

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.

Deutsche Zusammenfassung

Die Stubenfliege, *Musca domestica*, ist besonders geeignet, um die Evolution der Geschlechtsdetermination und der Geschlechtschromosomen zu untersuchen, weil sie ein polymorphes Geschlechtsdeterminationssystem besitzt. Der männlich bestimmende *M*-Locus, typischerweise auf dem Y-Chromosom lokalisiert, kann auch auf jedem der fünf Autosomen oder sogar auf dem X-Chromosom vorkommen. Basierend auf differenziellen Expressionsanalysen wurde kürzlich ein männlich determinierendes Gen identifiziert und als *Mdmd* (*Musca domestica* male determiner) bezeichnet. *Mdmd* scheint aus einer Duplikation des spleiß-regulierenden Gens *CWC22* entstanden zu sein, das bei Insekten auch *nucampholin* (*ncm*) genannt wird. Um die *M*-Loci in Bezug auf genomische Organisation und Funktion näher zu charakterisieren, stellte ich mehrere Fragen zur Struktur und Funktion von *Mdmd*: Wie ist die genomische Organisation der *M*-Loci auf verschiedenen Chromosomen? Was ist die codierende Sequenz von *Mdmd*? Inwiefern sind die verschiedenen *M*-Loci konserviert? Wie ist die evolutionäre Verwandtschaft zwischen *Mdmd* und dem paralogen *CWC22/nucampholin*? Ist *Mdmd* hinreichend für die männliche Determinationsfunktion?

Obwohl *Mdmd* als männlich bestimmendes Gen in der Stubenfliege identifiziert wurde, war die vollständige Sequenz von *Mdmd* und seine Einbettung in den *M*-Locus zunächst noch unbekannt. In Kapitel 2 habe ich die komplexe Natur von *M*-Loci in zwei autosomalen *M*-Stämmen untersucht, *M^{III}* (*M*-Locus auf dem Autosom III) und *M^V* (*M*-Locus auf dem Autosom V). Dabei fand ich heraus, dass die *M*-Loci multiple Kopien verschiedener *Mdmd*-Sequenzen enthalten, mit variierenden Sequenzähnlichkeiten untereinander. Besonders interessant erschien, dass der *M^{III}*-Locus und der *M^V*-Locus gemeinsame Sequenzen teilen. Auf der Basis dieser gemeinsamen Sequenzen konnte ich ein offenes Leseraster (open reading frame, ORF) identifizieren, das Teil des *Mdmd*-Gens ist (Kapitel 3). Sequenzen mit hoher Ähnlichkeit zu dem *Mdmd*-ORF wurden auch im *M^{II}*-Stamm (*M*-Locus auf Autosom II) und im *M^Y*-Stamm (*M*-Locus auf dem Y-Chromosom) entdeckt, jedoch nicht auf dem *M^I*-Stamm (*M*-Locus auf Autosom I), welcher vermutlich ein anderes männlich bestimmendes Gen hat. Es ist davon auszugehen, dass dieser ORF die kodierende Sequenz von *Mdmd* darstellt, dem funktionalen männlich bestimmenden Gen.

Die Verantwortlichkeit und zugleich Veränderlichkeit der Geschlechtschromosomen ist ein bemerkenswerter Aspekt der Evolution der Geschlechtsdetermination. Man nimmt an, dass sich die Geschlechtschromosomen aus normalen Autosomen evolviert haben, die ihre Rekombinationsfähigkeit verloren haben, nachdem sie die geschlechtsbestimmende Rolle angenommen hatten. Die treibende Kraft bei der Entstehung neuer Geschlechtschromosomen ist jedoch nicht bekannt. Meine Ergebnisse aus *Musca domestica* unterstützen

das Geburt-Verfall-Wiedergeburt-Modell in der Evolution der Geschlechtschromosomen. Die hohe Sequenzähnlichkeit von *Mdmd^{II}*, *Mdmd^{III}*, *Mdmd^V* und *Mdmd^V* lässt vermuten, dass alle *Mdmd*-Gene von einer gemeinsamen Vorläufersequenz stammen. Ein Vergleich der *Mdmd*-Proteinsequenzen mit dem paralogen CWC22/NCM in Kapitel 3 lässt ein Szenario vermuten, wonach in der *M*-Locus-Evolution das männlich bestimmende Gen *Mdmd* aus einer einmaligen Duplizierung von *Md-ncm* evolvierte und so ein Proto-Y-Chromosom entstand. Ob dies auf dem ursprünglichen Y-Chromosom oder auf einem autosomalen Chromosomenpaar geschah, das vorher nicht in die Geschlechtsdetermination involviert war, kann zu diesem Zeitpunkt noch nicht entschieden werden.

Das nächste Stadium in der Evolution zu einem Y-Chromosom wäre die Unterdrückung der Rekombinationsfähigkeit in der Umgebung der *Mdmd*-Region, gefolgt von einer Anhäufung repetitiver Sequenzen und Transposons, bedingt durch den Mangel an Rekombination auf dem Proto-Geschlechtschromosom. Im Einklang mit diesem Modell fand ich, dass die *M*-Loci in den *Mdmd^{III}* und *Mdmd^V* Stämmen transponible Elemente und repetitive Sequenzen enthalten (Kapitel 2). Die darauf folgende Amplifikation des *Mdmd* scheint zu einer komplexen Struktur des *M*-Locus geführt zu haben, da mehrere tandemartig wiederholte Kopien des *Mdmd* in Männchen der *Mdmd^{III}* und *Mdmd^V* Stämme gefunden wurden (Kapitel 2). Nach der Amplifikation wurde der *M*-Locus wohl mehrfach als ein Cluster transloziert, vom Y auf ein Autosom und/oder anschließend zwischen Autosomen, die dann zu Neo-Y-Chromosomen werden. Außerdem offenbarten die in Kapitel 2 aufgeführten Daten, dass einige ausgedehnte unterschiedliche Sequenzen in den verschiedenen Autosomen vorliegen, was nahelegt, dass der *M*-Locus nach der Translokation weiteren unabhängigen genomischen Veränderungen auf jedem Autosom unterworfen war. Die Existenz mehrerer unterschiedlicher autosomaler *M*-Varianten in der Stubenfliege stellt eine einmalige Gelegenheit dar für weitere Studien zu den frühen Stadien der Evolution von Geschlechtschromosomen.

Da *Mdmd* ein entscheidendes Gen für die männliche Entwicklung ist, sollte die *Mdmd* mRNA-Expression in verschiedenen embryonalen Entwicklungsstadien identifiziert werden, um die Regulierung der Geschlechtsdetermination besser zu verstehen. In Kapitel 4 zeige ich das ubiquitäre Vorkommen von *Mdmd* mRNA während der gesamten embryonalen Entwicklung. Dies lässt darauf schließen dass *Mdmd* bereits zu einem sehr frühen embryonalen Stadium wirkt aber kontinuierlich im Embryo aktiv sein muss, um die männliche Entwicklung aufrechtzuerhalten. Sharma et al. (2017) zeigten, dass eine gezielte Funktionsverlustmutation von *Mdmd* männliche Genotypen in weibliche Phänotypen verwandelt. Obwohl dies zeigte, dass *Mdmd* eine entscheidende Rolle in der männlichen Entwicklung spielt, bewies es nicht, dass *Mdmd* auch

hinreichend für die männliche Determination ist. Um zu untersuchen, ob *Mdmd* allein ausreichend ist, um die männlich bestimmende Funktion zu erfüllen, injizierte ich *Mdmd^V* mRNA in Embryonen im frühen blastodermalen Stadium, die vom *Mdmd^{III}* Stamm stammten, und untersuchte sie auf Geschlechts-umwandlung. Vorübergehende Expression von *Mdmd^V* mRNA in genetisch weiblichen Embryonen verursachte keine vermännlichten Fliegen, obwohl eine leichte (nicht signifikante) Zunahme von männlichen Nachkommen bei den injizierten Embryos zu verzeichnen war. Die Ergebnisse lassen entweder darauf schließen, dass *Mdmd^V* allein nicht ausreichend ist, um weibliche Genotypen in Männchen umzuwandeln, oder sie sind durch einen experimentellen Mangel bedingt, z.B. ungenügende Translation von *Mdmd^V* mRNA. Einen alternativen Ansatz, um zu bestimmen, ob die Expression von *Mdmd* ausreichend ist, um genetisch weibliche Genotypen in Männchen zu verwandeln, stellt die *piggyBac*-Keimbahn-Transformation dar, um eine wiederholte Expression von *Mdmd^V* während der Entwicklung zu ermöglichen. In Box 4.1 beschreibe ich, wie ich ein pBac[3×P3-EGFP, hsp70-*Mdmd^V*]-Transgen konstruiert habe. Dieses Transgen wird in zukünftigen Experimente eingesetzt werden, um die maskulinisierende Aktivität von *Mdmd^V* zu bestimmen.

Meine Arbeit hat neue Erkenntnisse zur komplexen Struktur der *M*-Loci in der Stubenfliege erbracht, und damit zur Evolution der Geschlechtschromosomen der Stubenfliege und der Insekten im Allgemeinen.