

Summary

The present-day diversity of amphibians originated from a series of explosive radiations in which amphibians developed innovative physiological, morphological, behavioral, and ecological characteristics. Evolutionary innovations are believed to have significantly contributed to rapid species diversification and comprise two main mechanisms. (1) Ecological diversification allowed the development of new features that enabled them to fully exploit newly available niches. (2) Differentiation of sexual signaling was important in the origin of divergent preferences to sexual signals involved in reproductive isolation and speciation. This work deals with the contribution of gene family evolution to ecological diversification and differentiation of chemical signals.

In the first part, I examine the evolutionary history of the keratin gene family to trace back crucial periods of ecological adaptations in tetrapod history. Because keratins are the main component of skin and its specializations, the evolution of the keratin gene family is hypothesized to have played an important role in the development of these structures. Gene tree phylogenies and ancestral keratin function reconstructions indicate that the water-to-land transition in the stem lineage of tetrapods was associated with major radiation and functional diversification of keratin genes. Subsequent gene radiations coincide with the origin of other ecological adaptations, like hairs. Moreover, identification of structural proteins from toe pads of the tree frog *Hyla cinerea* also demonstrates that toe pads are formed by keratins that originate from the same keratins as those found in human hairs and other amniote skin specializations. Keratins involved in skin reinforcement and development of skin specializations, therefore, originated from an extensive gene radiation event in the stem lineage to tetrapods.

In the second part of this work, I explore the potential chemical signal repertoire in anuran and urodelan sexually dimorphic glands. Because almost all amphibian pheromones were identified from sexually dimorphic glands, they likely represent the main source of pheromones. My transcriptome analyses reveal that nuptial pads from the common frog, *Rana temporaria*, and cloacal glands from palmate newts, *Lissotriton helveticus*, contain good candidate chemical signals that belong to large protein families. Despite large differences in their protein sequences, both protein families show similarity to known pheromones of lungless salamanders that reduce the duration of courtship and show one or two copies of a similar three-finger motif that is known to be involved in a specific folding of these proteins.

This work therefore demonstrates that proteins from large gene families involved in morphological and reproductive traits of amphibians were structurally well-conserved in

evolution but gained a broader functional potential after gene duplications and alternative splicing.

Wim Vandebergh

Samenvatting

De huidige diversiteit aan amfibieën is ontstaan uit achtereenvolgende explosieve radiaties, waarbij tal van fysiologische, morfologische, gedrags- en ecologische innovaties werden ontwikkeld. Twee mechanismen worden geacht sterk te hebben bijgedragen tot deze snelle diversificatie van soorten. (1) Ecologische diversificatie was belangrijk in de ontwikkeling van nieuwe eigenschappen die amfibieën in staat stelden om nieuwe niches te verkennen. (2) Differentiatie van chemische signalen kan leiden tot reproductieve isolatie wanneer er een divergente voorkeur voor één van de chemische signalen ontstaat binnen individuen. In dit werk onderzoek ik de invloed van de evolutie van genfamilies op ecologische adaptaties and differentiatie in chemische signalen.

In het eerste deel van dit werk onderzoek ik de evolutieve geschiedenis van keratine-genfamilies om hun invloed op de ontstaansgeschiedenis van ecologische adaptaties na te gaan. Keratines zijn hierin een interessant onderzoeksdomein omdat ze het belangrijkste structurele eiwit van de huid en huidspecialisaties zijn en waarschijnlijk daarom een belangrijke rol gespeeld hebben in de ontwikkeling van deze structuren. Keratine-genombomen en reconstructies van hun ancestrale functies tonen aan dat de transitie van water naar land van tetrapoden gepaard ging met snelle radiaties en functionele diversificatie van keratine-genen. De daaropvolgende radiaties van keratines vielen samen met andere ecologische adaptaties, zoals het ontstaan van haren in zoogdieren. Daarenboven toont onderzoek naar de keratines in de zuignap van de boomkikker *Hyla cinerea* aan dat de keratines in de zuignap ontstaan zijn uit dezelfde keratines die haren en ander huidspecialisaties vormen. Dit toont aan dat tijdens de snelle radiaties van keratines in de voorouders van tetrapoden, nieuwe genen ontstonden die betrokken zijn bij het verstevigen van de huid en de ontwikkeling van huidspecialisaties.

In het tweede deel van dit werk onderzoek ik het potentieel aan chemische signalen uit de sexueel dimorfe klieren van salamanders en kikkers. Omdat bijna alle chemische signalen gevonden zijn in sexueel dimorfe klieren van amfibieën, is dit waarschijnlijk de belangrijkste bron van feromonen. Mijn transcriptoom analyses tonen aan dat zowel de paarknobbel van de bruine kikker, *Rana temporaria*, als de klier in de cloaca van vinpootsalamander, *Lissotriton helveticus*, een grote verscheidenheid aan goede kandidaat chemische signalen synthetiseren. Ondanks de grote verschillen in de proteïnesequentie, tonen deze proteïnen gelijkenis met gekende feromonen betrokken bij het verkorten van de paringstijd in longloze salamanders. Bovendien bevatten ze elk één of twee ‘three-finger motif’ domeinen, die waarschijnlijk essentieel zijn voor de conformatie van deze proteïnes.

Uit dit onderzoek blijkt daarom dat proteïnes, afkomstig uit genfamilies betrokken bij morfologische en reproductieve eigenschappen van amfibieën, structureel vrijwel bewaard gebleven zijn maar dat genduplicaties en alternatieve splicing geleid hebben tot de uitbreiding van hun functioneel potentieel.

Wim Vandebergh