How do limbs, fins, and faces develop and evolve?

高通量测序解析哺乳动物飞行进化的分子机制

王喆, 张树义*

沈阳农业大学畜牧兽医学院, 沈阳 110866

* 联系人, E-mail: szhang@syau.edu.cn

2016-07-08 收稿, 2016-11-15 修回, 2016-11-21 接受, 2016-12-23 网络版发表

国家自然科学基金(31301191)资助

摘要 蝙蝠(bats)是唯一能够自主飞行的哺乳动物, 其前肢进化为翼手, 手臂和手指显著延长, 手指之间具有宽阔的指间膜。蝙蝠翼手发育与进化的分子机制, 虽然已有十几年的研究历史, 但仍然不明确。近期, 利用先进的高通量测序技术, 包括全基因组测序、转录组测序(RNA-Seq)和染色质免疫沉淀测序(ChIP-Seq), 研究者们发现大量调控蝙蝠翼手发育的差异表达基因和调控元件, 证明蝙蝠翼手形成的主要原因是多基因表达模式的改变和表达调控元件的适应性分子进化。未来研究哺乳动物飞行进化的分子机制问题, 应关注关键基因和重要调控元件的功能以及基因间的相互作用。

关键词 蝙蝠, 翼手, 飞行, 进化, 高通量测序

蝙蝠是唯一能够真正飞行的哺乳动物, 物种数量约占哺乳动物总数的1/5, 是仅次于啮齿类的第二大类群。蝙蝠飞行的适应性进化主要表现在前肢形态的改变, 其前肢骨骼, 特别是手指的第二到五指, 显著地延长, 最长的第三指超过头体长, 与人手做比较, 相当于人的中指延长至原来的9倍^[1]。此外, 蝙蝠延长的手指之间、手臂与体侧之间、两腿之间, 进化出了宽阔而柔韧的指间膜、翼膜和尾膜, 形成巨大的“翅膀”(即翼手), 使其能够自如地飞行^[2]。与此同时, 蝙蝠前肢大拇指和后肢脚趾并没有延长, 短小、不具指(趾)间膜, 成为研究延长指最佳的对照组。根据化石证据, 蝙蝠在大约5千万年前进化出了能够飞行的翼手。10多年来, 研究人员一直想解开蝙蝠翼手形成之谜^[3]。最近, 利用高通量测序技术, 发现大量蝙蝠前肢特殊表达的基因和激活元件, 使我们对蝙蝠翼手的形成有了更多认识。

蝙蝠翼手的发育是从胚胎时期开始, 因此, 关于蝙蝠翼手形成的研究均关注到了蝙蝠的胚胎发育。

蝙蝠胚胎发育分为24个时段, 与小鼠(*Mus musculus*)相比, 蝙蝠翼手形态发生差异变化的时期从第15时段开始, 之后手指和翼膜快速生长^[4]。由于技术的限制, 早期对蝙蝠翼手形成分子机制的研究, 仅关注几个基因的表达或单个调控元件的功能作用。例如, *fgf8* (fibroblast growth factor 8)和*Gremlin*基因在蝙蝠翼手指间膜的高表达抑制细胞凋亡, 从而使蝙蝠具有翼膜^[5]; *Shh* (sonic hedgehog)基因在蝙蝠胚胎时期前肢的特异性第二次表达, 可能促进翼手发育^[6]; 将小鼠的增强子*Prx1* (paired related homeobox 1)替换为蝙蝠的同源序列, 会导致小鼠前肢延长, 说明*Prx1*参与调控翼手延长^[7]。

2010年, 本课题组^[8]首次利用高通量测序技术Tag-Seq, 检测大足鼠耳蝠(*Myotis ricketti*)胎儿期延长指和短指(趾)的表达序列标签, 将标签与已知基因库比对, 获得蝙蝠的基因表达谱。通过基因差异表达分析, 筛选出数百个前后肢显著性差异表达的基因, 用RT-qPCR的方法对其中14个与四肢发育相关的基

引用格式: 王喆, 张树义. 高通量测序解析哺乳动物飞行进化的分子机制. 科学通报, 2017, 62: 631-634

Wang Z, Zhang S Y. Recent studies on the evolution of mammalian flight using high-throughput sequencing technology (in Chinese). Chin Sci Bull, 2017, 62: 631-634, doi: 10.1360/N972016-00954

因进行了表达模式验证. 从此, 在蝙蝠翼手发育与进化的研究领域, 开启了高通量测序的研究方式.

2014年, 本课题组^[1]使用更为准确的高通量转录组测序技术(mRNA-Seq), 在3个胚胎发育时段对长翼蝠(*Miniopterus schreibersii*)前后肢更为细化的采样部位进行测序, 发现跟四肢发育密切相关的*HoxD* (homeobox D)等基因在翼手发育的特殊表达模式. 选取了四肢发育的早、中、晚3个时段, 取样部位有发育早期的前、后肢芽, 发育中期的前后肢手指、脚趾和指(趾)间膜, 发育后期的掌骨和跖骨, 总共14个样品. 在大量的前后肢差异表达基因中, 对四肢发育起重要调控作用的基因*Hoxd9-13*和*Tbx3* (T-box 3)基因、以及未知功能的潜在重要基因*Brinp3* (bone morphogenetic protein/retinoic acid inducible neural specific 3, 别名*Fam5c*)进行整胚原位杂交实验验证, 并与小鼠作对比. 结果显示, 与蝙蝠后肢和小鼠前后肢相比, *Hoxd9-13*的5个基因在蝙蝠前肢延长指的部位显著性高表达, 指骨形成之后, 主要集中在指骨周围表达. *Tbx3*基因同样在蝙蝠前肢延长指的部位显著性高表达, 但指骨形成之后, 主要在指间膜表达. *Brinp3*基因是抑制性基因, 在四肢发育中的作用尚不明确, 它在蝙蝠短指(前肢拇指和后肢脚趾)的发育中显著性高表达, 而且是蝙蝠特异性表达, 小鼠四肢无表达, 因此推测该基因在蝙蝠短指发育中起到特殊的形态调控作用.

2016年, 加利福尼亚大学研究团队在*Nature Genetics*和*PLoS Genetics*杂志上, 发表了两篇关于蝙蝠翼手发育与进化的重要文章, 同样利用高通量测序技术来解析蝙蝠独特的翼手形态进化问题^[9,10]. 这次他们在一个蝙蝠物种中, 使用了3种高通量测序方法(全基因组、转录组和染色质免疫沉淀测序), 经过大数据分析, 筛选出大量差异表达基因、lncRNA、激活/甲基化位点、加速进化序列和信号通路. 在蝙蝠大量的加速进化区域(bat accelerated region, BAR)中, 将其中一个BAR做转基因小鼠来验证功能, 从而发现了一个蝙蝠前肢特异性的*HoxD*基因增强子.

在*Nature Genetics*文章中, 研究者首先对长翼蝠(*Miniopterus natalensis*)进行全基因组测序(whole genome sequencing), 然后在蝙蝠胚胎翼手发育的3个关键时段取样, 做前、后肢的RNA-Seq测序, 以及H3K27ac和H3K27me的ChIP-Seq测序^[9]. 通过3种测序方法, 发现基因表达量、lncRNA表达量和基因调控

区序列均对蝙蝠翼手发育起作用. 对RNA-Seq数据进行分析, 发现7172个前后肢显著性差异表达的基因, 包括一些已知表达模式的四肢调控基因(如homeobox D10, homeobox D11, meis homeobox 2等)和新发现的特殊表达模式的基因(如*Mllt3* (myeloid/lymphoid or mixed-lineage leukemia translocated to 3)和LIM homeobox protein 8). 还发现8个在蝙蝠前后肢显著性差异表达的lncRNA, 包括已知参与激活5'*HoxA* (homeobox A)基因的Hottip, 以及功能未知, 但与*Tbx5* (T-box 5)基因位置接近的*Tbx5-as1*. 5'*HoxA*基因和*Tbx5*是重要的四肢发育调控基因, 说明lncRNA参与调控蝙蝠翼手发育. 对ChIP-Seq数据的H3K27ac和H3K27me信号做差异富集分析, 发现2475个在前后肢均显著性差异富集的区域. Go term分析这些区域最接近的基因, 发现与四肢发育相关的基因被富集. 用比较基因组学方法, 比较19个物种基因组序列(包括7种蝙蝠、9种非蝙蝠哺乳动物和3种非哺乳脊椎动物), 发现2796个BAR, 平均长度240 bp, 这些区域包含了*Lrrn1* (leucine rich repeat protein 1), *Crbrn* (cereblon), *fgf2* (fibroblast growth factor 2)和*spry1* (sprouty RTK signaling antagonist 1)等与四肢发育相关的基因. Pathway分析发现, 许多在前后肢差异激活的信号通路, 包括EIF2 (eukaryotic initiation factor 2), Fgf (fibroblast growth factor), Wnt (wnt family member), Bmp (bone morphogenetic protein)信号通路, 这些通路均参与调控四肢形态和骨骼形态发育.

在*PLoS Genetics*发表的文章中, 研究者比较了62个脊椎动物基因组(包括58个非蝙蝠和4个蝙蝠基因组)和小鼠发育中四肢的ChIP-Seq数据, 发现166个BAR与小鼠活跃的增强子重叠且在蝙蝠共同祖先发生显著性加速进化^[10]. 其中, BAR116在小棕蝠(*Myotis lucifugus*)的胚胎前肢显著性高表达、后肢弱表达, 在小鼠的前后肢无表达. 接着, 研究者将BAR116全序列分为3段(中间段和两翼序列), 利用转基因小鼠实验进行功能分析. 将小棕蝠BAR116全序列和两翼序列分别替换小鼠相应区域序列, 发现只有转入蝙蝠BAR116全序列的转基因小鼠在前肢高表达该增强子, 仅转入蝙蝠BAR116两翼序列的转基因小鼠四肢不表达该增强子, 说明蝙蝠BAR116 PhastCons区域(即中间段序列)启动了该增强子活性. 因为蝙蝠BAR116位于*HoxD*基因簇附近, 其表达模式与纳塔尔长翼蝠(*Miniopterus natalensis*) *Hoxd10*,

*Hoxd11*表达模式类似,即胚胎前肢高表达、后肢不表达或低表达,说明*BAR116*很可能是调控*HoxD*基因簇表达的增强子。

高通量测序和数据分析提供了大量可能调控蝙蝠四肢形态的差异表达基因、lncRNA和BARs,但是

它们绝大多数的功能还有待研究和验证。像人类基因组测序完成后,需要开展大量的基因组序列功能的研究一样,蝙蝠翼手发育与进化分子机制的研究,在高通量测序完成后,也将进入基因组序列的功能和基因间相互作用的研究阶段。

参考文献

- 1 Wang Z, Dai M, Wang Y, et al. Unique expression patterns of multiple key genes associated with the evolution of mammalian flight. *Proc Biol Sci*, 2014, 281: 20133133
- 2 Cooper L N, Cretokos C J, Sears K E. The evolution and development of mammalian flight. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol*, 2012, 1: 773–779
- 3 Simmons N B, Seymour K L, Habersetzer J, et al. Primitive early eocene bat from wyoming and the evolution of flight and echolocation. *Nature*, 2008, 451: 818–821
- 4 Wang Z, Han N, Racey P A, et al. A comparative study of prenatal development in *Miniopterus schreibersii fuliginosus*, *Hipposideros armiger* and *H. pratti*. *BMC Dev Biol*, 2010, 10: 10
- 5 Weatherbee S D, Behringer R R, Rasweiler J J IV, et al. Interdigital webbing retention in bat wings illustrates genetic changes underlying amniote limb diversification. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 15103–15107
- 6 Hockman D, Cretokos C J, Mason M K, et al. A second wave of *Sonic hedgehog* expression during the development of the bat limb. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 16982–16987
- 7 Cretokos C J, Wang Y, Green E D, et al. Regulatory divergence modifies limb length between mammals. *Genes Dev*, 2008, 22: 141–151
- 8 Wang Z, Dong D, Ru B, et al. Digital gene expression tag profiling of bat digits provides robust candidates contributing to wing formation. *BMC Genomics*, 2010, 11: 619
- 9 Eckalbar W L, Schlebusch S A, Mason M K, et al. Transcriptomic and epigenomic characterization of the developing bat wing. *Nat Genet*, 2016, 48: 528–536
- 10 Booker B M, Friedrich T, Mason M K, et al. Bat accelerated regions identify a bat forelimb specific enhancer in the *HoxD* locus. *PLoS Genet*, 2016, 12: e1005738

张树义

1994年获法国居里大学生态学博士学位,沈阳农业大学教授,我国第一个到亚马逊热带雨林进行长期野外研究与考察的生态学者。1995年获中国科学院“百人计划”项目资助,2000年获国家杰出青年科学基金资助,2006年获国家科技进步二等奖,2008年获教育部“长江学者”团队项目支持,2013年获上海自然科学一等奖,在*Nature*, *Science*, *Proc Natl Acad Sci USA*等杂志发表论文150余篇,他引次数达3000余次。

Summary for “高通量测序解析哺乳动物飞行进化的分子机制”

Recent studies on the evolution of mammalian flight using high-throughput sequencing technology

WANG Zhe & ZHANG ShuYi*

College of Animal Science and Veterinary Medicine, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China

*Corresponding author, E-mail: szhang@syau.edu.cn

Bats are the only mammals capable of self-powered flight using wings. Critical adaptations for their flight include a pair of dramatically elongated hands (forelimb digits II–V) with broad wing membranes. Although it has been studied for over ten years, the molecular mechanism of bat wing evolution was still uncertain before 2014. Here we reviewed recently significant studies on this topic, which made a great progress on the knowledge of bat wing formation. Thousands of differentially expressed genes and regulatory elements associated with limb development were found by using advanced high-throughput sequencing technology, including whole genome sequencing, RNA-seq and ChIP-seq. Screening out from RNA-seq data, we identified seven key genes that displayed unique expression patterns in embryonic bat wings and feet, compared with mouse fore- and hindlimbs. The expression of all 5'*HoxD* genes (*Hoxd9–13*) and *Tbx3*, six known crucial transcription factors for limb and digit development, was extremely high and prolonged in the elongating wing area. The expression of *Brinp3* (also called *Fam5c*), a tumor suppressor, in bat limbs was bat-specific and significantly high in all short digit regions (the thumb and foot digits). Using RNA-seq analysis, Eckalbar et al. found that more than 7000 genes and a few long noncoding RNAs, including *Tbx5-as1* and *Hottip*, were differentially expressed between forelimb and hindlimb in different stages of bat embryos. They also identified thousands of regions that were differentially modified in forelimb and hindlimb by using ChIP-seq analysis and 2796 bat-accelerated regions (BARs) within H3K27ac peaks by using comparative genomics, several of which cluster near limb-associated genes. Booker et al. discovered 166 BARs that overlap H3K27ac and p300 ChIP-seq peaks in mouse embryonic limbs. They further performed a mouse enhancer assay and showed that five *Myotis lucifugus* BARs drove gene expression in the embryonic mouse limb, with the majority showing differential enhancer activities compared to the mouse orthologous BAR sequences. Specially, one of them (BAR116), which was located telomeric to the *HoxD* cluster, had robust forelimb expression for the *M. lucifugus* sequence and no activity for the mouse sequence at the embryonic corresponding stage. Developing limb expression analysis of *Hoxd10–13* in another species of bats (*Miniopterus natalensis*) showed that a high-forelimb and weak-hindlimb expression for *Hoxd10–11*, which was similar to the expression trend observed for *M. lucifugus* BAR116 in mice. All the above results suggest that multiple changes in gene expression patterns and adaptive evolution of gene expression regulators occurred during the evolution of bat wings. Future studies should focus on functions of key developmental genes and bat-accelerated regulators, interactions between them, and pathways involving these genes.

bat, wing, flight, evolution, high-throughput sequencing

doi: 10.1360/N972016-00954