mu$ l	0,75 $\mu$ l
mQ H <sub>2</sub> O	$\Sigma$ 15 $\mu$ L	$\Sigma$ 15 $\mu$ L

#### 4.7.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion ermöglicht die einfache und schnelle Vervielfältigung von DNA durch die Synthese, ausgehend von einem Template mit Hilfe von Primern und einer DNA-Polymerase. Hierzu wurde die *Phusion High Fidelity Polymerase* (Thermo Fischer) nach Herstellerangaben und folgendem Protokoll verwendet.

**Tabelle 4-5 PCR-Ansatz**

PCR-Ansatz	Σ 50 µl
Phusion HF Buffer (5x)	10 µl
dNTPs (10 mM)	5 µl
Template (10 ng/µl)	1 µl
Phusion DNA-Polymerase(2u/µl)	0,5 µl
fwd. Primer (10 µM)	2,5 µl
rev. Primer(10 µM)	2,5 µl
mQ H <sub>2</sub> O	28,5 µl

**Tabelle 4-6 PCR-Protokoll**

PCR-Protokoll	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initialdenaturierung	98 °C	30 s	1
Denaturierung	98 °C	10 s	34
Annealing	X °C	15 s	
Elongation	72 °C	30 s /kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Pause	10 °C	∞	1

#### 4.7.5 Restriktionsanalyse von DNA

Die Plasmid-DNA wurde mit den entsprechenden Enzymen in dem vom Hersteller empfohlenen Puffer und den an den Versuch angepassten Reaktionsbedingungen gespalten. Die Dauer der Restriktion war abhängig von der eingesetzten DNA-Menge, dem verwendeten Puffersystem und den Enzymen. Grundsätzlich wurden 300 ng DNA mit 2 U Endonuklease für 30 – 60 Minuten bei 37 °C geschnitten und anschließend die Größe der Banden durch Auftragung eines Aliquots mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

**Tabelle 4-7 Ansatz Restriktionsanalyse**

<b>Restriktionsanalyse</b>	
DNA	300 ng
Endonuklease	2 u
Restriktionspuffer (10x)	1 µl
mQ H <sub>2</sub> O	Σ 10 µL

#### 4.7.6 Agarose-Gelelektrophorese

Die Überprüfung der Fragmentgröße von DNA fand mittels Agarose-Gelelektrophorese statt. Dazu wurden 50 ml 0,8 %ige Agarosegele mit TAE-Puffer (40 mM Tris-Base, 20 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) gegossen und vor dem Gießen mit 2 µl Midori green (NIPPON genetics EUROPE, Düren, Deutschland) versetzt. Nach dem Abkühlen des Gels und der Probenauftragung erfolgte die Auftrennung der DNA bei 200 V und 400 mA in TAE-Puffer für 30 min.

Für die Aufreinigung von PCR- und DNA-Fragmenten wurde die jeweilige Anleitung des Kits *NucleoSpin PCR and Gel-Clean-up* (Macherey-Nagel) befolgt.

#### 4.7.7 Zielgerichtete Mutagenese (SDM)

Für die Generierung von Mutationen einzelner Aminosäuren wurde die zielgerichtete Mutagenese (SDM) ähnlich zu dem *QuickChange Site-Directed Mutagenesis System* von Stratagene verwendet. Dazu wurden spezifische Primer, die links und rechts zur zu mutierenden Base jeweils 15 - 20 Basen komplementär zum Template waren und in der Mitte der Sequenz die zum Aminosäureaustausch führende Base tragen, verwendet. Durch die Primer wird in der PCR-Reaktion die gewünschte Mutation eingebaut. Um eine möglichst hohe Effizienz im Basenaustausch und gleichfalls eine geringe Fehlerquote zu haben, wurde die Pfu *High Fidelity DNA-Polymerase* von Promega verwendet. Dazu wurden 100 ng Template in folgendem Protokoll verwendet.

Tabelle 4-8 SDM-Ansatz

SDM-Ansatz	$\Sigma$ 50 $\mu$ l
Pfu-Buffer (10x)	5 $\mu$ l
dNTPs (10 mM)	5 $\mu$ l
Template (100 ng/ $\mu$ l)	1 $\mu$ l
Pfu DNA-Polymerase (2-3 u/ $\mu$ l)	0,8 $\mu$ l
fwd. Primer (10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
rev. Primer(10 $\mu$ M)	1 $\mu$ l
mQ H <sub>2</sub> O	36,2 $\mu$ l

Das Ursprungsplasmid wurde vor der Transformation von *E. coli* spezifisch durch DpnI Inkubation für 1,5 h bei 37 °C geschnitten.

Tabelle 4-9 SDM-Protokoll

SDM-PCR	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initialdenaturierung	98 °C	2 min	1
Denaturierung	98 °C	30 s	29
Annealing	60 °C	30 s	
Elongation	72 °C	2min/kb	
Finale Elongation	72 °C	10 min	1
Pause	10 °C	$\infty$	1

## 4.8 Arbeiten mit Hefe

### 4.8.1 Transformation von Hefezellen

Für die Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* Stamm BMA64-1A und pSAR-Reporterhefen wurde das Protokoll nach Amberg verwendet (Amberg 2005). Hierzu wurde zunächst eine Vorkultur von 20 ml SD mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Am nächsten Tag wurde hieraus eine 50 ml Hauptkultur auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 angeimpft und für vier bis fünf Stunden bei 30 °C bis zu einer OD von 0,6 – 0,8 kultiviert. Die Zellen wurden anschließend für 5 min bei 4 °C und 1500g geerntet und in sterilem H<sub>2</sub>O resuspendiert. Nach einem weiteren

Zentrifugationsschritt wurden die Zellen in 100 mM Lithiumacetat aufgenommen und in 50  $\mu$ l Ansätze aliquotiert. Die Zellen wurden erneut pelletiert und der Überstand abgenommen, bevor 360  $\mu$ l des Transformationsansatzes zugegeben und die Zellen in diesem resuspendiert wurden. Die Transformation erfolgte bei 42 °C für 40 min, bevor die Zellen erneut abzentrifugiert und in Wasser aufgenommen wurden. Das Ausplattieren erfolgte auf selektiven SD-Platten, auf denen die Transformanten dann für 2 – 3 Tage bei 30 °C inkubiert wurden.

**Tabelle 4-10 Ansatz Hefetransformation**

<b>Transformationsansatz</b>	
Hefezellen	50 $\mu$ l
PEG 4000 50%	240 $\mu$ l
Carrier-DNA (2 mg/ml, TE pH 8)	50 $\mu$ l
Plasmid-DNA	200 ng
1 M LiAc	36 $\mu$ l
mQ H <sub>2</sub> O	Auf $\Sigma$ 360 $\mu$ l

#### 4.8.2 Luciferase-Assay

Die Analysen der Aktivierung des ABA-Signalwegs *in vivo* in Hefe erfolgten basierend auf dem von Dr. Moritz Ruschhaupt etablierten System (Ruschhaupt et al. 2019). Dazu wurden pro Ansatz je drei Einzelkolonien, welche auf Expression des Reporters, sowie auf transformierte Plasmide selektiert wurden, in 0,5 ml selektiven SD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Kulturen auf 5 ml Volumen vergrößert und bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase inkubiert. Es wurde jeweils 1 ml der Kultur geerntet und 1 ml zum Bestimmen der OD<sub>600</sub> verwendet um die geernteten Zellen auf eine OD<sub>600</sub> von 10 mit sterilem mQ H<sub>2</sub>O einzustellen.

Für die Messung der Reporterinduktion wurden 490  $\mu$ l SD-Medium mit Galactose, zur Induktion der SnRK2s, in *deepwell*-Platten vorgelegt und pro Replikat je 2 *wells* mit 10  $\mu$ l auf eine OD von 0,2 angeimpft. Zur Analyse des ABA-Rezeptorkomplexes wurde das Medium mit entsprechenden Konzentrationen an ABA (2-cis-4-trans-(+)-Abscisinsäure, 5 mM Stock in 10 mM MES/KOH pH 7; London Bio Technology, China,

<http://www.lomonbio.com>) versetzt. Die Messplatte wurde mit einer sterilen atmungsaktiven Membran (Breathe-EASIER; DIVBIO, Dedham, US) verschlossen, um die Atmung der Hefen zu ermöglichen und einen Gärprozess zu vermeiden, und für 18 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert.

Am folgenden Tag wurden jeweils 100 µl der Zellen in eine durchsichtige Mikrotiterplatte zur Bestimmung der Absorption bei 600 nm und eine schwarze Mikrotiterplatte, zur Bestimmung des Luciferasesignals überführt.

Für die Messung der LUC-Aktivität im Luminometer (Hidex) wurde zunächst die Hintergrundaktivität für 5 s bestimmt, bevor die Messung durch Injektion von 100 µl Luciferinsubstrat (1 mM D-Luciferin Kaliumsalz; Promega, in 100 mM Zitronensäure pH 3) für 5 s als *counts per second* (cps) bestimmt wurde. Die Induktion des Reporters wurde bestimmt, indem Zellen, die nur ABFs und den Reporter exprimieren auf 1 gesetzt wurde. Für alle Konstrukte wurde das LUC-Signal auf die Menge an Hefezellen normalisiert.

#### **4.8.3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Wachstumsassay**

Für den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-abhängigen Wachstumsassay wurden die Zellen, wie unter Luciferase-Assay beschrieben, angezogen und auf eine OD<sub>600</sub> von 10 eingestellt. Anschließend wurde eine serielle Verdünnungsreihe erstellt um die finalen, im Assay verwendeten, Konzentrationen von 0,1; 0,01 und 0,001 OD<sub>600</sub> zu erzielen. Je Replikat wurden 10 µl Hefesuspension auf selektive SD-Platten mit verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen aufgetropft und die Platten für 2 Tage bei 30 °C inkubiert.

#### **4.8.4 Stopped-Flow-Spektrophotometrie von Hefe-Sphäroplasten**

Hefezellen, die Aquaporine in verschiedenen Kombinationen mit Komponenten des ABA-Signalwegs exprimieren, wurden in 20 ml selektivem SD-Medium angeimpft und über Nacht bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen geerntet und mit 50 ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen bevor sie in 1,2 M Sorbitol resuspendiert wurden. Die Lyse der Zellwand erfolgte durch Zugabe von 500 U Lyticase (Sigma-Aldrich, München, Deutschland) und 20-minütiger Inkubation bei 30 °C und wurde am Photometer überprüft. Die Spheroplasten wurden pelletiert und anschließend mit 5 ml

und 2 ml 1,2 M Sorbitol, 100 mM Natriumphosphat (pH 6,5) gewaschen und bei einer  $OD_{600}$  von 0,5 - 1 bis zur Messung auf Eis gelagert. 1,8 M Sorbitol, 100 mM Natriumphosphat (pH 6,5) wurde als hyperosmotische Lösung verwendet.

Die Volumenänderung wurde mit 150  $\mu$ l Probenvolumen bei einer Flussrate von 15 ml/s und bei 15 °C über 8 s aufgezeichnet. Dies wurde durch Lichtbrechung in einem Winkel von 90° und 475 nm durch ein Messgerät zur Detektion schneller Kinetiken (SFM-3000, BioLogic) und einer nachgeschalteten Lichtquelle (FP-8300, Jasco) detektiert. Jedes Konstrukt wurde 10-mal gemessen und die Kurven in Origin2020 mit einem nicht linearen Fit durch einen 2-exp decay angepasst um die Ratenkonstante zu berechnen.

## 4.9 Arbeiten mit Proteinen

### 4.9.1 Proteinexpression Hefe

Für die Proteinexpression in Hefe wurden die entsprechenden Transformanten in 15 ml selektivem SD-Medium mit Glucose, unter konstitutiver Genexpression über Nacht bei 30 °C und 200 rpm angezogen. Die Hefen wurden geerntet und zunächst in 10 mM EDTA pH 8 gewaschen. Anschließend wurden 600  $\mu$ l gekühlter YLB und etwa 200  $\mu$ l Glaskugeln (0,2 mm  $\varnothing$ ) zugegeben und die Zellen im TissueLyser für 4x 20 s bei 30 Hz mit Kühlintervallen von 1 m lysiert. Der Überstand wurde abgenommen und für 20 Minuten bei 20.000 g und 4 °C zentrifugiert. Das so angereicherte Pellet der Membranfraktion (Abas and Luschnig 2010) wurde in 6x SDS-Ladepuffer gelöst und vor dem Auftragen für 5 Minuten bei 95° gekocht.

#### Yeast Lysis Buffer (YLB)

TRIS-HCl, pH 8	50 mM
DMSO	1%
NaCl	100 mM
EDTA	1 mM

1x cOmplete, *EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail* (ROCHE)

### 4.9.2 SDS-PAGE

Die Proteine wurden entsprechend ihres Molekulargewichts aufgetrennt. Dazu wurden je zwei 8 %ige Trenngele, überschichtet mit einem 4 %igen Sammelgel, in einem *Mini-Protean Tetra Cell-System* (Biorad) verwendet.

**Tabelle 4-11 Ansatz SDS-Gele**

	<b>8% Trenngel</b>	<b>4% Sammelgel</b>
Acrylamid/bis-Acrylamid (37,5:1)	5,33 ml	1320 µl
mQ H <sub>2</sub> O	4 ml	5,8 ml
Trenngelpuffer (2 M TRIS/HCl, pH 8,8)	3,8 ml	---
Sammelgelpuffer (1,5 M TRIS/HCl, pH = 6,8)	---	720 µl
10% SDS	200 µl	80 µl
TEMED	20 µl	8 µl
10% (w/v) Ammoniumperoxodisulfat	120 µL	40 µL

Die Gele wurden nach dem Aufkochen und Abkühlen der Proben mit 10 µl beladen und die Elektrophorese für 1 h bei 120V gestartet. Als Größenstandard wurden 5 µl *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo-Fischer) aufgetragen.

### SDS-Laufpuffer

TRIS-Base	25 mM
Glycerol	192 mM
SDS	0,1% (w/v)

### 4.9.3 Coomassie-Färbung

Eines der verwendeten Gele wurde für die Coomassie-Färbung verwendet. Dazu wurde das Gel für 1 min bei 360 W in der Mikrowelle gekocht und bei 40 rpm für 10 min inkubiert. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und mit 10%



Essigsäure erneut in der Mikrowelle aufgeköcht und für 1 h bei 40 rpm unter Zugabe eines Kosmetiktuches, entfärbt.

### **Coomassie-Färbelösung**

Isopropanol	25% (v/v)
Essigsäure	10% (v/v)
Coomassie Brilliant Blue R-250	0,05% (w/v)

### **4.9.4 Western Blot**

Um die mit einem Fluorophor getaggtten Proteine zu detektieren, wurde die Methode des Western Blots angewandt. Hierzu wurde das SDS-Gel auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran gebロットet. Dazu wurden die durch Methanol aktivierte Membran zusammen mit jeweils 6 Whatman-Papieren, welche mit Elektronentransferpuffer angefeuchtet waren und das Gel auf eine Blot-Apparatur in folgender Reihenfolge von Anode zu Kathode geschichtet: 3x Whatman-Filterpapier, PVDF-Membran, SDS-Gel, 3x Whatman-Filterpapier. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte für 1 h bei 400 mA und 15 V. Danach wurde die Membran für 1 h bei Raumtemperatur mit 2,5% Milchpulverlösung inkubiert, um die freien Bindestellen der Membran zu blockieren. Anschließend wurde die Membran 4-mal mit TBST gewaschen, bevor der GFP-Antikörper in TBST gelöst und zusammen mit der Membran für 1 h geschwenkt wurde. Nach 4-maligem Waschen mit TBST erfolgte die Anlagerung des sekundären Antikörpers in TBST durch 1 h Schwenken. Vor der Detektion der Proteine wurde die Membran erneut 4-mal mit TBST gewaschen, bevor 200 µl *SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate* (Thermo-Fischer Scientific) zugegeben und das Signal mittels *ImageQuant LAS4000mini* (GE Healthcare) detektiert wurde.

**Elektronentransferpuffer**

TRIS/HCl pH 8,3	5,8 g
Glycin	2,9 g
MeOH	200 ml
SDS 10%	3,75 ml, mit mQ H <sub>2</sub> O auf 1 l

**TBST**

TRIS HCl pH 7,4	50 mM
NaCl	150 mM
Tween20	0,05%

**Antikörper**

$\alpha$ -GFP from mouse	1:2000
Goat-anti-Mouse:HRP	1:10000

**4.10 Arbeiten mit Protoplasten****4.10.1 Isolierung von Protoplasten**

Für die Isolierung von Protoplasten aus Arabidopsis wurden 2 bis 3 Wochen alte Pflanzen verwendet. Ca. 2 g Rosettenblätter wurden bei 25 °C und 50 rpm durch Zugabe von 25 ml Enzymlösung lysiert. Danach wurden die Blattreste durch Filtration durch ein Nylonnetz (200  $\mu$ M Maschenweite) entfernt und mit 10 ml W5-Lösung gespült und mit der vorherigen Lösung vereinigt. Nach der Zentrifugation bei 60 g wurde der Überstand entfernt und die Protoplasten mit 10 ml W5-Lösung gewaschen. Erneut wurden die Protoplasten pelletiert und zunächst in 5 ml MM-Lösung resuspendiert. Ein 100  $\mu$ l Aliquot wurde entnommen und mit 1  $\mu$ l Fluoresceindiacetat (1 mg/ml) gemischt um die Menge an Protoplasten in einer Thomakammer zu bestimmen und daraufhin auf  $1 \times 10^6$  Protoplasten/ml mit MM-Lösung einzustellen. Die Proben wurden anschließend für mindestens 1 h auf Eis inkubiert.

**W5-Lösung**

NaCl	154 mM
CaCl <sub>2</sub>	125 mM
KCl	5 mM
MES pH 5,7	2 mM

**MM-Lösung**

Mannitol	400 mM
KCl	20 mM
MES pH 5,7	5 mM

**4.10.2 Transfektion von Protoplasten**

Die Transfektion erfolgte in 2 ml Rundbodengefäßen. Hierzu wurde folgende DNA vorgelegt:

Reporter pRD29B::LUC	5 µg
Standard p35S::GUS	3 µg
Effektor	x µg
Mannitol 0,8 M	15 µl
mQ H <sub>2</sub> O	30 µl

Danach wurden 100 µl Protoplasten und 130 µl auf 37 °C temperierte PEG-Lösung zugegeben und 4-mal sanft invertiert. Die Transformation erfolgte für ca. 10 Minuten und wurde durch Zugabe von 1 ml W5-Lösung und vorsichtiges Mischen gestoppt. Anschließend wurden die Reaktionsgefäße bei 250 g für 2 min zentrifugiert und der Überstand abgenommen. Das Pellet wurde vorsichtig in 210 µl WIMK-Lösung

resuspendiert und hiervon je 100 µl in Platten mit oder ohne ABA gegeben. Die Inkubation der Protoplasten erfolgte für 18 h bei 25 °C.

**PEG**

PEG 4000	40% (w/v)
Mannitol	200 mM
CaCl <sub>2</sub>	100 mM

**WIMK**

Mannitol	500 mM
KCl	20 mM
MES pH5,7	4 mM

Für die Messung der Reporteraktivität und dessen Normalisierung wurden je 50 µl Protoplasten in eine weiße, bzw. schwarze Mikrotiterplatte vorgelegt. Die Bestimmung der Transformationseffizienz erfolgte durch die Umsetzung von 4-Methyl-lumbelliferyl-β-D-Glucoronid (4-MUG) zu Methylumbelliferon (MU), welches bei 365 nm angeregt wird und bei 460 nm detektiert wird. Dazu wurden die vorgelegten Protoplasten mit 100 µl MUG-Puffer gemischt und deren Emissionssignal für 10 min bei 37 °C gemessen, welches über die Zunahme des Fluoreszenzsignals direkt proportional zur Enzymaktivität ist.

**MUG-Puffer**

EDTA	10 mM
DTT	1 mM
Triton X-100	0,1%
4-MUG	0,5 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	50 mM

Die Messung des Luciferasesignals erfolgte durch Zugabe von 100 µl *Luciferase Assay Reagent* (LAR) in die weiße Platte mit Protoplasten. Das hier enthaltene Luciferin wird bei aktivem ABA-Signalweg unter ATP-Verbrauch zu Oxyluciferin umgesetzt. Die Detektion des Signals erfolgte nach Abzug des Hintergrunds für 10 s und wurde letztendlich auf die vorher bestimmte Transformationseffizienz normalisiert.

**LAR-Lösung**

Tricin	20 mM
MgSO <sub>4</sub>	2,7 mM
EDTA	0,5 mM
DTT	33,3 mM
ATP	0,53 mM
MgCO <sub>3</sub>	530 g/l
CoA	200 mg/l
Luciferin	150 mg/l
Triton X-100 pH 7	0,1%

## 5 Anhang

### 5.1 Verwendete Oligonukleotide

**Tabelle 5-1 Verwendete Oligonukleotide**

<b>PIP2;1 cds For1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCAAAGGATGTGGAAGCCGTTCCC
<b>PIP2;1 cds for2</b>	TAGAAGACCCGTTTTCTCTGCCACTGACCCCAAACGTAGTGCC
<b>PIP2;1 cds rev1</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGACGTTGGCAGCACTTCTGAATGATCCAAG
<b>PIP2;1 cds rev2</b>	TAGAAGACGAAAACGGTGTAGACAAGAACGAAAGTACCAATG
<b>TIP1;1 For1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGCCGATCAGAAACATCGCCATTGG
<b>TIP1;1 Rev1</b>	TAGAAGACAAGAGCCCAGAAGGAGTGGTGGC
<b>TIP1;1 For2</b>	TAGAAGACAAGCTCGTAGCTGCTGCAGTGGC
<b>TIP1;1 Rev2</b>	TAGAAGACAAAGATAGACCAAAGCCGGCAC
<b>TIP1;1 For3</b>	TAGAAGACAAATCTGCTGGAGTAGGAGTGTT
<b>TIP1;1 Rev3</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGTAGTCTGTGGTTGGGAGCTG
<b>PIP2;2 for2</b>	TAGAAGACAATTTCTCCGCTACTGATCCCAA
<b>PIP2;2 for1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCCAAAGACGTGGAAGGACCTG
<b>PIP2;2 rev1</b>	TAGAAGACAAGAAAACGTGTAGACGAGAAC
<b>PIP2;2 rev2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAACGTTGGCTGCACTTCTGAAGG
<b>PIP2;3 for1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCTAAAGACGTGGAAGGA
<b>PIP2;3 for2</b>	TAGAAGACAATTTCTCCGCTACTGATCCCAA
<b>PIP2;3 rev1</b>	TAGAAGACAAGAAAACGTGTAGACAAGCAC
<b>PIP2;3 rev2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAACGTTGGCTGCACTTCTGAA
<b>PIP2;4 for1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCAAAGACTTGGATGTGAACGAG
<b>PIP2;4 for2</b>	TAGAAGACAATTTCTCGGCAACCGATCCCAA
<b>PIP2;4 for3</b>	TAGAAGACAAAATGGTTCATTTAGCCACCAT
<b>PIP2;4 rev1</b>	TAGAAGACAAGAAAACGGTGTATACAAGGAC
<b>PIP2;4 rev2</b>	TAGAAGACAACATTAAGACGGCAAAGCCAAT
<b>PIP2;4 rev3</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGCAAAGCTCCTAAAGGAGCCAAAGG
<b>NIP5;1 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCTCCACCGGAGGCTGAG
<b>NIP5;1 R1</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTACGACGAAAGCTCCTAACCGG
<b>PIP1;2 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAAGGTAAGAAGAAGAT
<b>PIP1;2 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGAACAAAAGCCAGATTT

<b>PIP1;2 F2</b>	TAGAAGACAATTTCTCTGCCACTGATGCCAA
<b>PIP1;2 R1</b>	TAGAAGACAAGAAAACGGTGTAACAAGGAC
<b>SIP1;1 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGATGGGTGTGTTGAAGTCG
<b>SIP1;1 R1</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGGCTTTCTTTGTTTCTTCTT
<b>PIP2;5 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGACGAAGGAAGTGTTGGT
<b>PIP2;5 R3</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTAACGTGAGGCTGGCTCCTGAA
<b>PIP2;5 F2</b>	TAGAAGACAACCTCTCTGACGGTTACAGCAT
<b>PIP2;5 R1</b>	TAGAAGACAAGAGGCCATTTGCGCCACCACC
<b>PIP2;4 F3</b>	TAGAAGACAATTTCTCTGCCACTGATCCCAA
<b>PIP2;5 R2</b>	TAGAAGACAAGAAAACGGGTGACTAAGAC
<b>PIP2;6 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGACGAAGGATGAGTTGACG
<b>PIP2;6 R4</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGCATGGAGCTCATGAAGCTG
<b>PIP2;6 F2</b>	TAGAAGACAAAACGTTTCGAGGTGAGAGAGCT
<b>PIP2;6 R1</b>	TAGAAGACAACGTTTTTCACAGGCGGTGGGTC
<b>PIP2;6 F3</b>	TAGAAGACAATTTCCAGTCGACTTATTACAA
<b>PIP2;6 R2</b>	TAGAAGACAAGAAAACCTTTCACCAAACCAAC
<b>PIP2;6 F4</b>	TAGAAGACAATTCCGCTACCGACCCTAAGCG
<b>PIP2;6 R3</b>	TAGAAGACAAGGAAAAGACGGGTGTAGACGAG
<b>PIP2;7 F2</b>	TAGAAGACAATTCTTTGGTGCGAGCTCTTGG
<b>PIP2;7 R1</b>	AGAAGACAAAAGAAACCTTACGGGCCAAGAA
<b>PIP2;7 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGTGCGAAAAGAAGTGAGCGAA
<b>PIP2;7 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTATTGGTTGCGTTGCTTCGGAA
<b>PIP2;1 G103W F1</b>	CTACTGCACCGCCGGTATCTCTTGGGGTCCACATTA
<b>PIP2;1 G103W R1</b>	TAATGTGACCCCAAGAGATACCGGCGGTGCAGTAC
<b>TIP2;1 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCTGGAGTTGCCTTTGGT
<b>TIP2;1 R1</b>	TAGAAGACAAGAAAACATTTCCGTAGATAAG
<b>TIP2;1 F2</b>	TAGAAGACAATTTTCATGGGTTCTTCCGAACA
<b>TIP2;1 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGAAATCAGCAGAAGCAAGAGG
<b>PIP1;1 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAAGGCAAGGAAGAAGATGTTAGA
<b>PIP1;1 R1</b>	TAGAAGACAAGAAAACGTGTATACAAGAAC
<b>PIP1;1 F2</b>	TAGAAGACAATTTCTCAGCAACTGACGCCAA
<b>PIP1;1 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGCTTCTGGACTTGAAGGGGAT
<b>PIP2;8 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGTCAAAGAAGTGAGTGAAGAAGGAAG GCATGGCA
<b>PIP2;8 R1</b>	TAGAAGACAAGAAAACAGTGTAACCAAGAC
<b>PIP2;8 F2</b>	TAGAAGACAATTTCTCCGCCACTGACCCCAA
<b>PIP2;8 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTATTGGTTGGGTTGCTGCGGAA
<b>NIP5;1 F1- 2</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGCTCCACCGGAGGCTGAG
<b>NIP5;1 R1-2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTACGACGAAAGCTCCTAACCGG
<b>PIP2;1 S121A F</b>	GGCACGTAAAGTGGCTTTACCTAGGG
<b>PIP2;1 S121A R</b>	CCCTAGGTAAAGCCACTTTACGTGCC
<b>PIP2;1 S121D F</b>	GGCACGTAAAGTGGATTTACCTAGGG

<b>PIP2;1 S121D R</b>	CCCTAGGTAAATCCACTTTACGTGCC
<b>PIP2;1 S280A F</b>	AAGTCTCTTGGAGCATTGAGAAGTG
<b>PIP2;1 S280A R</b>	CACTTCTGAATGCTCCAAGAGACTT
<b>PIP2;1 S280D F</b>	AAGTCTCTTGGAGATTTGAGAAGTG
<b>PIP2;1 S280D R</b>	CACTTCTGAAATCTCCAAGAGACTT
<b>PIP2;1 S283A F</b>	GGATCATTGAGAGCTGCTGCCAACGTC
<b>PIP2;1 S283A R</b>	GACGTTGGCAGCAGCTCTGAATGATCC
<b>PIP2;1 S283D F</b>	GGATCATTGAGAGATGCTGCCAACGTC
<b>PIP2;1 S283D R</b>	GACGTTGGCAGCATCTCTGAATGATCC
<b>2;1 S283A S280A F</b>	AAGTCTCTTGGAGCATTGAGAGCTGCT
<b>2;1 S283A S280A R</b>	AGCAGCTCTGAATGCTCCAAGAGACTT
<b>2;1 S283A S280D F</b>	AAGTCTCTTGGAGATTTGAGAGCTGCT
<b>2;1 S283A S280D R</b>	AGCAGCTCTGAAATCTCCAAGAGACTT
<b>2;1 S283D S280A F</b>	AAGTCTCTTGGAGCATTGAGAGATGCT
<b>2;1 S283D S280D F</b>	AAGTCTCTTGGAGATTTGAGAGATGCT
<b>2;1 S283D S280A R</b>	AGCATCTCTGAATGCTCCAAGAGACTT
<b>2;1 S283D S280D R</b>	AGCATCTCTGAAATCTCCAAGAGACTT
<b>PIP2;1 S121C F</b>	GCACGTAAAGTGTGTTTACCTAGGGCC
<b>PIP2;1 S121C R</b>	GGCCCTAGGTAAACACACTTTACGTGC
<b>PIP1;2 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGCTTCTGGACTTGAATGGGAT
<b>PIP1;3 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAAGGAAAGAAGAGGAT
<b>PIP1;3 R1</b>	TAGAAGACAAGAAAACCGTGTAGACAAGGAC
<b>PIP1;3 F2</b>	TAGAAGACAATTTCTCCGCCACTGACGCCAA
<b>PIP1;3 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGGATCTGGACTTGAATGGAAT
<b>PIP1;4 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAAGGCAAAGAAGAAGAT
<b>PIP1;4 R1</b>	TAGAAGACAAGAAAACAGTGTAGACGAGAAC
<b>PIP1;4 F2</b>	TAGAAGACAATTTCTCCGCCACCGACGCCAA
<b>PIP1;4 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTACTCTTGCTCTTGAAAGGAAT
<b>PIP1;5 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAAGGCAAAGAAGAAGATGTCAAT
<b>PIP1;5 R1</b>	TAGAAGACAAGAAAACAGCAAACCCAATTGG
<b>PIP1;5 F2</b>	TAGAAGACAATTTCTTGGTGCACCTGGCTAC
<b>PIP1;5 R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTGTCTTGGACTTGAAAGGAAT
<b>PIP1;1 F2</b>	TAGAAGACAATTTCTCAGCAACTGACGCCAAGAGAAATGCT
<b>PIP2;1 Q14E F</b>	GGAGAAGGATTTGAGACAAGAGACTAT
<b>PIP2;1 Q14E R</b>	ATAGTCTCTTGTCTCAAATCCTTCTCC



<b>PIP2;1 Q19E F</b>	ACAAGAGACTATGAAGATCCGCCACCA
<b>PIP2;1 Q19E R</b>	TGGTGGCGGATCTTCATAGTCTCTTGT
<b>PIP2;1 K3M F</b>	CACACCATGGCAATGGATGTGGAAGCC
<b>PIP2;1 K3M R</b>	GGCTTCCACATCCATTGCCATGGTGTG
<b>PIP2;1 K3R F</b>	CACACCATGGCAAGGGATGTGGAAGCC
<b>PIP2;1 K3R R</b>	GGCTTCCACATCCCTTGCCATGGTGTG
<b>RAF3 F</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGTCTGAAGATGAAGCATCTT
<b>RAF3 R</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCATCAAACCTTCACTCGTATT
<b>RAF24 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATCAAGCAAAGGTTAT
<b>RAF24 F2</b>	TAGAAGACAAACTGCAGGTCATTAATAATGA
<b>RAF24 R1</b>	TAGAAGACAACAGTGACCTCATGCCACTATC
<b>RAF24 F3</b>	TAGAAGACAAGCCAACCGTGCCAAACTACTG
<b>RAF24 R2</b>	TAGAAGACAATGGCCTCAATGTATTGTTTAC
<b>RAF24 R3</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCTTGTTGGATTTGGTGGTTGAC
<b>RAF4 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAAGATGAACATGAAGAAA
<b>RAF4 F2</b>	TAGAAGACAACCAAGATAACTCTGAATTCAA
<b>RAF4 R1</b>	TAGAAGACAATTGGGACCTCAATGAATCAGA
<b>RAF4 F3</b>	TAGAAGACAACCTCTTCAGGGTTTGTGAACAG
<b>RAF4 R2</b>	TAGAAGACAAGAGGACGCTGACTTTGATTT
<b>RAF4 F4</b>	TAGAAGACAACCTCCATGGTTGTTGCTGCCGC
<b>RAF4 R3</b>	TAGAAGACAAGGAGGACGCAACAACAGCCGC
<b>RAF4 R4</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTTGTTCCTGCTCATCAGTGGT
<b>RAF18 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATAGAAACAGACCACCA
<b>RAF18 F2</b>	TAGAAGACAACCTCTCGAATGCAAATGTCCG
<b>RAF18 R1</b>	TAGAAGACAAGAGGCCCGTTTGATCAGGCGT
<b>RAF18 F3</b>	TAGAAGACAATTCTGGTGGAGGTATTGAGAC
<b>RAF18 R2</b>	TAGAAGACAAGAAACCGTTCTTTTGTCCAA
<b>RAF18 F4</b>	TAGAAGACAATTTCTCTTTTGGTATAGTCTT
<b>RAF18 R3</b>	TAGAAGACAAGAAAACATCGACCTTCTCTGA
<b>RAF18 R4</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCTTTGAAGCCTTGTGAGCTGG
<b>RAF20 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATAAAGCTAGACATCAA
<b>RAF20 F2</b>	TAGAAGACAACCTCCAATCCCAATGGAGCTGG
<b>RAF20 R1</b>	TAGAAGACAAGGAGGACCTCTGAGGAATCAC
<b>RAF20 F3</b>	TAGAAGACAACCTCTTCAGCCTCAGGTAGTGT
<b>RAF20 R2</b>	TAGAAGACAAGAGGACGTGTTCTTGTATCC
<b>RAF20 F4</b>	TAGAAGACAACCTCCCAAAGGGTATATTGCTC
<b>RAF20 R3</b>	TAGAAGACAAGGAGGACTGCTCAGGCTCCGG
<b>RAF20 F5</b>	TAGAAGACAAGCCAACCATAACCAGGCTTCTG
<b>RAF20 R4</b>	TAGAAGACAATGGCCTCAGTGTGTTGTTTAC
<b>RAF20 R5</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTTTGGAAGCCCTGTGAGCTGA
<b>RAF20 F1-2</b>	AAATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATAAAGCTAGACATCAA

<b>RAF20 F2-2</b>	AATAGAAGACAACCTCCAATCCCAATGGAGCTGG
<b>RAF20 F3-2</b>	AATAGAAGACAACCTCTTCAGCCTCAGGTAGTGT
<b>RAF20 F4-2</b>	AATAGAAGACAACCTCCCAAAGGGTATATTGCTC
<b>RAF20 F5-2</b>	AATAGAAGACAAGCCAACCATAACCAGGCTTCTG
<b>RAF20 R1-2</b>	AATAGAAGACAAGGAGGACCTCTGAGGAATCAC
<b>RAF20 R2-2</b>	AATAGAAGACAAAGAGGACGTGTTCTTGTATCC
<b>RAF20 R3-2</b>	AATAGAAGACAAGGAGGACTGCTCAGGCTCCGG
<b>RAF20 R4-2</b>	AATAGAAGACAATGGCCTCAGTGTGTTGTTTAC
<b>RAF20 R5-2</b>	AAATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTTTGGAAGCCCTGTGAGCTGA
<b>RAF2/ED R1 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAAGCATATTTTCAAGAAG
<b>RAF2/ED R1 R3</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTTGTGGTGTAGGAAGTACAAG
<b>RAF2/ED R F2</b>	TAGAAGACAACCTCTGAGGAGGAGTATCAAGT
<b>RAF2/ED R1 R1</b>	TAGAAGACAAAGAGGACATGTAATCCGCACG
<b>RAF2/ED R1 F3</b>	TAGAAGACAAGGACCCAAAAAACCTTTTCGC
<b>RAF2/ED R1 R2</b>	TAGAAGACAAGTCCTCCTCACTGTTCTGATT
<b>RAF42 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGATGATGAAGAATTGGAA
<b>RAF42 R3</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAGATTGTGGTCCCTGTGTTGA
<b>RAF42 F2</b>	TAGAAGACAACCAAGTCCACCATCTAACCA
<b>RAF42 R1</b>	TAGAAGACAATTGGGACCCGCCATAACCATC
<b>RAF42 F3</b>	TAGAAGACAAGCTCTCAAAGGTGAAATGTCA
<b>RAF42 R2</b>	TAGAAGACAAGAGCCCCAAATCCCCAACCTT
<b>RAF5 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAAAGTAAAAGAAGAACT
<b>RAF5 R3</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTATCCTTTTGTTCATGTTTCACT
<b>RAF5 F2</b>	TAGAAGACAACCATCACAGCAATAGCCCTGA
<b>RAF5 R1</b>	TAGAAGACAATGGGACCTCGGTGATGATGA
<b>RAF5 F3</b>	TAGAAGACAAGCACCAAAACGGTTTTGGTCC
<b>RAF5 R2</b>	TAGAAGACAAGTGCCTTCCTTCTGAGTTGT
<b>RAF16 F*2</b>	TAGAAGACAAGCTACAACATGGTGGTGTTAA
<b>RAF16 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAGAATGGAGTTTCCTGGC
<b>RAF16 F4</b>	TAGAAGACAAGTCAGAGAAAGTCGATGTTTT
<b>RAF16 R1</b>	TAGAAGACAATAGCCTTCGTTGAGCACCAAA
<b>RAF16 R3</b>	TAGAAGACAATGACACCCGATTGCTGCTTCC
<b>RAF16 R4</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTGGTTCTTCGCTTGGGTTGCAA
<b>RAF16F*3</b>	TAGAAGACAATTTACACGAGCTTGGATCTGG
<b>RAF16R*2</b>	TAGAAGACAATAAATCTTCAAGATCAGTGT
<b>PIP2;1 S121T F</b>	GCACGTAAAGTGACGTTACCTAGGGCC

<b>PIP2;1 S121T R</b>	GGCCCTAGGTAACGTCACTTTACGTGC
<b>PIP2;1 S187A F</b>	TACACCGTTTTTCGCTGCCACTGACCCC
<b>PIP2;1 S187A R</b>	GGGGTCAGTGGCAGCGAAAACGGTGTA
<b>PIP2;1 T189A F</b>	GTTTTTCGCTGCCGCTGACCCCAAACGT
<b>PIP2;1 T189A R</b>	ACGTTTGGGGTCAGCGGCAGCGAAAAC
<b>PIP2;1 S194A F</b>	GACCCCAAACGTGCTGCCAGAGACTCC
<b>PIP2;1 S194A R</b>	GGAGTCTCTGGCAGCACGTTTGGGGTC
<b>PIP2;1 S198A F</b>	GCTGCCAGAGACGCCACGTTCCGGTG
<b>PIP2;1 S198A R</b>	CACCGGAACGTGGGCGTCTCTGGCAGC
<b>RAF2/ED R1 F1*</b>	AATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAAGCATATTTTCAAGAAG
<b>RAF2/ED R1 R3*</b>	AATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTTGTGGTGTAGGAAGTACAAG
<b>RAF2/ED R F2*</b>	ATAGAAGACAACCTCTGAGGAGGAGTATCAAGT
<b>RAF2/ED R1 R1*</b>	TAGAAGACAAAGAGGACATGTAATCCGCACG
<b>RAF2/ED R1 F3*</b>	ATAGAAGACAAGGACCCAAAAAACCTTTTCGC
<b>RAF2/ED R1 R2*</b>	ATAGAAGACAAGTCCTCCTCACTGTTCTGATT
<b>RAF1 F1</b>	AATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAAATGCCCGGTAGAAGA
<b>RAF1 F2</b>	ATAGAAGACAACCTTTCATCTGGGAAGAGCTG
<b>RAF1 F3</b>	ATAGAAGACAAACTCTCGCGATTGAAGGCCAG
<b>RAF1 R1</b>	ATAGAAGACAAAGAGCCTCCAGCGGAGTCCGC
<b>RAF1 R2</b>	ATAGAAGACAAGAGTCCAAAATCACAAACCTT
<b>RAF1 R3</b>	AATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCAAATCCGAGCGGTTGGGCGG
<b>RAF5 F1*</b>	AATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGAAAGTAAAAGAAGAACT
<b>RAF5 R3*</b>	AATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTATCCTTTTGTTCATGTTTCAGT
<b>RAF5 F2*</b>	ATAGAAGACAACCATCACAGCAATAGCCCTGA
<b>RAF5 R1*</b>	ATAGAAGACAAATGGGACCTCGGTGATGATGA
<b>RAF5 F3*</b>	ATAGAAGACAAGCACCAAACGGTTTTTGGTCC
<b>RAF5 R2*</b>	ATAGAAGACAAGTGCCTTCCTTCTGAGTTGT
<b>RAF6 F1</b>	AATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGCCTCACCGGACTACTTAC
<b>RAF6 F2</b>	ATAGAAGACAAATCTCCGGCTGATCCCGCTCC
<b>RAF6 F3</b>	ATAGAAGACAAGTCATGGAATGAATTACATAT
<b>RAF6 R1</b>	ATAGAAGACAAAGATGACAACAGAAGCTCTCT
<b>RAF6 R2</b>	ATAGAAGACAATGACACCTCCAGCCAATCTGA
<b>RAF6 R3</b>	AATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTTAGTATGGGAGCTGATTTAGT
<b>FT F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGTCTATAAATATAAGAGATCCTC
<b>FT R2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAAGCCTTCTTCTCCCGCAGCC
<b>FT F2</b>	TAGAAGACAATCTCAGGAACCTTCTATACTTT
<b>FT R1</b>	TAGAAGACAAGAGATCTTCTCCACCAATCTC
<b>FT F1-2</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGTCTATAAATATAAGAGATCCTCTTA

<b>FT R2-2</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTAAGCCTTCTTCTCCCGCAGCCACT
<b>FT F2-2</b>	TAGAAGACAATCTCAGGAACTTCTATACTTTGGT
<b>FT R1-2</b>	TAGAAGACAAGAGATCTTCTCCACCAATCTCAAC
<b>SnRK2.4 cvi F</b>	ATGGTCTCACACXATGGACAAGTACGAGCTGGTG
<b>SnRK2.4 cvi R</b>	ATGGTCTCACCTTTTATTCTCACTTCTCCACTTG
<b>PIP2;1 T189A F2</b>	GTTTTCTCTGCCGCTGACCCCAAACGT
<b>PIP2;1 T189A R2</b>	CAAAAGAGACGGCGACTGGGGTTTGCA
<b>PIP2;1 S121Y F</b>	GCACGTAAAGTGTACTTACCTAGGGCC
<b>PIP2;1 S121Y R</b>	GGCCCTAGGTAAGTACACTTTACGTGC
<b>ETR1 F1</b>	ATGAAGACTTTACGGGTCTCACACCATGGAAGTCTGCAATTGTATT
<b>ETR1 R4</b>	ATGAAGACTTCAGAGGTCTCACCTTCATGCCCTCGTACAGTACCCG
<b>ETR1 F2</b>	TAGAAGACAAGCCTGTTTCTGGGAAATATAT
<b>ETR1 R1</b>	TAGAAGACAAAGGCCTCAACCTAGCCACAGG
<b>ETR1 F3</b>	TAGAAGACAACCTTCAACTTGAACCTGGGAC
<b>ETR1 R2</b>	TAGAAGACAAAAGGCTTCCATCTTCTAACCT
<b>ETR1 F4</b>	TAGAAGACAAGTTCATGGACGTGTGCATGCC
<b>ETR1 R3</b>	TAGAAGACAAGAACACCACTTTGTGCTCATG
<b>PIP2;1 S187D F</b>	TACACCGTTTTTCGATGCCACTGACCCC
<b>PIP2;1 S187D R</b>	GGGGTCAGTGGCATCGAAAACGGTGTA
<b>PIP2;1 T189D F</b>	GTTTTCTCTGCCGATGACCCCAAACGT
<b>PIP2;1 T189D R</b>	ACGTTTGGGGTCATCGGCAGAGAAAAC
<b>PIP2;1 S194D F</b>	GACCCCAAACGTGATGCCAGAGACTCC
<b>PIP2;1 S194D R</b>	GGAGTCTCTGGCATCACGTTTGGGGTC
<b>PIP2;1 S198D F</b>	AGTGCCAGAGACGACCACGTTCCGGTG
<b>PIP2;1 S198D R</b>	CACCGGAACGTGGTCGTCTCTGGCACT
<b>PIP2;1 S36A F</b>	CTAAAGAAGTGGGCTTTCTACAGAGCA
<b>PIP2;1 S36A R</b>	TGCTCTGTAGAAAGCCCACTTCTTTAG
<b>PIP2;1 187D189A F</b>	GTTTTCGATGCCGCTGACCCCAAACGT
<b>PIP2;1 187D189A R</b>	ACGTTTGGGGTCAGCGGCATCGAAAAC

## 6 Literaturverzeichnis

- Abas, L., and C. Luschig. 2010.** Maximum yields of microsomal-type membranes from small amounts of plant material without requiring ultracentrifugation. *Analytical biochemistry* 401: 217–227.
- Abeles, F. B., P. W. Morgan, and M. E. S. Jr. 2012.** *Ethylene in Plant Biology*. Academic Press.
- Addicott, F. T., and J. L. Lyon. 1969.** Physiology of Abscisic Acid and Related Substances. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 20: 139–164.
- Agre, P. 2004.** Aquaporin water channels (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie (International ed. in English)* 43: 4278–4290.
- Almasalmeh, A., D. Krenc, B. Wu, and E. Beitz. 2014.** Structural determinants of the hydrogen peroxide permeability of aquaporins. *The FEBS journal* 281.
- Amberg. 2005.** *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. (No Title).
- Anderson, J. P., E. Badruzaufari, P. M. Schenk, J. M. Manners, O. J. Desmond, C. Ehlert, D. J. Maclean, P. R. Ebert, and K. Kazan. 2004.** Antagonistic Interaction between Abscisic Acid and Jasmonate-Ethylene Signaling Pathways Modulates Defense Gene Expression and Disease Resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 3460–3479.
- Arkadipta Bakshi, Sarbottam Piya, Jessica C. Fernandez, Christian Chervin, Tarek Hewezi, and Brad M. Binder. 2018.** Ethylene Receptors Signal via a Noncanonical Pathway to Regulate Abscisic Acid Responses. *Plant Physiology* 176: 910.
- Beaudoin, N., C. Serizet, F. Gosti, and J. Giraudat. 2000.** Interactions between Abscisic Acid and Ethylene Signaling Cascades. *Plant Cell* 12: 1103–1115.
- Beitz, E., B. Wu, L. M. Holm, J. E. Schultz, and T. Zeuthen. 2006.** Point mutations in the aromatic/arginine region in aquaporin 1 allow passage of urea, glycerol, ammonia, and protons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103: 269–274.
- Bellati, J., C. Champeyroux, S. Hem, V. Rofidal, G. Krouk, C. Maurel, and V. Santoni. 2016.** Novel Aquaporin Regulatory Mechanisms Revealed by Interactomics. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 15: 3473–3487.

- Bernacchi, C. J., and A. VanLoocke. 2015.** Terrestrial ecosystems in a changing environment: a dominant role for water. *Annual review of plant biology* 66: 599–622.
- Bienert, G. P., R. B. Heinen, M. C. Berny, and F. Chaumont. 2014.** Maize plasma membrane aquaporin ZmPIP2;5, but not ZmPIP1;2, facilitates transmembrane diffusion of hydrogen peroxide. *Biochimica et biophysica acta* 1838: 216–222.
- Bienert, G. P., A. L. B. Møller, K. A. Kristiansen, A. Schulz, I. M. Møller, J. K. Schjoerring, and T. P. Jahn. 2007.** Specific aquaporins facilitate the diffusion of hydrogen peroxide across membranes. *The Journal of biological chemistry* 282: 1183–1192.
- Binder, Jayne Lambert, Robert Morbitzer, Claudia Popp, Thomas Ott, Thomas Lahaye, and Martin Parniske. 2014.** A Modular Plasmid Assembly Kit for Multigene Expression, Gene Silencing and Silencing Rescue in Plants. *PLOS ONE* 9: e88218.
- Binder, B. M. 2020.** Ethylene signaling in plants. *The Journal of biological chemistry* 295: 7710–7725.
- Bleecker, A. B., J. J. Esch, A. E. Hall, F. I. Rodríguez, and B. M. Binder. 1998.** The ethylene-receptor family from Arabidopsis: structure and function. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 353: 1405–1412.
- Boudsocq, M., H. Barbier-Brygoo, and C. Laurière. 2004.** Identification of nine sucrose nonfermenting 1-related protein kinases 2 activated by hyperosmotic and saline stresses in Arabidopsis thaliana. *The Journal of biological chemistry* 279: 41758–41766.
- Boyer, J. S. 1982.** Plant Productivity and Environment. *Science* 218: 443–448.
- Brad M. Binder, Ronan C. O'Malley, Wuyi Wang, Tobias C. Zutz, and Anthony B. Bleecker. 2006.** Ethylene Stimulates Nutations That Are Dependent on the ETR1 Receptor. *Plant Physiology* 142: 1690.
- Calamita, G., D. Ferri, P. Gena, G. E. Liquori, A. Cavalier, D. Thomas, and M. Svelto. 2005.** The Inner Mitochondrial Membrane Has Aquaporin-8 Water Channels and Is Highly Permeable to Water\*. *Journal of Biological Chemistry* 280: 17149–17153.

- Chang, C., S. F. Kwok, A. B. Bleecker, and E. M. Meyerowitz. 1993.** Arabidopsis ethylene-response gene ETR1: similarity of product to two-component regulators. *Science (New York, N.Y.)* 262.
- Chaumont, F., and S. D. Tyerman. 2014.** Aquaporins: Highly Regulated Channels Controlling Plant Water Relations1. *Plant Physiology* 164: 1600–1618.
- Chiasson, D., V. Giménez-Oya, M. Bircheneder, S. Bachmaier, T. Studtrucker, J. Ryan, K. Sollweck, H. Leonhardt, M. Boshart, P. Dietrich, and M. Parniske. 2019.** A unified multi-kingdom Golden Gate cloning platform. *Scientific reports* 9: 10131.
- Christmann, A., E. Grill, and J. Huang. 2013.** Hydraulic signals in long-distance signaling. *Current Opinion in Plant Biology* 16: 293–300.
- Christmann, A., E. W. Weiler, E. Steudle, and E. Grill. 2007.** A hydraulic signal in root-to-shoot signalling of water shortage. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 52: 167–174.
- Clark, K. L., P. B. Larsen, X. Wang, and C. Chang. 1998.** Association of the Arabidopsis CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 5401–5406.
- Cornforth, J. W., B. V. Milborrow, G. RYBACK, and P. F. WAREING. 1965.** Chemistry and Physiology of 'Dormins' In Sycamore: Identity of Sycamore 'Dormin' with Abscisin II. *Nature* 205: 1269–1270.
- Cutler, S. R., P. L. Rodriguez, R. R. Finkelstein, and S. R. Abrams. 2010.** Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual review of plant biology* 61: 651–679.
- Daniels, M. J., M. J. Chrispeels, and M. Yeager. 1999.** Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *Journal of Molecular Biology* 294: 1337–1349.
- Denker, B. M., B. L. Smith, F. P. Kuhajda, and P. Agre. 1988.** Identification, purification, and partial characterization of a novel Mr 28,000 integral membrane protein from erythrocytes and renal tubules. *The Journal of biological chemistry* 263: 15634–15642.
- Di Pietro, M., J. Vialaret, G.-W. Li, S. Hem, K. Prado, M. Rossignol, C. Maurel, and V. Santoni. 2013.** Coordinated Post-translational Responses of Aquaporins

to Abiotic and Nutritional Stimuli in Arabidopsis Roots\*. *Molecular & cellular proteomics* : MCP 12: 3886–3897.

- Farquhar, G. D., J. R. Ehleringer, and K. T. Hubick. 1989.** Carbon Isotope Discrimination and Photosynthesis. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant. Mol. Biol.* 40: 503–537.
- Finkelstein, R. 2013.** Abscisic Acid synthesis and response. *The Arabidopsis Book* / American Society of Plant Biologists 11: e0166.
- Fischer, G., U. Kosinska-Eriksson, C. Aponte-Santamaría, M. Palmgren, C. Geijer, K. Hedfalk, S. Hohmann, B. L. de Groot, R. Neutze, and K. Lindkvist-Petersson. 2009.** Crystal structure of a yeast aquaporin at 1.15 angstrom reveals a novel gating mechanism. *PLoS biology* 7: e1000130.
- Frackenhohl, Guido Bojack, Rachel Baltz, Udo Bickers, Marco Busch, Jan Dittgen, Jana Franke, Jörg Freigang, Erwin Grill, Susana Gonzalez, Hendrik Helmke, Martin J. Hills, Sabine Hohmann, Pascal von Koskull-Döring, Jochen Kleemann, Gudrun Lange, Stefan Lehr, Dirk Schmutzler, Arno Schulz, Kerstin Walther, Lothar Willms, and Christian Wunschel. 2018.** Potent Analogues of Abscisic Acid – Identifying Cyano-Cyclopropyl Moieties as Promising Replacements for the Cyclohexenone Headgroup. *European Journal of Organic Chemistry* 2018: 1416–1425.
- Frye, C. A., D. Tang, and R. W. Innes. 2001.** Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 373–378.
- Gamble, R. L., M. L. Coonfield, and G. E. Schaller. 1998.** Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 95: 7825–7829.
- Gartner, A., K. Nasmyth, and G. Ammerer. 1992.** Signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae* requires tyrosine and threonine phosphorylation of FUS3 and KSS1. *Genes & development* 6: 1280–1292.
- Ghassemian, M., E. Nambara, S. Cutler, H. Kawaide, Y. Kamiya, and P. McCourt. 2000.** Regulation of Abscisic Acid Signaling by the Ethylene Response Pathway in Arabidopsis. *Plant Cell* 12: 1117–1126.
- Gonzalez-Guzman, M., G. A. Pizzio, R. Antoni, F. Vera-Sirera, E. Merilo, G. W. Bassel, M. A. Fernández, M. J. Holdsworth, M. A. Perez-Amador, H. Kollist, and P. L. Rodriguez. 2012.** Arabidopsis PYR/PYL/RCAR receptors play a major



- role in quantitative regulation of stomatal aperture and transcriptional response to abscisic acid. *Plant Cell* 24: 2483–2496.
- Grondin, A., O. Rodrigues, L. Verdoucq, S. Merlot, N. Leonhardt, and C. Maurel. 2015.** Aquaporins Contribute to ABA-Triggered Stomatal Closure through OST1-Mediated Phosphorylation. *The Plant cell* 27: 1945–1954.
- Groot, B. L. de, T. Frigato, V. Helms, and H. Grubmüller. 2003.** The mechanism of proton exclusion in the aquaporin-1 water channel. *Journal of Molecular Biology* 333: 279–293.
- Groszmann, M., A. de Rosa, W. Chen, J. Qiu, S. A. McGaughey, C. S. Byrt, and J. R. Evans. 2023.** A high-throughput yeast approach to characterize aquaporin permeabilities: Profiling the Arabidopsis PIP aquaporin sub-family. *Front. Plant Sci.* 14: 1078220.
- Hachez, C., D. Veselov, Q. Ye, H. Reinhardt, T. Knipfer, W. Fricke, and F. Chaumont. 2012.** Short-term control of maize cell and root water permeability through plasma membrane aquaporin isoforms. *Plant, cell & environment* 35: 185–198.
- Hadidi, H., R. Kamali, and A. Binesh. 2021.** Investigation of the aquaporin-2 gating mechanism with molecular dynamics simulations. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 89: 819–831.
- Hua, J., and E. M. Meyerowitz. 1998.** Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* 94.
- Huleihel, M., M. Goldsborough, J. Cleveland, M. Gunnell, T. Bonner, and U. R. Rapp. 1986.** Characterization of murine A-raf, a new oncogene related to the v-raf oncogene. *Molecular and cellular biology* 6: 2655–2662.
- Ian C. Dodd. 2013.** Abscisic acid and stomatal closure: a hydraulic conductance conundrum? *The New phytologist* 197: 6–8.
- Ichimura, K., S. Kazuo, T. Guillaume, J. S. M, H. Yves, C. Anthony, K. Martin, Z. Shuqun, H. Heribert, W. Cathal, H.-B. Erwin, E. E. Brian, C. M. Peter, W. I. Roger, R. E. Joseph, S. Dierk, F. K. Daniel, M. Yasunori, M. John, and John, C Walker et al. 2002.** Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* 7: 301–308.
- Ishikawa, F., S. Suga, T. Uemura, M. H. Sato, and M. Maeshima. 2005.** Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS letters* 579: 5814–5820.

- Jahn, T. P., A. L. B. Møller, T. Zeuthen, L. M. Holm, D. A. Klaerke, B. Mohsin, W. Kühlbrandt, and J. K. Schjoerring. 2004.** Aquaporin homologues in plants and mammals transport ammonia. *FEBS letters* 574: 31–36.
- Janosi, L., and M. Ceccarelli. 2013.** The gating mechanism of the human aquaporin 5 revealed by molecular dynamics simulations. *PLOS ONE* 8: e59897.
- Jasechko, S., Z. D. Sharp, J. J. Gibson, S. J. Birks, Y. Yi, and P. J. Fawcett. 2013.** Terrestrial water fluxes dominated by transpiration. *Nature* 496: 347–350.
- Javot, H., V. Lauvergeat, V. Santoni, F. Martin-Laurent, J. Güçlü, J. Vinh, J. Heyes, K. I. Franck, A. R. Schäffner, D. Bouchez, and C. Maurel. 2003.** Role of a single aquaporin isoform in root water uptake. *The Plant cell* 15: 509–522.
- Johanson, U., M. Karlsson, I. Johansson, S. Gustavsson, S. Sjövall, L. Fraysse, A. R. Weig, and P. Kjellbom. 2001.** The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology* 126: 1358–1369.
- Johansson, I., M. Karlsson, V. K. Shukla, M. J. Chrispeels, C. Larsson, and P. Kjellbom. 1998.** Water Transport Activity of the Plasma Membrane Aquaporin PM28A Is Regulated by Phosphorylation. *The Plant cell* 10: 451–459.
- Jozefkowicz, C., M. C. Berny, F. Chaumont, and K. Alleva. Heteromerization of Plant Aquaporins, pp. 29–46. In Plant Aquaporins, Springer, Cham.**
- Kang, J., J.-U. Hwang, M. Lee, Y.-Y. Kim, S. M. Assmann, E. Martinoia, and Y. Lee. 2010.** PDR-type ABC transporter mediates cellular uptake of the phytohormone abscisic acid. *PNAS* 107: 2355–2360.
- Kende, H., E. van der Knaap, and H.-T. Cho. 1998.** Deepwater Rice: A Model Plant to Study Stem Elongation. *Plant Physiol* 118: 1105–1110.
- Kim, T.-H., M. Böhmer, H. Hu, N. Nishimura, and J. I. Schroeder. 2010.** Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO<sub>2</sub>, and Ca<sup>2+</sup> signaling. *Annual review of plant biology* 61: 561–591.
- Kozono, D., X. Ding, I. Iwasaki, X. Meng, Y. Kamagata, P. Agre, and Y. Kitagawa. 2003.** Functional expression and characterization of an archaeal aquaporin. AqpM from methanothermobacter marburgensis. *The Journal of biological chemistry* 278: 10649–10656.
- Krzywińska, E., M. Bucholc, A. Kulik, A. Ciesielski, M. Lichocka, J. Dębski, A. Ludwików, M. Dadlez, P. L. Rodriguez, and G. Dobrowolska. 2016.**

- Phosphatase ABI1 and okadaic acid-sensitive phosphoprotein phosphatases inhibit salt stress-activated SnRK2.4 kinase. *BMC Plant Biol* 16: 1–12.
- Kukulski, W., A. D. Schenk, U. Johanson, T. Braun, B. L. de Groot, D. Fotiadis, P. Kjellbom, and A. Engel. 2005.** The 5A structure of heterologously expressed plant aquaporin SoPIP2;1. *Journal of Molecular Biology* 350: 611–616.
- Lee, S. C., W.-Z. Lan, B.-G. Kim, L. Li, Y. H. Cheong, G. K. Pandey, G. Lu, B. B. Buchanan, and S. Luan. 2007.** A protein phosphorylation/dephosphorylation network regulates a plant potassium channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104: 15959–15964.
- Lee, S.-J., M. H. Lee, J.-I. Kim, and S. Y. Kim. 2015.** Arabidopsis putative MAP kinase kinase kinases Raf10 and Raf11 are positive regulators of seed dormancy and ABA response. *Plant & cell physiology* 56: 84–97.
- Lewis, T. S., P. S. Shapiro, and N. G. Ahn. 1998.** Signal transduction through MAP kinase cascades. *Advances in cancer research* 74: 49–139.
- Li, X.-J., M.-F. Yang, H. Chen, L.-Q. Qu, F. Chen, and S.-H. Shen. 2010.** Abscisic acid pretreatment enhances salt tolerance of rice seedlings: proteomic evidence. *Biochimica et biophysica acta* 1804: 929–940.
- Lin, Z., Y. Li, Y. Wang, X. Liu, L. Ma, Z. Zhang, C. Mu, Y. Zhang, L. Peng, S. Xie, C.-P. Song, H. Shi, J.-K. Zhu, and P. Wang. 2021.** Initiation and amplification of SnRK2 activation in abscisic acid signaling. *Nat Commun* 12.
- Lin, Z., Y. Li, Z. Zhang, X. Liu, C.-C. Hsu, Y. Du, T. Sang, C. Zhu, Y. Wang, V. Satheesh, P. Pratibha, Y. Zhao, C.-P. Song, W. A. Tao, J.-K. Zhu, and P. Wang. 2020.** A RAF-SnRK2 kinase cascade mediates early osmotic stress signaling in higher plants. *Nature communications* 11: 613.
- Luo, Zhizhong Chen, Junping Gao, and Zhizhong Gong. 2014.** Abscisic acid inhibits root growth in Arabidopsis through ethylene biosynthesis. *The Plant Journal* 79: 44–55.
- Ma, Y., I. Szostkiewicz, A. Korte, D. Moes, Y. Yang, A. Christmann, and E. Grill. 2009.** Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324: 1064–1068.
- MacRobbie, E. A. 1998.** Signal transduction and ion channels in guard cells. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences* 353: 1475–1488.

- Marais, R., and C. J. Marshall. 1996.** Control of the ERK MAP kinase cascade by Ras and Raf. *Cancer surveys* 27: 101–125.
- Maurel, C., Y. Boursiac, D.-T. Luu, V. Santoni, Z. Shahzad, and L. Verdoucq. 2015.** Aquaporins in Plants. *Physiological reviews* 95: 1321–1358.
- Maurel, C., H. Javot, V. Lauvergeat, P. Gerbeau, C. Tournaire, V. Santoni, and J. Heyes. 2002.** Molecular physiology of aquaporins in plants. *International review of cytology* 215: 105–148.
- Maurel, C., R. T. Kado, J. Guern, and M. J. Chrispeels. 1995.** Phosphorylation regulates the water channel activity of the seed-specific aquaporin alpha-TIP. *The EMBO journal* 14: 3028–3035.
- Maurel, C., J. Reizer, J. I. Schroeder, and M. J. Chrispeels. 1993.** The vacuolar membrane protein gamma-TIP creates water specific channels in *Xenopus* oocytes. *The EMBO journal* 12: 2241–2247.
- Maurel, C., F. Tacnet, J. Güclü, J. Guern, and P. Ripoche. 1997.** Purified vesicles of tobacco cell vacuolar and plasma membranes exhibit dramatically different water permeability and water channel activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94: 7103–7108.
- Maurel, C., L. Verdoucq, D.-T. Luu, and V. Santoni. 2008.** Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual review of plant biology* 59: 595–624.
- Melcher, K., Y. Xu, L.-M. Ng, X. E. Zhou, F.-F. Soon, V. Chinnusamy, K. M. Suino-Powell, A. Kovach, F. S. Tham, S. R. Cutler, J. Li, E.-L. Yong, J.-K. Zhu, and H. E. Xu. 2010.** Identification and mechanism of ABA receptor antagonism. *Nature structural & molecular biology* 17: 1102–1108.
- Milborrow, B. V. 1967.** The identification of (+)-abscisin II (+)-dormin in plants and measurement of its concentrations. *Planta* 76: 93–113.
- Moussatche, P., and H. J. Klee. 2004.** Autophosphorylation Activity of the Arabidopsis Ethylene Receptor Multigene Family\*. *Journal of Biological Chemistry* 279: 48734–48741.
- Murata, Y., I. C. Mori, and S. Munemasa. 2015.** Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism. *Annual review of plant biology* 66: 369–392.
- Murozuka, E., S. Hanisch, T. G. Pomorski, T. P. Jahn, and J. K. Schjoerring. 2013.** Bimolecular fluorescence complementation and interaction of various

Arabidopsis major intrinsic proteins expressed in yeast. *Physiologia plantarum* 148: 422–431.

**Mustilli, A.-C., S. Merlot, A. Vavasseur, F. Fenzi, and J. Giraudat. 2002.**

Arabidopsis OST1 protein kinase mediates the regulation of stomatal aperture by abscisic acid and acts upstream of reactive oxygen species production. *Plant Cell* 14: 3089–3099.

**Nakhoul, N. L., B. A. Davis, M. F. Romero, and W. F. Boron. 1998.** Effect of expressing the water channel aquaporin-1 on the CO<sub>2</sub> permeability of *Xenopus* oocytes. *The American journal of physiology* 274: C543-8.

**Nambara, E., H. Kawaide, Y. Kamiya, and S. Naito. 1998.** Characterization of an *Arabidopsis thaliana* mutant that has a defect in ABA accumulation: ABA-dependent and ABA-independent accumulation of free amino acids during dehydration. *Plant & cell physiology* 39: 853–858.

**Nambara, E., and A. Marion-Poll. 2005.** Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual review of plant biology* 56: 165–185.

**Nilson, S. E., and S. M. Assmann. 2007.** The control of transpiration. Insights from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 143: 19–27.

**Nyblom, M., A. Frick, Y. Wang, M. Ekvall, K. Hallgren, K. Hedfalk, R. Neutze, E. Tajkhorshid, and S. Törnroth-Horsefield. 2009.** Structural and Functional Analysis of SoPIP2;1 Mutants Adds Insight into Plant Aquaporin Gating. *Journal of Molecular Biology* 387: 653–668.

**Ohkuma, K., J. L. Lyon, F. T. Addicott, and O. E. Smith. 1963.** Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science* 142: 1592–1593.

**Park, S.-Y., P. Fung, N. Nishimura, D. R. Jensen, H. Fujii, Y. Zhao, S. Lumba, J. Santiago, A. Rodrigues, T.-f. F. Chow, S. E. Alfred, D. Bonetta, R. Finkelstein, N. J. Provart, D. Desveaux, P. L. Rodriguez, P. McCourt, J.-K. Zhu, J. I. Schroeder, B. F. Volkman, and S. R. Cutler. 2009.** Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324: 1068–1071.

**Péret, B., G. Li, J. Zhao, L. R. Band, U. Voß, O. Postaire, D.-T. Luu, O. Da Ines, I. Casimiro, M. Lucas, D. M. Wells, L. Lazzerini, P. Nacry, J. R. King, O. E. Jensen, A. R. Schäffner, C. Maurel, and M. J. Bennett. 2012.** Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nat Cell Biol* 14: 991–998.

- Prak, S., S. Hem, J. Boudet, G. Viennois, N. Sommerer, M. Rossignol, C. Maurel, and V. Santoni. 2008.** Multiple phosphorylations in the C-terminal tail of plant plasma membrane aquaporins: role in subcellular trafficking of AtPIP2;1 in response to salt stress. *Molecular & cellular proteomics : MCP* 7: 1019–1030.
- Preston, G. M., T. P. Carroll, W. B. Guggino, and P. Agre. 1992.** Appearance of water channels in *Xenopus* oocytes expressing red cell CHIP28 protein. *Science* 256: 385–387.
- Qiu, J., S. A. McGaughey, M. Groszmann, S. D. Tyerman, and C. S. Byrt. 2020.** Phosphorylation influences water and ion channel function of AtPIP2;1. *Plant, cell & environment*.
- Raghavendra, A. S., V. K. Gonugunta, A. Christmann, and E. Grill. 2010.** ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science* 15: 395–401.
- Rapp, U. R., M. D. Goldsborough, G. E. Mark, T. I. Bonner, J. Groffen, F. H. Reynolds, and J. R. Stephenson. 1983.** Structure and biological activity of v-raf, a unique oncogene transduced by a retrovirus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 80: 4218–4222.
- Raschke, K. 1975.** Stomatal Action. *Annu. Rev. Plant. Physiol.* 26: 309–340.
- Robinson, D. G., H.-P. Haschke, G. Hinz, B. Hoh, M. Maeshima, and F. Marty. 1996.** Immunological detection of tonoplast polypeptides in the plasma membrane of pea cotyledons. *Planta* 198: 95–103.
- Robinson, M. J., and M. H. Cobb. 1997.** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Current Opinion in Cell Biology* 9: 180–186.
- Roeder, J., J. Liu, I. Doch, M. Ruschhaupt, A. Christmann, E. Grill, H. Helmke, S. Hohmann, S. Lehr, J. Frackenpohl, and Z. Yang. 2023.** Abscisic acid agonists suitable for optimizing plant water use. *Front. Plant Sci.* 13: 1071710.
- Rossomando, A. J., D. M. Payne, M. J. Weber, and T. W. Sturgill. 1989.** Evidence that pp42, a major tyrosine kinase target protein, is a mitogen-activated serine/threonine protein kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 86: 6940–6943.
- Ruschhaupt, M., J. Mergner, S. Mucha, M. Papacek, I. Doch, S. V. Tischer, D. Hemmler, D. Chiasson, K. H. Edel, J. Kudla, P. Schmitt-Kopplin, B. Kuster, and E. Grill. 2019.** Rebuilding core abscisic acid signaling pathways of *Arabidopsis* in yeast. *The EMBO journal* 38: e101859.

- Santiago, J., F. Dupeux, A. Round, R. Antoni, S.-Y. Park, M. Jamin, S. R. Cutler, P. L. Rodriguez, and J. A. Márquez. 2009.** The abscisic acid receptor PYR1 in complex with abscisic acid. *Nature* 462: 665–668.
- Santoni, V., L. Verdoucq, N. Sommerer, J. Vinh, D. Pflieger, and C. Maurel. 2006.** Methylation of aquaporins in plant plasma membrane. *Biochemical Journal* 400: 189–197.
- Saruhashi, M., T. Kumar Ghosh, K. Arai, Y. Ishizaki, K. Hagiwara, K. Komatsu, Y. Shiwa, K. Izumikawa, H. Yoshikawa, T. Umezawa, Y. Sakata, and D. Takezawa. 2015.** Plant Raf-like kinase integrates abscisic acid and hyperosmotic stress signaling upstream of SNF1-related protein kinase2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: E6388-96.
- Schaeffer, H. J., and M. J. Weber. 1999.** Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Molecular and cellular biology* 19: 2435–2444.
- Shahzad, Z., M. Canut, C. Tournaire-Roux, A. Martinière, Y. Boursiac, O. Loudet, and C. Maurel. 2016.** A Potassium-Dependent Oxygen Sensing Pathway Regulates Plant Root Hydraulics. *Cell* 167: 87-98.e14.
- Shahzad, Z., C. Tournaire-Roux, M. Canut, M. Adamo, J. Roeder, L. Verdoucq, A. Martinière, A. Amtmann, V. Santoni, E. Grill, O. Loudet, and C. Maurel. 2023.** Protein kinase SnRK2.4 is a key regulator of aquaporins and root hydraulics in Arabidopsis. *The Plant Journal*.
- Soma, F., F. Takahashi, S. Kidokoro, H. Kameoka, T. Suzuki, Y. Uga, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2023.** Constitutively active B2 Raf-like kinases are required for drought-responsive gene expression upstream of ABA-activated SnRK2 kinases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 120: e2221863120.
- Soma, F., F. Takahashi, T. Suzuki, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2020.** Plant Raf-like kinases regulate the mRNA population upstream of ABA-unresponsive SnRK2 kinases under drought stress. *Nature communications* 11: 1373.
- Soon, F.-F., L.-M. Ng, X. E. Zhou, G. M. West, A. Kovach, M. H. E. Tan, K. M. Suino-Powell, Y. He, Y. Xu, M. J. Chalmers, J. S. Brunzelle, H. Zhang, H. Yang, H. Jiang, J. Li, E.-L. Yong, S. Cutler, J.-K. Zhu, P. R. Griffin, K.**

- Melcher, and H. E. Xu. 2012.** Molecular mimicry regulates ABA signaling by SnRK2 kinases and PP2C phosphatases. *Science (New York, N.Y.)* 335: 85–88.
- Steudle, E., and C. A. Peterson. 1998.** How does water get through roots? *J Exp Bot* 49: 775–788.
- Sui, H., B.-G. Han, J. K. Lee, P. Walian, and B. K. Jap. 2001.** Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. *Nature* 414: 872–878.
- Takahashi, Y., J. Zhang, P.-K. Hsu, P. H. O. Ceciliato, L. Zhang, G. Dubeaux, S. Munemasa, C. Ge, Y. Zhao, F. Hauser, and J. I. Schroeder. 2020.** MAP3Kinase-dependent SnRK2-kinase activation is required for abscisic acid signal transduction and rapid osmotic stress response. *Nature communications* 11: 12.
- Tanaka, Y., T. Sano, M. Tamaoki, N. Nakajima, N. Kondo, and S. Hasezawa. 2005.** Ethylene Inhibits Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure in Arabidopsis. *Plant Physiol* 138: 2337–2343.
- Tilman, D., K. G. Cassman, P. A. Matson, R. Naylor, and S. Polasky. 2002.** Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature* 418: 671–677.
- Tischer, S. V., C. Wunschel, M. Papacek, K. Kleigrewe, T. Hofmann, A. Christmann, and E. Grill. 2017.** Combinatorial interaction network of abscisic acid receptors and coreceptors from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114: 10280–10285.
- Toriyama, T., A. Shinozawa, Y. Yasumura, M. Saruhashi, M. Hiraide, S. Ito, H. Matsuura, K. Kuwata, M. Yoshida, T. Baba, I. Yotsui, T. Taji, D. Takezawa, and Y. Sakata. 2022.** Sensor histidine kinases mediate ABA and osmostress signaling in the moss *Physcomitrium patens*. *Current Biology* 32: 164-175.e8.
- Törnroth-Horsefield, S., K. Hedfalk, G. Fischer, K. Lindkvist-Petersson, and R. Neutze. 2010.** Structural insights into eukaryotic aquaporin regulation. *FEBS letters* 584: 2580–2588.
- Törnroth-Horsefield, S., Y. Wang, K. Hedfalk, U. Johanson, M. Karlsson, E. Tajkhorshid, R. Neutze, and P. Kjellbom. 2006.** Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature* 439: 688–694.
- Umezawa, T., N. Sugiyama, M. Mizoguchi, S. Hayashi, F. Myouga, K. Yamaguchi-Shinozaki, Y. Ishihama, T. Hirayama, and K. Shinozaki. 2009.**



Type 2C protein phosphatases directly regulate abscisic acid-activated protein kinases in Arabidopsis. PNAS 106: 17588–17593.

- Vahisalu, T., H. Kollist, Y.-F. Wang, N. Nishimura, W.-Y. Chan, G. Valerio, A. Lamminmäki, M. Brosché, H. Moldau, R. Desikan, J. I. Schroeder, and J. Kangasjärvi. 2008.** SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. Nature 452: 487–491.
- Wang, C., H. Hu, X. Qin, B. Zeise, D. Xu, W.-J. Rappel, W. F. Boron, and J. I. Schroeder. 2016.** Reconstitution of CO<sub>2</sub> Regulation of SLAC1 Anion Channel and Function of CO<sub>2</sub>-Permeable PIP<sub>2</sub>;1 Aquaporin as CARBONIC ANHYDRASE4 Interactor. The Plant cell 28: 568–582.
- Wang, H., S. Schoebel, F. Schmitz, H. Dong, and K. Hedfalk. 2020.** Characterization of aquaporin-driven hydrogen peroxide transport. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes 1862: 183065.
- Wang, W., A. E. Hall, R. O'Malley, and A. B. Bleeker. 2003.** Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from Arabidopsis is not required for signal transmission. Proceedings of the National Academy of Sciences 100: 352–357.
- Wang, W. X., B. Vinocur, O. Shoseyov, and A. Altman. 2001.** BIOTECHNOLOGY OF PLANT OSMOTIC STRESS TOLERANCE PHYSIOLOGICAL AND MOLECULAR CONSIDERATIONS. Acta Hortic.: 285–292.
- Wellbrock, C., Maria Karasarides, and Richard Marais. 2004.** The RAF proteins take centre stage. Nat Rev Mol Cell Biol 5: 875–885.
- Widmann, C., S. Gibson, M. B. Jarpe, and G. L. Johnson. 1999.** Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. Physiological reviews 79: 143–180.
- Yang, Z., J. Liu, S. V. Tischer, A. Christmann, W. Windisch, H. Schnyder, and E. Grill. 2016.** Leveraging abscisic acid receptors for efficient water use in Arabidopsis. PNAS 113: 6791–6796.
- Yasumura, Y., R. Pierik, S. Kelly, M. Sakuta, L. A. C. J. Voesenek, and N. P. Harberd. 2015.** An Ancestral Role for CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 Proteins in Both Ethylene and Abscisic Acid Signaling. Plant Physiology 169: 283–298.
- Yoshida, T., Y. Fujita, K. Maruyama, J. MOGAMI, D. TODAKA, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2015.** Four Arabidopsis AREB/ABF transcription

factors function predominantly in gene expression downstream of SnRK2 kinases in abscisic acid signalling in response to osmotic stress. *Plant, cell & environment* 38: 35–49.

- Yoshida, T., Y. Fujita, H. Sayama, S. Kidokoro, K. Maruyama, J. Mizoi, K. Shinozaki, and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2010.** AREB1, AREB2, and ABF3 are master transcription factors that cooperatively regulate ABRE-dependent ABA signaling involved in drought stress tolerance and require ABA for full activation. *The Plant Journal* 61: 672–685.
- Yukutake, Y., and M. Yasui. 2010.** Regulation of water permeability through aquaporin-4. *Neuroscience* 168: 885–891.
- Zhang, D.-P. (ed.). 2014.** *Abscisic acid: metabolism, transport and signaling.* Springer, Dordrecht.
- Zhang, X. L., L. Jiang, Q. Xin, Y. Liu, J. X. Tan, and Z. Z. Chen. 2015.** Structural basis and functions of abscisic acid receptors PYLs. *Front. Plant Sci.* 6: 129460.
- Zhao, L., and F. D. Sack. 1999.** Ultrastructure of stomatal development in *Arabidopsis* (Brassicaceae) leaves. *Am. J. Bot.* 86: 929–939.
- Zhao, Y., Z. Zhang, J. Gao, P. Wang, T. Hu, Z. Wang, Y.-J. Hou, Y. Wan, W. Liu, S. Xie, T. Lu, L. Xue, Y. Liu, A. P. Macho, W. A. Tao, R. A. Bressan, and J.-K. Zhu. 2018.** *Arabidopsis* Duodecuple Mutant of PYL ABA Receptors Reveals PYL Repression of ABA-Independent SnRK2 Activity. *Cell reports* 23: 3340-3351.e5.

## 7 Danksagung

Zu allererst möchte ich mich besonders bei Herrn Prof. Dr. Erwin Grill bedanken, dass er mir die Chance gegeben hat, meine Dissertation an seinem Lehrstuhl anzufertigen. Ich bedanke mich für die intensive wissenschaftliche Betreuung und seine konstruktiven Vorschläge und Projektideen während meiner Doktorandenzeit, die sicherlich zu einem besseren Abschluss dieser Arbeit geführt haben.

Weiterhin möchte ich Prof. Dr. Kay Schneitz danken, dass er sich sofort bereit erklärt hat die Zweitkorrektur dieser Arbeit zu übernehmen und ebenfalls für die amüsanten Gesprächsthemen während der Mittagspausen.

Ich danke Prof. Dr. Gerd Patrick Bienert für die Übernahme des Prüfungsvorsitzes in diesem Promotionsverfahren, aber vor allem auch für die uneingeschränkte Unterstützung durch seine fachliche Expertise und hilfreichen Tipps bei der Durchführung meiner Versuche an seinem Lehrstuhl.

Prof. Dr. Christophe Maurel und Dr. Lionel Verdoucq danke ich, für die tollen Erfahrungen die ich in Frankreich erleben durfte, ihre Gastfreundschaft, sowie die Hilfe und Fachkenntnis bei dem Erlernen neuer Methoden.

Danke, an alle meine Kollegen des Lehrstuhls für Botanik, für die ganzen tollen Aktivitäten, die die Zeit am Lehrstuhl so viel besser und zu etwas Unvergesslichem gemacht haben. Ich bin sehr glücklich euch hier alle kennengelernt zu haben.

Lisa, danke für dein immer offenes Ohr für alle (gemeinsamen) Probleme und, dass ich von dir immer eine ehrliche Meinung erwarten kann. Den Spaß, den ich mit dir bei unseren diversen Therapiesitzungen und anderen Events hatte, werde ich immer bestens in Erinnerung behalten :).

Martin, danke für deine Standhaftigkeit beim (gemeinsamen) Biertrinken, deine gute Laune am Lehrstuhl (außer vor Besprechungen) und deine (guten) Witze während diverser Balkonpausen, sowie für diverse Bier- & PlayStation-Abende.

Isa, meine ehemalige Bürokollegin, die mich leider für einen deutlich schlechteren Bürokollegen im Stich gelassen hat. Danke, für deinen Optimismus und deine Begeisterung vor allem während der Faschingszeit.

Moritz, danke für deine Ratschläge zu Beginn meiner Dissertation, die mir so vieles erleichtert haben, sowie für das Hefesystem, ohne das ich viele Erkenntnisse in dieser

Arbeit gar nicht hätte gewinnen können. Die Zeit unserer Überschneidung am Lehrstuhl war leider viel zu kurz aber du standest mir auch danach noch mit Rat und Tat zur Seite. Einen besseren Mentor hätte ich mir fast nicht wünschen können ;).

Michl, Steffi und Aaron, danke für eure vielen hilfreichen Kommentare, die ich euch „alten Hasen“ abgewinnen konnte und die Motivation immer weiter zu machen, nicht nur beim Bier trinken.

Chrisi, Lisa H. und Beate, die guten Seelen des Lehrstuhls. Chrisi, vielen Dank für die Unterstützung bei diversen Klonierungen, die nicht immer einfach waren und deine Hilfe und Tipps bei vielen kleineren Problemchen. Danke für deine fast immer positive Stimmung, deinen Elan und die amüsanten Geschichten aus der jüngsten Vergangenheit, die ich auch gerne öfter von dir gehört habe. Lisa H. danke ich, für die Unterstützung bei sämtlichen pflanzlichen Problemen, sowie für ihre Positivität und Standhaftigkeit. Beate, vielen Dank bei der Unterstützung sämtlicher organisatorischer Dinge, ohne dich würde vieles nicht so schnell und reibungslos laufen.

*Last but not least* möchte ich mich noch ganz besonders bei meiner Familie und meinen Freunden für die langjährige Unterstützung und Motivation während dieser Zeit bedanken.