

# **The contribution of an *RCO* enhancer to the diversification of leaf shape**

**Inaugural-Dissertation**

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

**Alessandro Popoli**

aus Trento, Italien

Köln, März 2024

**Berichterstatter:** Prof. Dr. Miltos Tsiantis  
(Gutachter) Prof. Dr. Siegfried Roth

**Prüfungsvorsitzende:** Prof. Dr. Ute Höcker

**Schriftführer:** Dr. David Wilson

**Tag der mündlichen Prüfung:** 16. Juni 2023

Die vorliegende Arbeit wurde am Max-Planck-Institut für Pflanzenzüchtungsforschung in Köln, in der Abteilung für Vergleichende Entwicklungsgenetik, in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Miltos Tsiantis angefertigt.



## Zusammenfassung

*Cardamine hirsuta* *REDUCED COMPLEXITY* (*RCO*) entstand durch eine Duplikation von *LATE MERISTEM IDENTITY1* (*LMII*) und erwarb eine neue Rolle als Schlüsselregulator der Blattkomplexität. Kürzlich demonstrierten transgene Ansätze, dass diskrete paraloge Enhancer-Sequenzen stromaufwärts von *RCO* (*ChRCOenh<sup>500</sup>*) und *LMII* (*ChLMIIenh<sup>500</sup>*) ausreichend sind, um die jeweiligen Expressionsdomänen der beiden Gene anzutreiben. Transgene Ansätze deuteten auch darauf hin, dass diese Sequenzen für die Expression von *ChRCO* und *ChLMII* notwendig sind. Dennoch sind die spezifischen Funktionalitäten und Eigenschaften dieser regulatorischen Sequenzen allein auf Basis von Transgenen schwer zu erschließen. Um dieses Problem zu lösen, ist es wesentlich zu verstehen, inwieweit diese regulatorischen Elemente notwendig sind, um die endogenen *RCO*- und *LMII* korrekt zu exprimieren, und spezifischere Sequenzen zu definieren, die zu ihren distinktiven Funktionen beitragen. Hier beabsichtige ich, diese Frage mithilfe eines auf CRISPR/Cas9 basierenden zielgerichteten genetischen Ansatzes anzugehen. Die Ergebnisse zeigen, dass Mutationen im *LMII*-Enhancer häufig zu Loss-of-Function-Phänotypen und einer Reduktion der *LMII*-Transkriptlevel führen. Im Gegensatz dazu verursachen Mutationen im *RCO*-Enhancer ein viel breiteres Spektrum an phänotypischer Variation, häufig korreliert mit erhöhter Blattzerlegung und *RCO*-Expressionsleveln und nur in wenigen Fällen mit schwachen Loss-of-Function-Phänotypen. Diese Beobachtungen legen nahe, dass der *RCO*-Enhancer mehr negative regulatorische Elemente als seine *LMII*-Paraloge entwickelt hat und dass seine regulatorische Aktivität wahrscheinlich durch redundante cis-wirkende Elemente abgepuffert wurde. Zusätzlich präsentiere ich Belege dafür, dass die negative Regulation von *RCO* zumindest teilweise entwickelt wurde, um die *RCO*-Expression im *LMII*-Domäne zu unterdrücken. Somit steht *RCO* als exzellentes Beispiel für Neofunktionalisierung nach Duplikation da, hauptsächlich erlangt durch das Umgestalten seiner cis-regulatorischen Elemente.