



Universiteit
Leiden
The Netherlands

On the origin of 'bloopergenes': unraveling the evolution of the balanced lethal system in *Triturus newts*

Visser, M.C. de

Citation

Visser, M. C. de. (2025, March 5). *On the origin of 'bloopergenes': unraveling the evolution of the balanced lethal system in Triturus newts*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4196594>

Version: Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/4196594>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Swabbing of *Triturus cristatus*



© Christos Kazilas
(permission to use picture granted)

Appendix I: Nederlandse samenvatting

Algemene inleiding

In dit proefschrift wordt het evolutionaire raadsel genaamd een ‘gebalanceerd letaal systeem’ onderzocht. Dit fenomeen is het best beschreven in de literatuur van kam- en marmersalamanders (oftewel, soorten van het geslacht ‘*Triturus*’). Het syndroom, dat ook wel ‘chromosoom 1 syndroom’ genoemd wordt, is door wetenschappers in verband gebracht met het bestaan van twee zeer verschillende chromosoomversies binnen chromosomenpaar 1 (het langste chromosoom van de twaalf chromosomenparen die de salamanders bezitten). Er wordt vermoed dat beide versies van chromosoom 1 – ook wel 1A en 1B genoemd – unieke, essentiële genen missen, waardoor de helft van alle bevruchte eieren al sterven nog voordat ze kunnen uitkomen, omdat nakomelingen 50% kans hebben twee keer dezelfde versie te erven (en daarmee dus automatisch de essentiële genen op de alternatieve versie missen). Zo’n gebalanceerd letaal systeem lijkt in strijd met de basisprincipes van de evolutie: omdat een syndroom dat leidt tot een structureel verlies van 50% van de reproductieve output namelijk evolutionair gezien veel kost, is de verwachting dat de werking van natuurlijke selectie het ontstaan – en het voortbestaan – daarvan nooit zou toelaten. Echter, naar alle waarschijnlijkheid houdt het natuurlijke fenomeen al minstens 24 miljoen jaar stand. Dit is de aanname, omdat een gebalanceerd letaal systeem voorkomt in alle soorten die behoren tot de *Triturus* groep: een grote aanwijzing dat het ontstaan moet zijn in de gemeenschappelijke voorouder van deze groep.

Om de evolutie van dit systeem te begrijpen, levert dit proefschrift innovatieve methodes en inzichten. De studies in dit proefschrift zijn het resultaat van twee, overkoepelende doelen; 1) het streven naar het ontdekken – en het genetisch gezien ‘in kaart brengen’ – van de mutaties op de 1A en de 1B versie van chromosoom 1 (oftewel, het aantonen van de aan- en afwezigheid van bepaalde, essentiële genen die betrokken zijn bij het syndroom), en 2) het gebruiken van die informatie om door middel van empirisch, moleculair onderzoek tot nieuwe inzichten te komen over de evolutionaire oorsprong van het gebalanceerde letale systeem binnen *Triturus*. Deze studies – die in het Engels zijn gerapporteerd in dit proefschrift (als ‘Hoofdstuk 2’ t/m ‘Hoofdstuk 6’), die gepubliceerd zijn op een *preprint* server, en die op het moment van schrijven van dit proefschrift ter beoordeling zijn overhandigd aan wetenschappers via verscheidene, erkende, wetenschappelijke tijdschriften – worden hieronder verder samengevat.

Hoofdstuk 2: Een evolutionair raadsel – het dodelijke chromosoom 1 syndroom

Dit hoofdstuk introduceert het concept van het gebalanceerde letale systeem en legt uit hoe *Triturus* salamanders – ondanks het bizarre chromosoom 1 syndroom – toch kunnen voortbestaan. Normaal gesproken worden dodelijke mutaties (zoals het ‘missen’ van cruciale genen) namelijk ofwel sterk onderdrukt, ofwel geheel uit populaties verwijderd. Dit komt door de kracht van natuurlijke selectie: DNA dat goed werkt en tot veel nakomelingen leidt, wordt veelal doorgegeven – terwijl DNA dat tot kwaaltjes en dus minder nakomelingen leidt, over de generaties heen vanzelf verloren gaat. Echter, omdat in een gebalanceerd, letaal systeem alleen de heterozygote individuen (oftwel, de individuen met zowel een chromosoom 1A als een chromosoom 1B versie) overleven, lijkt natuurlijke selectie hier niet toe in staat. Dit komt omdat de twee verschillende chromosoomversies elkaar als het ware ‘opheffen’: versie 1A bevat bepaalde genen die essentieel zijn voor overleving, terwijl versie 1B deze genen mist – en andersom. Dit betekent allereerst dat alle homozygote embryo’s sterven, wat leidt tot een dramatisch verlies in reproductieve output, maar het betekent ook dat alle mutaties doorgegeven zullen blijven worden (want zowel 1A als 1B is nodig voor de overleving). Deze paradox roept de vragen op: wat zijn precies deze genen? En hoe komt zo een nadelig systeem in de natuur tot stand? Dit hoofdstuk werkt dan ook een theorie uit die uitlegt hoe chromosoom 1 syndroom op een geleidelijke manier zou kunnen ontstaan; namelijk door een graduele opeenstapeling van steeds meer mutaties in de homozygoten, wanneer heterozygoten al van een bepaald evolutionair voordeel genieten – tot het uiterlijke en onomkeerbare punt van dubbele, homozygote letaliteit (en gebalanceerde letaliteit) bereikt is. Het systeem is dan, als het ware, over de tijd heen ‘vastgeroest’.

Hoofdstuk 3: mxKASP genotypering als methode om embryo’s te classificeren

Om de genetische verschillen tussen de levensvatbare en de niet-levensvatbare *Triturus* embryo’s te onderzoeken, is een nieuwe genotyperingsmethode ontwikkeld: multiplex Kompetitive Allele-Specific PCR (ook wel ‘mxKASP’). Deze techniek maakt het mogelijk om op een snelle en grootschalige wijze vast te stellen of een *Triturus* embryo heterozygoot is en dus levensvatbaar is (d.w.z., een ‘1A1B’ of een ‘1B1A’ genotype heeft), of dat deze homozygoot is en dus niet-levensvatbaar is (d.w.z. een ‘1A1A’ of een ‘1B1B’ genotype heeft). Dit wordt gedaan aan de hand van het zichtbaar maken van zogenaamde ‘merkers’. Dit zijn stukjes DNA die geselecteerd kunnen worden omdat deze iets specifiek aantonen (in dit geval is één chromosoom 1A-specifieke merker, en één chromosoom 1B-specifieke merker gebruikt). Het toepassen van mxKASP is dus een cruciale stap in het onderzoek naar het gebalanceerde letale systeem in *Triturus*. De mxKASP methode wordt in dit hoofdstuk gevalideerd aan de hand van een soortgelijke test, namelijk een ‘standaard multiplex PCR’. In de praktijk, echter, is een PCR test een stuk tijdrovender en ook minder geschikt voor het genotyperen van grote aantallen

monsters tegelijk. De mxKASP methode is, naast in dit onderzoek naar chromosoom 1 syndroom, ook te gebruiken in andere genetische studies waar stukken genoom aan- of afwezig zijn. Dat kan door het gebruik van andere merkers. Zoals een studie in het kader van geslachtschromosomen en geslachtsverhoudingen binnen populaties (door in een XY-systeem, bijvoorbeeld, een X- en een Y-merker te onderzoeken).

Hoofdstuk 4: NewtCap – een efficiënte ‘DNA vangst’ methode voor salamanders

Omdat salamanders over extreem grote genomen (oftewel, extreem uitgebreide DNA codes) beschikken, is het analyseren van het hele genomen van meerdere individuen geen haalbare optie. Dat kan naar verwachting wel in de toekomst, maar kost vandaag de dag nog veel te veel geld, tijd, en rekenkracht van computers. Daarom is een alternatieve methode ontwikkeld waarmee bepaalde stukken uit het genoom – bijvoorbeeld genen met essentiële functies – in het specifiek worden geanalyseerd. In het Engels heet de overkoepelende methode ‘target capture’, omdat het gericht op zoek gaat naar stukjes (‘targets’) en deze ‘vangt’ (‘capture’). Omdat deze methode zich specifiek richt op watersalamander (‘newt’) DNA, heeft de methode de naam ‘NewtCap’ gekregen. In totaal kan NewtCap informatie opleveren over zo’n zeventuizend genen, en is de methode aantoonbaar toepasbaar op alle (d.w.z., meer dan honderd) watersalamandersoorten, inclusief die van het geslacht *Triturus*. De methode is dan ook cruciaal om de eerste genetische studies naar het gebalanceerde letale systeem mogelijk te maken, maar is tegelijkertijd eigenlijk nog veelbelovender. De data die met NewtCap verkregen kunnen worden, blijken namelijk waardevol voor diverse typen onderzoeken binnen de biologie, bijvoorbeeld fylogenomische en fylogeografische studies, en vraagstukken omtrent populatiebeheer, natuurbehoud, en soortenhybridisatie. Dit is van belang, aangezien veel soorten – juist door die problematische, grote ‘genomen’ – nog niet altijd goed onderzocht zijn. En aangezien salamanders – net als andere amfibieën – wereldwijd steeds meer bedreigd worden met uitsterven.

Hoofdstuk 5: PAV-spotter – het identificeren van structurele genetische variatie

Over het algemeen staat ‘genetische variatie’ bekend als de verschillen in DNA ‘letters’ (nucleotiden) op bepaalde posities in de genetische code van verschillende individuen of soorten. Maar genetische variatie bestaat óók op een grotere schaal. Er wordt in dat geval van ‘structurele variatie’ gesproken. Een bepaalde vorm van structurele variatie is de aan- of afwezigheid van stukken DNA code (in het Engels heet dit ‘Presence/Absence Variation’, afgekort: ‘PAV’). Dit kan gaan over bijvoorbeeld hele genen, wat ons bij het overkoepelende onderzoek naar gebalanceerde, letale systemen brengt. Om namelijk op zoek te gaan naar genen die afwezig zijn van chromosoom 1A, maar aanwezig zijn op chromosoom 1B – en andersom – is een nieuwe bioinformatica tool ontwikkeld: ‘PAV-

spotter'. Deze tool gebruikt signaal-analyse om de aan- en afwezigheidsvariatie van genen in DNA data (gegenereerd met NewtCap, Hoofdstuk 4) van *Triturus* embryos (gegenotypeerd met mxKASP, Hoofdstuk 3) te detecteren. PAV-spotter blijkt succesvol in het identificeren van tientallen genen die compleet ontbreken op ófwel chromosoom 1A, ófwel chromosoom 1B. Dit bevestigt dat het gebalanceerde letale systeem wordt veroorzaakt door complementaire 'gaten' op beide chromosoomversies – en hoe dit zit wordt verder onderzocht in Hoofdstuk 6. De signaal-analyse aanpak stemt overigens uit een ander vakgebied, namelijk de elektrotechniek/akoestiek. Dat maakt dit hoofdstuk zeer multidisciplinair.

Hoofdstuk 6: De evolutionaire oorsprong van het gebalanceerde letale systeem

Dit empirische hoofdstuk biedt een aantal nieuwe inzichten in hoe het gebalanceerde letale systeem binnen *Triturus* genetisch in elkaar zit en is ontstaan. Om tot deze inzichten te komen, werden de methodes ontwikkeld in de voorgaande hoofdstukken strategisch samengebracht en ingezet. De resultaten uit dit hoofdstuk tonen aan dat de unieke 'gaten' op chromosoom 1A en 1B bij alle *Triturus* soorten vrijwel geheel consistent zijn, wat suggereert dat het systeem zich razendsnel heeft gevormd in een vroege gemeenschappelijke voorouder – en dat het daarna niet veel meer veranderd is. Dit ontkracht de theorie die uiteengezet werd in Hoofdstuk 2 dan ook direct. Daarnaast wijzen de uitkomsten van aanvullende analyses (zoals fylogenetische testen, evenals vergelijkingen met het DNA van andere watersalamandersoorten die nadrukkelijk niet lijden aan een gebalanceerd, letaal systeem) uit dat chromosoom 1 er een heel andere evolutionaire geschiedenis op nahoudt dan alle andere chromosomen uit het genoom *Triturus*-genoom. Chromosoom 1 toont namelijk een nauwe verwantschap aan met onder andere alpenwatersalamanders (van het geslacht '*Ichthyosaura*') – in plaats van met kleine watersalamanders (van het geslacht '*Lissotriton*'), waar de rest van het genoom het nauwst verwant aan is. Dat dit zo is, komt waarschijnlijk doordat in een ver verleden verschillende soorten watersalamanders onderling hybriden vormden, en dat in dat proces een heel chromosoom werd uitgewisseld (een extreme vorm van 'introgressie'). Het is nog onduidelijk of, en hoe, dit het ontstaan van chromosoom 1 syndroom precies heeft beïnvloedt, maar het is een opvallende bevinding die op zijn minst onderstreept dat chromosoom 1 een nog ingewikkeldere evolutie heeft doorstaan dan in eerste instantie verwacht werd. De resultaten uit dit hoofdstuk brengen dus nieuwe vragen teweeg, maar ondersteunen tezamen ook een verouderde theorie uit de literatuur waar nu weer nieuw leven in geblazen wordt: namelijk dat het gebalanceerde letale systeem van *Triturus* een uniek geval moet zijn van een plotselinge, evolutionaire 'fout'. En dat deze 'fout' vermoedelijk plaats vond in de voorouder van alle *Triturus* soorten, en in de vorm van een soort 'cytogenetisch ongeluk' (tijdens de vorming van geslachtscellen).

Algemene discussie + Bijlagen

Hoofdstuk 7 van dit proefschrift vat de belangrijkste inzichten samen en bespreekt de bredere impact van het onderzoek als geheel. De evolutie van gebalanceerde letale systemen blijft – ondanks dat er nieuwe inzichten zijn vergaard – nog niet volledig uitgestippeld. Echter, de resultaten van dit proefschrift vormen – na een periode van grofweg veertig jaar zonder veel wetenschappelijke vooruitgang op dit onderwerp – een aanzienlijke stap in het beter begrijpen van de genetische achtergrond van dit fenomeen. Hele genoom studies, in combinatie met RNA studies, zullen in de nabije toekomst nog meer duidelijkheid scheppen. Verder blijken de methoden en technieken die (grotendeels) specifiek voor dit onderzoek zijn ontwikkeld, breed toepasbaar buiten het *Triturus*-vraagstuk. Hier wordt in Hoofdstuk 3 t/m Hoofdstuk 6 dieper op ingegaan (zoals hierboven samengevat), maar in Hoofdstuk 7 wordt hierover verder uitgeweid. In het specifiek wordt aandacht besteed aan de volgende, bredere implicaties van het proefschrift:

1. **Vergelijkbare, genetische fenomenen** – De nieuwe inzichten over gebalanceerde letale systemen kunnen helpen bij het beter begrijpen van andere, soortgelijke genetische fenomenen waarbij heterozygote individuen voordelen hebben ten opzichte van homozygote individuen (bijvoorbeeld de evolutie van sikkelcelanemie in mensen, of ‘*heterosis*’ in planten/gewassen).
2. **Dierwelzijn in de pluimveehouderij** – De in dit onderzoek ontwikkelde genotypering methode ‘mxKASP’ kan mogelijk bijdragen aan zogenaamde *in ovo* (‘nog-in-het-ei’) geslachtsbepaling bij (leg)kippen, wat een ethisch alternatief zou kunnen bieden voor het massaal doden van mannelijke kuikens in de pluimvee-industrie. Dat levert momenteel namelijk regelmatig pijn en stress op bij deze dieren – en daarom wordt hard gezocht naar schaalbare en betaalbare oplossingen.
3. **Natuurbescherming en biodiversiteitsonderzoek** – De breed geteste ‘NewtCap’ technologie kan onder meer worden gebruikt voor het opdoen van evolutionaire kennis, het uitvoeren van genetische monitoring van wilde watersalamander populaties, en het ondersteunen van bijvoorbeeld kweekprogramma’s van bedreigde soorten. Dit alles is momenteel van groot belang, zeker gezien de huidige, drastische afname van amfibieën op globale schaal.
4. **Wetenschapscommunicatie en samenwerken** – De betrokkenheid van burgers (ook wel ‘*citizen scientists*’) en andere, gespecialiseerde groepen en organisaties buiten de academie, speelde een zeer belangrijke rol in de totstandkoming van dit proefschrift. Dit onderstreept het belang van interdisciplinaire samenwerking en publieksbetrokkenheid in de wetenschap.

Concluderend biedt dit proefschrift een nieuwe kijk op een van de meest fascinerende genetische paradoxen in de evolutiebiologie: het ontstaan en (voort)bestaan van een erfelijk systeem dat iedere generatie 50% van de nakomelingen opoffert. De combinatie van verschillende toepassingen en benaderingen van de fylogenie, de bioinformatica, en de moleculaire biologie heeft het mogelijk gemaakt om een succesvol onderzoek naar de evolutie van het gebalanceerde letale systeem van *Triturus* uit te voeren en zo (deels) een eeuwenoud raadsel op te lossen. Tegelijkertijd heeft het bepaalde, methodologische ontwikkelingen opgeleverd die qua impact verder (zullen) reiken dan via de toepassingen zoals uiteengezet in dit proefschrift.

