

University of Groningen

Characterisation of the M-locus and functional analysis of the male-determining gene in the housefly

Wu, Yanli

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2018

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Wu, Y. (2018). *Characterisation of the M-locus and functional analysis of the male-determining gene in the housefly*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Nederlandse samenvatting

De huisvlieg (*Musca domestica*) is bij uitstek geschikt als modelsysteem om de evolutie van geslachtschromosomen en geslachtsbepalingsmechanismen te bestuderen, doordat het beschikt over een polymorfisch geslachtsbepalingsmechanisme. Het gen voor mannelijkheid, oftewel *M*-factor, ligt normaliter op het Y-chromosoom maar kan ook voorkomen op een van de autosomen of zelfs het X-chromosoom. Onlangs is één *M*-factor voor mannelijke ontwikkeling geïdentificeerd door genexpressieverschillen tussen mannelijke en vrouwelijke embryo's te bestuderen. Dit gen is tot *Mdmd* gedoopt, voor *Musca domestica male determiner*. *Mdmd* lijkt te zijn ontstaan vanuit een duplicatie van het *CWC22*-gen (ook wel bekend als *nucampholin* (*ncm*) in insecten), wat een hoofdrol speelt in het spliceosoom dat de posttranscriptionele splitsing van mRNA regelt. Om de genomische organisatie en functie van de verschillende *M*-loci verder te bestuderen, heb ik mij in dit proefschrift toegelegd op de volgende vragen over de structuur en functie van *Mdmd*: Wat is de genomische organisatie van *M*-loci op verschillende chromosomen? Wat is de coderende sequentie van *Mdmd*? Hoe sterk geconserveerd zijn de verschillende *M*-loci? Hoe staan *Mdmd* en zijn paraloog *CWC22/nucampholin* qua evolutie met elkaar in verband? Waar en wanneer komt *Mdmd* tot expressie? Is activiteit van *Mdmd* voldoende om mannelijke ontwikkeling van individuen te bewerkstelligen?

Hoewel *Mdmd* was geïdentificeerd als het gen voor mannelijkheid van huisvliegen, was de complete DNA-sequentie van het gen en de positie binnen het *M*-locus nog niet bekend. In **Hoofdstuk 2** onderzoek ik de gecompliceerde samenstelling van het *M*-locus in twee huisvliegpopulaties waarin het *M*-locus op een autosoom ligt, te weten M^{III} (waarin het *M*-locus op autosoom III ligt) en M^V (waarin het op autosoom V ligt). Hierbij ontdekte ik dat *M*-loci bestaan uit meerdere kopieën van homologe sequenties, hoewel de mate van homologie variabel was. Op basis van homologie waren verschillende groepen te classificeren binnen zowel het M^{III} -locus als het M^V -locus. Daarnaast werden enkele sequenties in beide loci gevonden. Op basis van deze gedeelde sequenties kon ik een 'open reading frame' (ORF) ontdekken die deel lijkt uit te maken van het *Mdmd*-gen (**Hoofdstuk 3**). Ik heb sequenties met hoge mate van gelijkenis met het *Mdmd*-gen gevonden in het M^{II} - en het M^Y -locus (*M*-locus op respectievelijk autosoom II en het Y-chromosoom), maar niet in het M^I -locus (*M*-locus op autosoom I). Op het laatstgenoemde locus ligt waarschijnlijk een andere gen voor mannelijkheid. Voor de andere *M*-loci suggereert de gelijkenis met het *Mdmd*-gen dat deze loci ook het *Mdmd*-gen bevatten. Het geïdentificeerde ORF wordt verondersteld het coderende deel van het *Mdmd*-gen te zijn, oftewel het functionele mannelijkheidsgen.

De veranderlijkheid van geslachtschromosomen is een van de interessante fenomenen in de evolutie van geslachtsbepalingsmechanismen. Geslachts-

chromosomen worden verondersteld te ontstaan uit een autosomaal chromosomenpaar, waartussen recombinitie ophoudt nadat zij een geslachtsbepalende functie verkregen hebben. Het is nog niet goed bekend waardoor zulke evolutionaire veranderingen aangedreven worden. Mijn resultaten duiden er op dat geslachtschromosomen van *M. domestica* evolueren volgens het geboorte-verval-hergeboorte-model. De gelijkenissen tussen *Mdmd^{II}*, *Mdmd^{III}*, *Mdmd^V* en *Mdmd^Y* duiden op één gezamenlijke vooroudersequentie. *Mdmd* vertoont een hoge mate van gelijkheid met het splicing-regulerende gen *CWC22/nucampholin*. De vergelijking tussen de aminozuursequentie van het *Mdmd*-eiwit en het *CWC22*-eiwit zoals beschreven in **Hoofdstuk 3** suggereert dat *Mdmd* is ontstaan vanuit een duplicatie van het *CWC22*-gen. Het is nog niet bekend of dit gebeurde op het oorspronkelijke Y-chromosoom of op een autosoom.

In de volgende fase van de evolutie van Y-chromosomen wordt verwacht dat de recombinitie tussen het X- en het Y-chromosoom stopt rondom de *Mdmd*-regio, waarna er onder meer repetitieve DNA-sequenties en transposons kunnen ophopen. In de regio rondom *Mdmd* vind ik inderdaad zulke transponerende en repetitieve elementen terug (**Hoofdstuk 2**). Daarnaast lijkt *Mdmd* zelf meermaals te zijn geamplificeerd, aangezien in mannetjes van de *M^{III}*- en *M^V*-lijn meerdere opeenvolgende kopieën zijn aangetroffen. Nadat deze waren geamplificeerd heeft dit *M*-locus mogelijk meerdere keren als cluster verplaatst van het Y-chromosoom naar de autosomen, en eventueel heeft het zich vervolgens van het ene autosoom naar het andere verplaatst. Door deze translocaties werden effectief gezien nieuwe Y-chromosomen gecreëerd. In **Hoofdstuk 2** beschrijf ik eveneens dat de verschillende autosomale *M*-loci van elkaar verschillen, wat er op duidt dat na de translocatie van het oorspronkelijke *M*-locus de verschillende autosomale kopieën verder geëvolueerd zijn. De aanwezigheid van meerdere verschillende autosomale *M*-loci in huisvliegen maakt deze soort tot een uitstekend model om de eerste stappen van de evolutie van geslachtschromosomen te bestuderen.

Omdat *Mdmd* cruciaal lijkt te zijn voor de ontwikkeling van het mannelijke geslacht, is het nodig om te bepalen wanneer *Mdmd* tot expressie komt gedurende de embryonale ontwikkeling om te begrijpen hoe het gereguleerd wordt binnen het systeem voor geslachtsbepaling. In **Hoofdstuk 4** toon ik aan dat *Mdmd* gedurende de embryonale ontwikkeling in het gehele embryo tot expressie komt, wat er op duidt dat *Mdmd* in de vroege embryonale stadia actief wordt en dat het daarna continu actief moet blijven in embryo's om mannelijke ontwikkeling teweeg te brengen. Door *Mdmd*-expressie te verminderen toonden Sharma et al. (2017) aan dat *Mdmd* nodig is voor mannelijke ontwikkeling, en wanneer de expressie van *Mdmd* compleet werd uitgeschakeld ontwikkelden

embryo's zich uitsluitend tot vrouwtjes. Hoewel dit aantoont dat *Mdmd* nodig is voor mannelijke ontwikkeling, was het hieruit nog niet duidelijk of uitsluitend de activiteit van *Mdmd* genoeg is voor mannelijke ontwikkeling. Om te testen of *Mdmd* genoeg is voor mannelijke ontwikkeling injecteerde ik mRNA van het *Mdmd*^V-gen in embryo's van de *M^{III}*-lijn gedurende de eerste fases van hun ontwikkeling en testte ik of dit mannelijkheid veroorzaakte in genetisch vrouwelijke individuen (**Hoofdstuk 4**). Deze vorm van tijdelijke expressie van *Mdmd*^V in genetisch vrouwelijke embryo's leek niet te leiden tot mannelijke ontwikkeling, hoewel er wel een lichte (maar insignificante) toename in het aantal mannelijke nakomelingen gevonden werd onder de geïnjecteerde embryo's. Dit suggereert dat het injecteren van *Mdmd*^V-mRNA niet voldoende was om mannelijke ontwikkeling te veroorzaken, of dat de translatie van geïnjecteerd *Mdmd*^V-mRNA te inefficiënt was. Een andere manier waarmee de mannelijkheid-bepalende werking van *Mdmd*^V beter bestudeerd zou kunnen worden is het samenstellen van een *piggyBac* transgene lijn. Hiermee zou *Mdmd*^V gedurende de gehele levensloop van huisvliegen tot expressie gebracht kunnen worden. In **Box 4.1** beschrijf ik de constructie van de transgene lijn pBac[3×P3-EGFP, hsp70-*Mdmd*^V]. Deze zal in de toekomst gebruikt worden om nauwkeuriger vast te stellen of en hoe *Mdmd*^V mannelijke ontwikkeling veroorzaakt.

Mijn werk heeft laten zien dat de *M*-loci van huisvliegen bestaan uit complexe structuren, en heeft bijgedragen aan onze kennis van de evolutie van geslachtschromosomen in de huisvlieg in het specifiek en insecten in het algemeen.