

### Samenvatting

Epigenomica behoort tot een van de snelst groeiende en meest dynamische onderzoeksvelden binnen de biologische wetenschappen. Het draagt bij aan een beter begrip van de moleculaire mechanismen die aan de basis liggen van taxonomisch en evolutionair relevante fenotypische variatie, door te onderzoeken hoe epigenetische veranderingen van het DNA kunnen fungeren als belangrijke drijvende krachten achter fenotypische diversiteit. Opmerkelijk is dat deze modificaties door omgevingsfactoren kunnen worden geïnduceerd en veranderingen in genexpressie binnen een individu kunnen mediëren, waardoor één enkel genotype een opmerkelijke fenotypische variatie kan vertonen afhankelijk van de omgeving waarin het vertoeft (fenotypische plasticiteit). Deze epigenetische processen kunnen ten minste gedeeltelijk de soms uitzonderlijke en taxonomisch verwarrende intraspecifieke morfologische variatie die wordt waargenomen in de natuur en in museumcollecties verklaren.

Ondanks de groeiende erkenning van de enorme mogelijkheden die natuurhistorische collecties bieden en de toenemende mate waarin zij voor wetenschappelijke doeleinden worden ingezet, blijven deze collecties tot op heden grotendeels onderbenut voor wat epigenomisch onderzoek betreft. Hoewel het Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen (KBIN) een lange traditie heeft in het uitvoeren van evolutionair onderzoek op zowel museumcollecties als hedendaagse specimens, ontbreekt momenteel de interne expertise om een epigenetisch luik hieraan te koppelen. Het overkoepelende doel van dit project is dan ook om nieuwe technologische en analytische epigenomische expertise binnen het KBIN te introduceren, teneinde collectiegebaseerd evolutionair onderzoek te versterken en te stimuleren.

Hoewel reeds een brede waaier aan epigenetische merkers werd beschreven en bestudeerd, lijkt cytosinemethylering de meest veelbelovende kandidaat voor epigenomische studies van museumcollecties aangezien dit type epigenetische modificatie naar verwachting post-mortem stabiel blijft over lange tijdsperioden. In deze studie maakten wij gebruik van whole-genome bisulfietsequencing en reduced representation bisulfite sequencing om dergelijke DNA methylatiepatronen te detecteren. Tijdens de bisulfietreactie worden uitsluitend ongemethyleerde cytosines omgezet in uracil, terwijl gemethyleerde cytosines onaangetaast blijven door de bisulfietbehandeling.

Wij onderzochten methylatiepatronen in museumstalen die onder suboptimale omstandigheden werden bewaard (d.w.z. meer dan drie decennia geleden verzameld en opgeslagen in ethanol bij kamertemperatuur) en vergeleken deze met methylatieprofielen van stalen die onder optimale omstandigheden werden geconserveerd (opgeslagen bij -80 °C en onmiddellijk na bemonstering snel ingevroren in vloeibare stikstof). Frequentieplots van het percentage gemethyleerde basen in ethanol-geconserveerde stalen waren vergelijkbaar met die van optimaal bewaarde stalen, en gelijkaardige trends werden waargenomen voor methylatieschattingen per basepaar. Om na te gaan in welke mate suboptimale bewaarcondities kunnen leiden tot een over- of onderschatting van de mate van methylatie, werden de maximale en minimale methylatieniveaus per site bij optimaal bewaarde stalen bepaald. Deze boven- en ondergrens werd aanschouwd als het verwachte methylatiebereik per site.

In totaal werd slechts 2,89 % en 3,04 % van alle sites respectievelijk aangeduid als hypergemethyleerd (boven de grens) en hypogemethyleerd (onder de grens) in ethanol-geconserveerde stalen, terwijl 94,1 % van de sites methylatiewaarden vertoonden die ruim binnen het verwachte bereik lagen. Bovendien waren deze hyper- en hypogemethyleerde sites willekeurig verdeeld over zowel sites als individuen. Samenvattend vonden wij geen aanwijzingen dat minder optimaal geconserveerde museumstalen duidelijke signatures van hypo- of hypermethylatie vertonen, aangezien hun methylatieniveaus vergelijkbaar bleven met die van stalen die onder de hoogste standaarden werden bewaard. Dit suggereert dat methylatiepatronen niet worden beïnvloed door inferieure bewaarcondities en dat dergelijke collecties een waardevolle bron blijven voor toekomstig epigenomisch onderzoek in musea.

Deze nieuw verworven inzichten werden vervolgens aangewend om de rol van DNA methylatie in de adaptieve evolutie van *Calosoma* kevers te onderzoeken en om de relatieve bijdragen van genetische determinatie en fenotypische plasticiteit aan morfologische aanpassingen bij *Tectarius*-slakken te evalueren.

Het KBIN kent een lange geschiedenis van evolutionair onderzoek naar adaptieve radiaties, met een speciale focus op die in de Galápagos plaatsgrijpen. Een bijzonder intrigerende radiatie betreft die van de *Calosoma* kevers, waarbij vertegenwoordigers zich herhaaldelijk op alle grote eilanden hebben gedifferentieerd in hoog- en laagland ecotypen langsheen een hoogetgradiënt. Op de toppen van vulkanen vertonen deze soorten een sterke reductie in de grootte van kenmerken die verband houden met dispersie (bijvoorbeeld reductie in vleugellengte). In deze studie onderzochten wij de rol van methylatie in adaptieve evolutie door na te gaan of eerder geïdentificeerde genomische regio's onder genetische selectie verrijkt zijn met differentieel gemethyleerde regio's. Helaas kon in geen van de stalen enige vorm van methylatie worden gedetecteerd. Dit kan erop wijzen dat het kevergenoom mogelijk geheel niet gemethyleerd is en dat DNA methylatie bijgevolg geen cruciale rol speelt in differentiële vleugelontwikkeling, of dat sleutgenen niet gemethyleerd zijn in volwassen individuen (zoals onderzocht in deze studie), maar eerder van belang zijn tijdens andere ontwikkelingsstadia (bijvoorbeeld larvale stadia). De exploratie van een andere epigenomische technologie, gericht op het karakteriseren van open chromatinestructuren, bleek echter een bijzonder veelbelovend alternatief.

In een tweede casestudie onderzochten wij het schelp polymorfisme van de planktonisch ontwikkelende alikruik *Tectarius striatus* van de Azoren en Kaapverdië. Twee schelp morfotypen komen hier samen voor op microgeografische schaal, maar vertonen een niet-willekeurige verspreiding over het landschap. Het 'nodulose' morfotype, gekenmerkt door een sterk gesculpteerde en lichtere schelp, domineert in golfbeschutte gebieden. Daarentegen wordt het 'gladde' morfotype het meest aangetroffen in aan golfslag blootgestelde zones. Deze habitatgebonden schelp morfologieën weerspiegelen verschillende functionele strategieën. In deze studie onderzochten wij zowel genomische als epigenomische variatie om de onderliggende moleculaire mechanismen van de waargenomen schelp variatie te identificeren. Terwijl genomische analyses een duidelijke eilandgebonden populatiestructuur aan het licht brachten, werden geen specifieke morfotype genomische verschillen vastgesteld. Epigenomische variatie daarentegen maakte het mogelijk om de twee schelp morfotypen van elkaar te onderscheiden, met verschillende sites die significante differentiële methylatie vertoonden. Samen suggereren deze bevindingen dat schelp morfologie een epigenetisch bepaald fenotypisch plastisch kenmerk is.

Samenvattend:

- Epigenomische laboprotocolen en bio-informatische workflows werden met succes opgezet voor de analyse van museumspecimens en staan nu ter beschikking van onderzoekers van het KBIN en andere wetenschappelijke instellingen.
- Exemplaren die onder suboptimale omstandigheden werden geconserveerd, kunnen desalniettemin hoogwaardige epigenomische gegevens opleveren en blijven dus een waardevolle bron voor museumgebaseerd epigenomisch onderzoek. Deze resultaten stimuleren aldus de verdere exploratie van het brede gamma aan diverse types museumcollecties die het KBIN herbergt.
- Hoewel het *Calosoma* genoom geen DNA methylatie lijkt te vertonen, vormt het onderzoek naar open chromatinestructuren een veelbelovende alternatieve piste voor epigenomische analyse.
- Adaptaties in schelpvormen bij *Tectarius* slakken vertoonden geen detecteerbare genetische basis, maar lijkt voornamelijk te worden aangedreven door epigenetische mechanismen.