

Abstract

Trichome formation on leaves of *Arabidopsis thaliana* has become an established model system to investigate *de novo* patterning processes in plants. Several proteins, mainly transcription factors, modulate epidermal cell differentiation and can be grouped into two classes: activators, which promote trichome formation, and inhibitors, which repress epidermal cell differentiation into trichomes. A Myb/bHLH/WD40 protein complex constitutes the core machinery for both activation and inhibition of trichome development dependent on the type of the Myb transcription factor. This study addresses the question, how the patterning protein complexes are composed *in vitro* and *in vivo*. A lot of dimeric protein-protein interactions between patterning proteins have been proven by yeast-two-hybrid studies, bimolecular fluorescence complementation experiments, and co-precipitation assays, but no multimeric protein complexes has been shown so far. Therefore, three different eukaryotic expression systems have been tested in order to gain reasonable amounts of patterning proteins and to show protein complexes under native protein conditions. As a result, HEK cells were the most promising expression system to investigate patterning protein complexes.

Many aspects of trichome developmental processes resemble the principles of an activator-inhibitor model that can explain *de novo* patterning. This mathematical model involves activators, inhibitors, and a crucial autocatalytic feed-back loop of the activator. However, no biological analogy has been identified for the feed-back loop of the activator. The basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor GLABRA3 (GL3) can be viewed as the core component of patterning protein complexes, thereby being a putative candidate for the autocatalytic regulation. In order to investigate the regulation of *GL3*, I considered two different aspects. On the one hand, I analyzed the promoter region of *GL3* that is able to rescue the trichome mutant phenotype and could identify a 5' 1 kb promoter region in

combination with the second intron of *GL3* to play the crucial role in the transcriptional regulation of *GL3*. On the other hand, I investigated the DNA-binding properties of the GL3 protein and showed that the putative DNA-binding domain of GL3, the bHLH domain, is not involved in trichome patterning by performing mutant complementation studies and promoter regulation experiments using a GL3 derivative that lacks the bHLH domain.

Zusammenfassung

Die Trichomentwicklung auf den Blättern von *Arabidopsis thaliana* hat sich zum Modellsystem zur Untersuchung von *de novo* Musterbildungsprozessen in Pflanzen etabliert. Mehrere Proteine, hauptsächlich Transkriptionsfaktoren, regulieren die eipdermale Zelldifferenzierung und können in zwei Klassen eingeordnet werden: Aktivatoren, die die Trichombildung fördern, und Inhibitoren, die die epidermal Zelldifferenzierung in Trichomen unterdrücken. Ein Myb/bHLH/WD40-Proteinkomplex stellt abhängig vom jeweiligen Typ des Myb-Transkriptionsfaktors die Kernmaschinerie für sowohl die Aktivierung als auch die Inhibition der Trichomentwicklung dar. Diese Arbeit beschäftigt sich mit der Frage, wie sich Musterbildungsproteinkomplexe *in vitro* und *in vivo* zusammensetzen. Eine ganze Reihe von dimeren Protein-Protein-Interaktionen zwischen Musterbildungsproteinen konnten bereits mittels Hefe-Zwei-Hybrid-Studien, bimolekularer Fluoreszenzkomplementation und Co-Immunoprecipitation belegt werden. Dennoch wurden noch keine multimeren Musterbildungsproteinkomplexe aufgezeigt. Daher wurden drei verschiedene eukaryotische Protein-Expressionssysteme in dieser Arbeit getestet, inwieweit sie sich für die Proteinaufreinigung in vernünftiger Menge und das Aufzeigen von Proteinkomplexen eignen. Letztlich stellte sich heraus, dass die Proteinaufreinigung in HEK-Zellen der vielversprechendste Ansatz ist, um Musterbildungsproteinkomplexe zu untersuchen.

Viele Aspekte der Entwicklungsprozesse von Trichomen ähneln den Prinzipien eines Aktivator-Inhibitor-Modells, das *de novo* Musterbildung erklären kann. Dieses mathematische Modell beinhaltet Aktivatoren, Inhibitoren und eine entscheidende autokatalytische Rückwärtsschleife des Aktivators. Der bHLH (basic helix-loop-helix) Transkriptionsfaktor GLABRA3 (GL3) kann als Kernkomponente der Musterbildungsproteinkomplexe angesehen werden und stellt damit einen potentiellen Kandidaten für die Rückwärts-Schleife des

Aktivators dar. Die Regulation von *GL3* wurde unter Berücksichtigung zweier Aspekte untersucht. Zum einen wurde die Promoterregion von *GL3* analysiert, die ausreichend ist, um den mutanten Trichomphänotyp zu retten. Dabei stellte sich heraus, dass eine 5' 1 kb Promoterregion in Verbindung mit dem zweite Intron von *GL3* entscheidend sind. Zum anderen wurden die DNA-Bindungseigenschaften von GL3 untersucht, wobei durch Promoterregulierungsexperimente und Mutantenkomplementation mit einem GL3 Derivat ohne die potentielle DNA-Bindedomäne des GL3-Proteins, die bHLH-Domäne, gezeigt wurde, dass diese Domäne in der Trichommusterbildung keine entscheidende Funktion ausübt.