

# Understanding the role of *RCO* and *KNOXI* genes in diversification of leaf form using single-cell profiling

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Köln

vorgelegt von

***Nora Papadima-Karanikou***

aus

Athen, Griechenland

Köln, September 2023

# Abstract

A key question in developmental biology is how evolutionary changes on transcriptional networks of key developmental genes can lead to morphological diversity. In *Cardamine hirsuta*, leaflet formation requires the expression of *REDUCED COMPLEXITY (RCO)* and *Knotted-1 like homeobox* genes (*KNOXI*) in the developing leaf. Lack of expression in the leaves of *A. thaliana* is accompanied by a simple leaf morphology. Introduction of *RCO* and the *KNOXI* transcription factor *SHOOTMERISTEMLESS*, in *A. thaliana* leaves is sufficient to increase leaf complexity in a way that resembles the wild-type leaf of *C. hirsuta*. In this study we sought to understand whether these two genetic pathways can lead to cell-type reprogramming in the developing leaf and what are the underlying transcriptional networks that provide the necessary background for their action. By exploiting the high resolution of a single-cell RNA sequencing profiling approach, we showed that in the *C. hirsuta* leaf primordium single-cell atlas, the majority of *KNOXI* and *RCO* expressing cells were incorporated in two clusters with distinct underlying cellular identity. Comparative studies between *C. hirsuta* and *A. thaliana* single-cell leaf primordia atlases, revealed that the cell-type on which *RCO* acts on is conserved across the two crucifers, whereas *KNOXI* gene expression led to the formation of a distinct cluster in *C. hirsuta* that was absent in *A. thaliana* leaf primordia. We hypothesised that the presence of *RCO* in *C. hirsuta* might act on reorganising the molecular features of this conserved cell-type, altering their cellular growth and differentiation to allow for leaflets to form. By comparing the single cell transcriptomes of *RCO* expressing cells to those of the *chrco* mutant, we identified candidate genes related to *RCO* function and tested their involvement in complex leaf formation. Finally, by profiling the single cell transcriptome of *A. thaliana* young seedlings including the shoot apical meristem (SAM), we were able to show that the *KNOXI* cell-type found in the complex leaves of *C. hirsuta* is not evolutionary novel, but rather homologous to the cell-type formed by *KNOXI* expression in the SAM. The formation of this cell-type might still be necessary for *KNOXI* mediated complex leaf formation, since *STM* expression in *A. thaliana* developing leaves is sufficient to establish the formation of a cluster transcriptionally similar to the *KNOXI* cluster of the *C. hirsuta* wild-type leaf primordium. To conclude, our work has advanced our understanding on cell-type differences underpinning the development of *C. hirsuta* and *A. thaliana* distinct leaf forms. Furthermore, it provides insights on how the key regulators of leaf complexity, *RCO* and *KNOXI* genes, influence the cell-type composition of developing leaf primordia.

# Zusammenfassung

Eine zentrale Frage der Entwicklungsbiologie ist, wie evolutionäre Veränderungen in transkriptionellen Netzwerken entwicklungsbiologisch wichtiger Gene zur morphologischen Vielfalt führen können. In *Cardamine hirsuta* erfordert die Bildung von Blättchen die Expression von *REDUCED COMPLEXITY (RCO)* und Knotted-1-like Homeobox-Genen (*KNOXI*) im sich entwickelnden Blatt. Ein Fehlen der Expression in den Blättern von *Arabidopsis thaliana* geht mit einer einfachen Blattmorphologie einher. Die Einführung von *RCO* und dem *KNOXI*-Transkriptionsfaktor *SHOOTMERISTEMLESS* in *A. thaliana*-Blättern ist ausreichend, um die Blattkomplexität in einer Weise zu erhöhen, die dem Wildtypblatt von *C. hirsuta* ähnelt. In dieser Studie wollten wir verstehen, ob diese beiden genetischen Wege zur Umprogrammierung von Zelltypen im sich entwickelnden Blatt führen können und welche zugrunde liegenden transkriptionellen Netzwerke die notwendige Grundlage für ihre Wirkung bieten. Durch die Nutzung der hohen Auflösung eines single-cell-RNA-Sequenzierungsansatzes haben wir gezeigt, dass im single-cell-Atlas des *C. hirsuta* Blattprimordiums die Mehrheit der *KNOXI*- und *RCO*-exprimierenden Zellen in zwei Clustern mit unterschiedlicher zugrunde liegender zellulärer Identität integriert wurden. Vergleichende Studien zwischen den single-cell-Atlanten der Blattprimordien von *C. hirsuta* und *A. thaliana* zeigten, dass der Zelltyp, auf den *RCO* wirkt, in beiden Kreuzblütlern konserviert ist, während die *KNOXI*-Genexpression zur Bildung eines in *A. thaliana* Blattprimordien nicht vorhandenen Clusters in *C. hirsuta* führte. Wir vermuteten, dass das Vorhandensein von *RCO* in *C. hirsuta* auf die Reorganisation der molekularen Merkmale dieses konservierten Zelltyps einwirken könnte, wodurch deren Zellwachstum und Differenzierung verändert werden, um die Bildung von Blättchen zu ermöglichen. Durch den Vergleich der single-cell-Transkriptome von *RCO*-exprimierenden Zellen mit von *chrco*-Mutanten identifizierten wir Kandidatengene, die mit der Funktion von *RCO* in Zusammenhang stehen und testeten deren Beteiligung an der komplexen Blattbildung. Schließlich konnten wir durch das Profiling des single-cell-Transkriptoms junger Keimlinge von *A. thaliana*, einschließlich des apikalen Sprossmeristems (SAM), zeigen, dass der in den komplexen Blättern von *C. hirsuta* gefundene *KNOXI*-Zelltyp nicht evolutionär neu ist, sondern homolog zu dem Zelltyp ist, der durch *KNOXI*-Expression im SAM gebildet wird. Die Bildung dieses Zelltyps könnte weiterhin notwendig für die *KNOXI*-vermittelte komplexe Blattbildung sein, da die *STM*-Expression in sich entwickelnden *A. thaliana*-Blättern ausreicht, um die Bildung eines Clusters zu etablieren, das transkriptionell dem *KNOXI*-Cluster des Wildtyp-Blattprimordiums von *C. hirsuta* ähnelt. Zusammenfassend hat unsere Arbeit das Verständnis der Zelltyppopulationen, die der Entwicklung der unterschiedlichen Blattformen von *C. hirsuta* und *A. thaliana* zugrunde liegen, erweitert. Darüber hinaus liefert sie Einblicke, wie die Hauptregulatoren der Blattkomplexität, die *RCO*- und *KNOXI*-Gene, die Zusammensetzung der Zelltypen in sich entwickelnden Blattprimordien beeinflussen.