

University of Groningen

Toxic love

Rouhana, Jessy

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:

2019

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

Citation for published version (APA):

Rouhana, J. (2019). *Toxic love: Evolutionary genomics of the enigmatic Sex Peptide*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

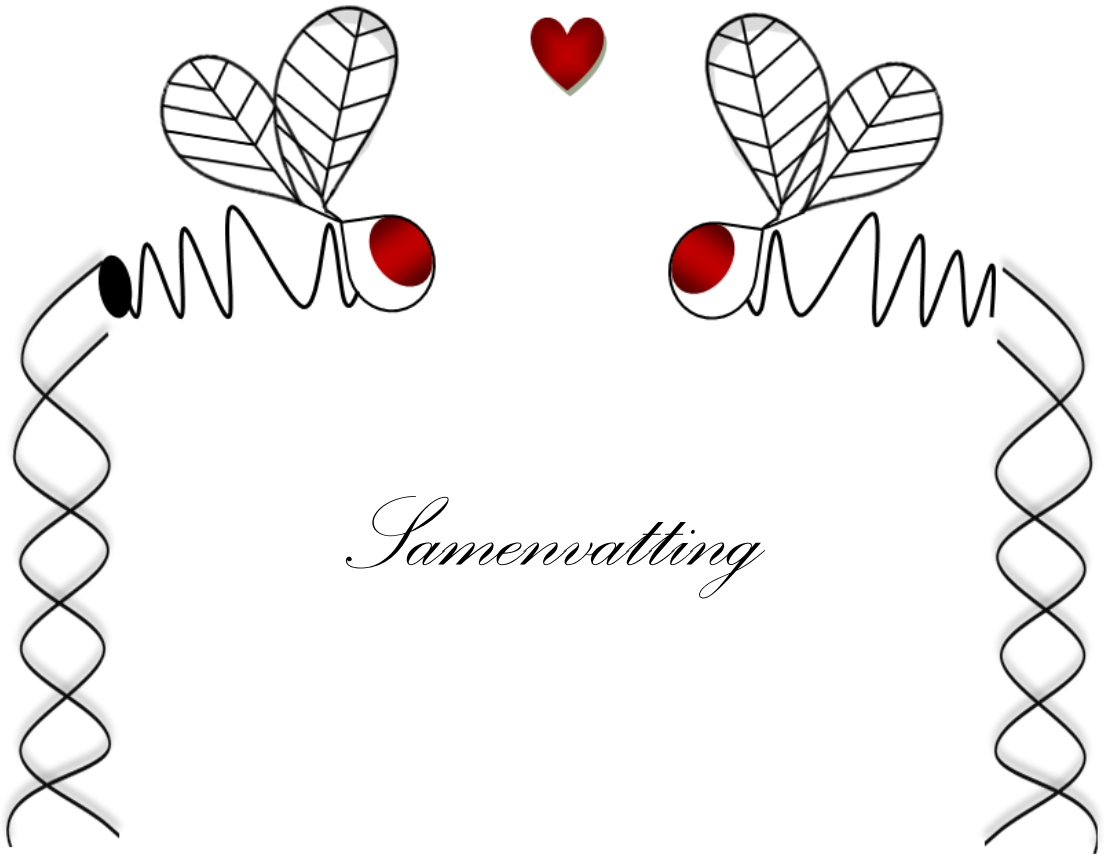
Other than for strictly personal use, it is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

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.



Samenvatting

Levende organismes concurreren om te kunnen overleven en om zich voort te kunnen planten. De meest aangepaste, of *fitte*, individuen zullen hierbij overleven en gedijen, terwijl de zwakste hier niet in slagen en zelfs kunnen sterven. Deze strijd op leven en dood vindt op verschillende niveaus plaats: zowel individuen van verschillende soorten als individuen van dezelfde soort concurreren met elkaar voor diverse beperkte bronnen zoals voedsel, broedplaatsen of partners. Een belangrijke vorm van competitie wordt gedreven door seksueel conflict en komt dikwijls voor wanneer de voorplantingsstrategieën van mannelijke en vrouwelijke individuen divergeren. De divergente voortplantingsstrategieën van beide seksen ontstaan wanneer deze verschillende evolutionaire belangen hebben, bijvoorbeeld bij de optimale voortplantingssnelheid, gameetgrootte of ouderlijke investering. Dit verschil in belangen heeft geleid tot de evolutie van verschillende strategieën om de manipulatie van de ene sekse door de andere sekse te overwinnen of te wijzigen, en ondertussen voldoende onderlinge samenwerking te behouden om succesvolle voortplanting te garanderen.

De manipulatie van één sekse door de andere met behulp van moleculaire interacties werd opgehelderd in onderzoek naar de fruitvlieg *Drosophila melanogaster*. Mannetjes kunnen hun kansen op vaderschap proberen te maximaliseren door in het sperma dat ze in het lichaam van het vrouwtje afgeven gedurende de paring zowel zaadcellen als sperma-eiwitten over te dragen. De zaadcellen en de eicellen kunnen beiden profiteren van de effecten van de eiwitten in het sperma, maar opvallend genoeg is dit niet altijd het geval. De sperma-eiwitten kunnen ook specifiek de belangen van de mannetjes bevorderen en kosten veroorzaken in vrouwtjes, resulterend in seksueel conflict. Zo wordt in *Drosophila melanogaster* in het lichaam van de vrouwtjes strijd geleverd over de uitkomst van een seksuele conflict, waarbij sperma-eiwitten invloed uitoefenen op vrouwtjes na de paring. Deze manipulatie door mannelijke fruitvliegen via moleculaire interacties kan aanzienlijke fysieke en fysiologische parings-kosten veroorzaken voor vrouwtjes. Eén raadselachtig eiwit in de spermavloeistof, het 'Sex Peptide' (oftewel 'Seks Eiwit') veroorzaakt een opvallende verscheidenheid in fysiologisch effecten en reproductief gedrag bij vrouwtjes. Sex Peptide activeert markante reacties na de paring, waaronder veranderde vruchtbaarheid, immuniteit, libido, eetgedrag en slaappatronen, door de activatie van een gevarieerd stel van genen.

In veel studies naar de moleculaire mechanismes waardoor vrouwtjes gemanipuleerd worden door de effecten van Sex Peptide, wordt genetische variatie geminimaliseerd opdat biologische functies duidelijk afgebakend kunnen worden. Om de evolutionaire processen en dynamiek, dat de door het Sex Peptide gemedieerde interacties tussen mannetjes en vrouwtjes karakteriseert, te kunnen begrijpen is het echter juist belangrijk om deze genetische variatie wél te bestuderen. Wij hebben de effecten van het Sex Peptide op het

fruitvliegen genoom opgespoord met *high throughput sequencing* technologie, waarbij genomen op grote schaal onderzocht kunnen worden, en dat middelen zoals >200 DGRP-lijnen (*Drosophila* Genome Reference Panel) met volledig bekende gen-sequenties heeft verschaft.

In dit proefschrift heb ik een diepgaand onderzoek uitgevoerd naar de fenotypische en genomische verschillen tussen 30-32 DGRP-lijnen, met betrekking tot de mannelijke afgifte van, en vrouwelijke reacties op, Sex Peptide. Ik heb de fenotypische variatie gemeten in de afgifte van Sex Peptide door mannetjes. In vrouwtjes heb ik de fenotypische variatie gemeten in immuunreactie, het leggen van eieren (eileg), de bereikbaarheid tot paring, en de levensduur, in reactie op het ontvangen van Sex Peptide. Om de specifieke reacties op Sex Peptide te meten, vergeleek ik de fenotypische reacties van vrouwtjes na de paring met de reacties van vrouwtjes die gepaard hadden met mannetjes die een niet-functioneel allel (*null-allele*) hadden voor Sex Peptide. Ik associeerde de gevonden fenotypes met variatie in het genoom met behulp van *Genome Wide Association Studies* (GWAS) en annotateerde de opgespoorde genetische varianten.

In hoofdstuk 2 ontwikkelden we een nieuwe kwantificatie-methode, de immuno-Q-PCR. We gebruikten we deze methode met succes om significante variatie aan te tonen tussen 31 DGRP lijnen in hoeveel Sex Peptide mannetjes afgaven tijdens het paren met een wild-type Dahomey vrouwtje. Ons onderzoek liet geen significante variatie zien in de wachttijd tot paring of de duur van de paring tussen mannetjes van de 31 DGRP-lijnen. Dit wijst erop dat de gevonden variatie in Sex Peptide overdracht niet veroorzaakt wordt door verschillen in paargedrag tussen de lijnen. We voerden een GWAS uit om te zoeken naar genetische varianten die geassocieerd waren met variatie in de afgifte van Sex Peptide. Deze analyse leverde significante associaties op tussen de afgifte van Sex Peptide en een groep van 54 kandidaat-genen. Een uitgebreide zoektocht naar gen-ontologie onthulde dat deze belangrijkste kandidaat-genen binnen de volgende functionele categorieën clusterden: ontwikkeling, membraan, eiwit en RNA-bewerking, en reproductie. Literatuuronderzoek naar het reproductie-cluster liet zien dat vier van de genen in dit cluster sperma-eiwitten waren. Enkele andere genen in het cluster hebben tot op heden onopgehelderde functies, twee zijn cyclische nucleotide phosphodiesterases die een rol in mannelijke vruchtbaarheid en vrouwelijk paargedrag lijken te hebben, enkele zijn betrokken bij kiemcelontwikkeling in mannetjes en/of vrouwtjes, en nog andere genen worden alleen tot uitdrukking gebracht in mannelijke testes en/of geslachtsklieren (*male accessory glands*) maar hebben een onbekende moleculaire en biologische functie. We veronderstellen dat de significante variatie die we waarnamen in de overdracht van Sex Peptide verband heeft met de rol van Sex Peptide in het mediëren van seksueel conflict. Dit is overeenkomstig met het idee dat seksueel conflict genetische variatie in reproductieve eigenschappen in stand kan houden.

Onze studie heeft nieuwe kandidaat-genen uitgelicht die niet eerder door andere methodes zijn opgespoord en mogelijk nieuwe associaties met Sex Peptide laten zien, bij het reguleren van vrouwelijke voorplanting en genexpressie na de paring.

Hoofdstuk 3 liet zien dat paring en de overdracht van Sex Peptide de expressie kan induceren in vrouwtjes van meerdere genen in de immuun respons, die coderen voor antimicrobiële peptides (AMP), en dat er tussen lijnen significante fenotypische variatie in deze reactie was. De inductie van, en variatie in, AMP genexpressie werd vastgesteld in isogene lijnen afkomstig uit twee verschillende *D. melanogaster* populaties (een Franse populatie en DGRP). De lijnen verschilden zowel in het wel of niet induceren van AMPs expressie na de paring, als in met welke mate ze dit deden na het ontvangen van Sex Peptide. In sommige lijnen werd de expressie zelfs naar beneden gereguleerd in vrouwtjes die gepaard hadden met een SP-producerend (SP⁺) mannetje, in vergelijking met maagdelijke vrouwtjes en met vrouwtjes die gepaard hadden met een mannetje die alle sperma-eiwitten kan produceren behalve SP (een SP⁰ mannetje). In andere lijnen had Sex Peptide geen enkel effect, of geen effect bovenop het effect van paring. Er waren bovendien verschillen tussen de drie immuun-genen die in detail getest werden: de genen die gereguleerd worden door de Imd signaal transductie keten (*signal transduction pathway*) (*Dtp-B*, *Mtk*) reageerden gevoeliger op Sex Peptide dan het gen waarvan regulatie onder controle staat van de Toll signaal transductie keten (*IMI*). De GWAS die we uitvoerden in de DGRP lijnen op de variatie in expressie van de antimicrobiële AMPs in reactie op Sex Peptide identificeerde 12 kandidaatgenen voor *Mtk* (Toll- en Imd-sigitaal transductie keten), 51 kandidaatgenen voor *Dtp-b* (Imd-sigitaal transductie keten) en 38 kandidaatgenen voor *IMI* (Toll-sigitaal transductie keten). Een netwerk analyse toonde aan dat de meerderheid van deze genen deel uitmaakt van verscheidene netwerken. Dit suggereert dat de meeste van deze genen meerdere verschillende functies hebben in het organisme, waarvan één rol de directe of indirecte modulatie van de immuunreactie kan zijn. Voor alle kandidaatgenen gold dat de genetische variatie significant geassocieerd was met variatie in de expressie van AMPs na paring of na ontvangst van Sex Peptide. De functionele annotatie liet zien dat 8 van de kandidaatgenen voor eiwitten uit de immunoglobulin-superfamilie coderen, en dat 8 andere genen de Imd-sigitaal transductie keten moduleren, waarvan 6 genen negatieve regulatoren zijn.

Hoofdstuk 4 liet zien dat in alle geteste DGRP lijnen de overdracht van Sex Peptide een duidelijk algeheel effect had: het deed de frequentie van her-paring significant afnemen, stimuleerde eileg en verlengde levensduur. De omvang van dit effect varieerde echter sterk tussen lijnen. Deze fenotypische variatie in reactie op Sex Peptide werd verder geanalyseerd met een GWAS, die bij elk van de gevonden fenotypes een set genen identificeerde die mogelijk betrokken waren bij de fenotypische variatie. Voor de

bereidheid tot paring identificeerde de GWAS 2 kandidaatgenen, waarvan er één de Jak/Stat signaal transductie keten reguleert. Er is echter geen duidelijke link met hoe deze genen invloed kunnen hebben op het verminderen tot de bereidbaarheid tot paring. Voor eileg werden er door middel van de GWAS in totaal 104 kandidaatgenen geïdentificeerd, waarvan er 13 direct betrokken zijn bij de ontwikkeling en regulatie van eileg, en de helft van de overgebleven genen komen sterk tot uitdrukking in vroege embryonale stadia. Als laatste legde de GWAS die we uitvoerden op mortaliteit als gevolg van uithongering (*starvation survival hazard ratio*) 2 kandidaatgenen bloot, waarvan het gen *daw* de volwassen levensduur bepaalt. Deze resultaten bevestigen de pleiotropische effecten waarmee Sex Peptide de reacties van vrouwtjes na de paring beïnvloedt. In tegenstelling tot de verwachting op basis van eerder onderzoek, veroorzaakte de ontvangst van Sex Peptide over het algemeen een verlenging, in plaats van een verkorting, van levensduur.

