

靶向 Wnt1 的 miRNA 与 circRNA 及其靶基因间相互作用的生物信息学分析 *

张 遥^{1,2)} 任秀智³⁾ 王延宙⁴⁾ 马 翔^{1,2)} 左清利^{1,2)} 韩金祥^{1,2)} 鲁艳芹^{1,2)**}

¹⁾ 山东省罕见病重点实验室, 山东省医药生物技术创新中心, 山东省医学科学院, 济南 250062;

²⁾ 济南大学 - 山东省医学科学院 医学与生命科学学院, 济南 250200;

³⁾ 天津市武清区人民医院, 天津 301700; ⁴⁾ 山东省立医院小儿骨科, 济南 250021)

摘要 为对靶向 Wnt1 的 7 种 miRNAs 进行 circRNAs 及其靶基因的预测, 同时分析其与 circRNAs 及靶基因间的相互作用, 分别采用 Starbase 及 miRWALK 软件, 对文献报道的靶向 Wnt1 基因的 let-7e、miR-21、miR-34a、miR-122、miR-148a、miR-148b 与 miR-152 等 7 种 miRNAs 的 circRNAs 和对应的靶基因进行生物信息学预测. 利用 Cytoscape 3.2.1 对这 7 种 miRNAs 和预测所得到的 circRNAs 及对应的靶基因进行网络分析. 并进一步对预测到的靶基因通过 DAVID 软件进行通路分析. Starbase 软件对这 7 种不同 miRNAs 所预测的靶 circRNAs 的数量分别为 58、15、41、20、28、28、28 个. 分别比较 miRWALK 中 7~9 个以上软件共有的 miRNAs 及其与靶基因的关系, 发现 CHD7 基因是唯一一个在三种不同预测范围内与 miR-21、miR-148a、miR-148b 和 miR-152 等 4 种 miRNAs 相对应的靶基因. CNOT6、NBEA、ZFYVE26 与 ZDHHC17 是在两种不同预测范围内与至少 4 个 miRNAs 相对应的靶基因. 在 7 种 miRNAs 所预测靶基因相关的 KEGG 信号通路中, 7~9 个软件以上共有的信号通路为 Focal adhesion 信号通路、MAPK 信号通路、Notch 信号通路及 TGF-beta 信号通路. 在 MAPK 信号通路中 DUSP1 与 MRPS35_hsa_circ_001042 均分别是与 miR-21、miR-148a、miR-148b 及 miR-152 等 4 种 miRNAs 相互作用的靶基因与 circRNA. 本研究对靶向 Wnt1 的 miRNAs 及其相互作用的 circRNAs、靶基因与信号通路等进行了网络分析与预测, 为进一步分析它们之间的相互作用奠定了基础.

关键词 Wnt1, miRNA, circRNA, 相互作用, KEGG 信号通路

学科分类号 R9

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0236

Wnt1 基因最早于 1982 年在小鼠乳腺癌中发现^[1], 编码的蛋白质具有疏水性, 富含半胱氨酸^[2]. Wnt1 蛋白与细胞表面基质及其特异性受体卷曲蛋白(Fz)相互作用, 再经其下游散乱蛋白, 共同完成 Wnt 信号的转导传递^[3-4]. Wnt1 在中枢神经系统的发育中发挥至关重要的作用, 它是神经嵴诱导和中脑多巴胺系统发育所必需^[5], 此外, Wnt1 也是 XV 型成骨不全(osteogenesis imperfecta, OI)的致病基因, 它与 I 型胶原蛋白结构基因突变所导致的经典型成骨不全具有完全不同的分子机制^[6-8]. microRNA (miRNA)是近年来发现的一类长度约为 22 个核苷酸的非编码小分子 RNA. 它广泛存在于真核生物中, 在进化上具有高度保守性, 是一组不编码蛋白质, 不具有开放阅读框架(ORF)的短序列

RNA^[9]. miRNA 通过与靶标基因 3' UTR 完全或不完全配对, 降解靶标基因 mRNA 或抑制其翻译, 进而在转录后水平调节基因的表达^[10]. 目前文献报道的靶向 Wnt1 的 miRNA 有 let-7e^[11]、miR-21^[12]、miR-34a^[12]、miR-122^[13]、miR-148a^[14]、miR-148b^[15] 与 miR-152^[16] 等共 7 种. 近期 circRNAs 在 microRNA-7 和 microRNA-138 中作为 miRNAs 分子的海绵功能被发现, 其中 microRNA-7 有 70 个左右的 circRNAs 结合位点, microRNA-138 上有

* 山东省英才基金项目(2015ZRC03171)与山东省国际科技合作项目资助.

** 通讯联系人.

Tel: 0531-82919611, E-mail: yanqinlu@yahoo.com

收稿日期: 2016-08-01, 接受日期: 2016-10-20

16 个 circRNAs 的结合位点, 并且这些 circRNAs 与相应 miRNAs 所作用的靶基因在表达水平上表现出一致性^[17-18]. 本文对文献中报道的靶向 Wnt1 的 7 种 miRNAs 进行了与之相互作用的 circRNAs 预测, 进而为进一步探讨 Wnt1 与 miRNAs 以及 circRNAs 之间的相互关系奠定理论基础.

1 实验方法

1.1 miRNAs-circRNAs 相互作用的生物信息学预测与网络分析

采用 Starbase 软件^[19] (<http://starbase.sysu.edu.cn/>)预测分析文献报道的 Wnt1 基因靶向的 let-7e、miR-21、miR-34a、miR-122、miR-148a、miR-148b 与 miR-152 等 7 种 miRNAs 相互作用的 circRNAs. 并采用 Cytoscape 3.2.1^[20] (www.cytoscape.org)对靶向 Wnt1 的 7 种 miRNAs 和通过 Starbase 预测所得到的相应 circRNAs 进行网络分析. 在网络分析图中, 用绿色正方形表示 miRNAs, 用其他不同颜色的圆表示 circRNAs, 圆的大小代表该 circRNA 在网络图中与所对应的 miRNAs 个数.

1.2 7 种 miRNAs 靶基因的生物信息学预测与网络分析

采用 miRWALK^[21] (<http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk>)的 10 个数据库: DIANA-mT、miRanda、miRDB、miRWalk、PICTAR4、PICTAR5、PITA、RNAhybrid、RNA22 与 TargetScan, 对文献已经报道的靶向 Wnt1 的 7

种 miRNAs 靶基因进行生物信息学预测. 之后采用 Cytoscape 3.2.1 (www.cytoscape.org)^[20] 对 7 种 miRNAs 预测到的靶基因进行网络分析. 并进一步通过 DAVID 软件 (www.david.ncifcrf.gov)进行 pathway 分析^[22].

2 实验结果

2.1 miRNAs-circRNAs 相互作用的生物信息学预测与网络分析

Starbase 软件对靶向 Wnt1 的 let-7e、miR-21、miR-34a、miR-122、miR-148a、miR-148b 与 miR-152 等 7 种不同 miRNAs 所预测的靶 circRNAs 数量分别为 58、15、41、20、28、28 与 28 个(图 1). 所预测的 circRNA 总数量为 218 个, 其中非重叠 circRNAs 为 93 个. 其中 MRPS35_hsa_circ_001042 与 let-7e、miR-148a、miR-148b 和 miR-152 等 4 种 miRNAs 相互作用. ARHGAP35_hsa_circ_001101、KIAA0922_hsa_circ_001421 与 PARP16_hsa_circ_000601 等 3 种 circRNAs 均与 miR-34a、miR-148a、miR-148b 和 miR-152 等 4 种 miRNAs 相互作用(图 1). CSTF3_hsa_circ_000533、C2orf29_hsa_circ_000665、MGA_hsa_circ_001756 等 25 种 circRNAs 为 3 个不同的 miRNAs 所共有(图 1, 表 1). None_hsa_circ_001610、RRP7A_hsa_circ_002175、SP140_hsa_circ_001283 等 17 种 circRNAs 为 2 个不同的 miRNAs 所共有(图 1, 表 2).

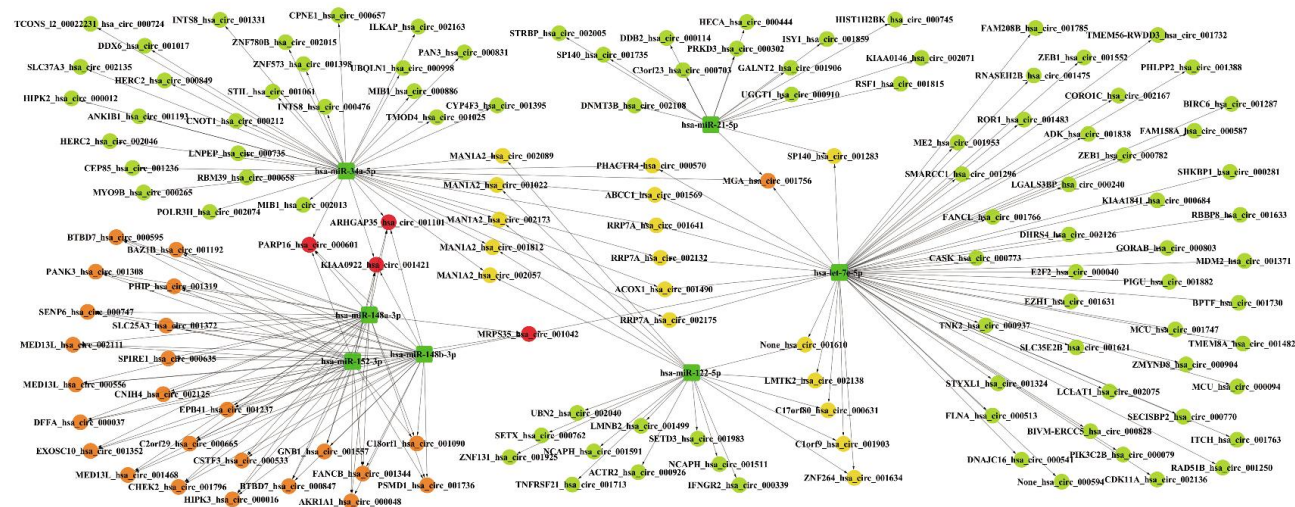


Fig. 1 Predicted interaction between miRNAs targeting Wnt1 and their corresponding circRNAs

图 1 靶向 Wnt1 的 7 种 miRNAs 与之相互作用的 circRNAs 的可视化分析

Table 1 Predicted circRNAs interacted with three 3 different microRNAs
表 1 3 个不同的 miRNAs 所共同预测的 circRNAs

miRNAs	Predicted circRNAs
let-7e, miR-21, miR-34a	MGA_hsa_circ_001756
miR-148a, miR-148b, miR-152	A_hsa_circ_000037, AKR1A1_hsa_circ_000048, AZ1B_hsa_circ_001192, B1_hsa_circ_001557, BMED13L_hsa_circ_001468, BTBD7_hsa_circ_000847, BTBMED13L_hsa_circ_002111, C18orf1_hsa_circ_001090, CHHIPK3_hsa_circ_000016, CNIH4_hsa_circ_002125, CSTF3_hsa_circ_000533, C2orf29_hsa_circ_000665, D7_hsa_circ_000595, EK2_hsa_circ_001796, EPB41_hsa_circ_001237, EXOSC10_hsa_circ_00135, FANCB_hsa_circ_001344, GNDFFSPIRE1_hsa_circ_000635, MED13L_hsa_circ_000556, PANK3_hsa_circ_001308, PHIP_hsa_circ_001319, PSMD1_hsa_circ_001736, SENP6_hsa_circ_000747, SLC25A3_hsa_circ_001372

Table 2 Predicted circRNAs interacted with 2 different microRNAs
表 2 2 个不同的 miRNAs 所共同预测的 circRNAs

miRNAs	Predicted circRNAs
let-7e, miR-21	SP140_hsa_circ_001283
let-7e, miR-34a	ABCC1_hsa_circ_001569, ACOX1_hsa_circ_001490, PHACTR4_hsa_circ_000570, RRP7A_hsa_circ_002132, RRP7A_hsa_circ_002175, RRP7A_hsa_circ_001641
let-7e, miR-122	C1orf9_hsa_circ_001903, C17orf80_hsa_circ_000631, LMTK2_hsa_circ_002138, None_hsa_circ_001610, ZNF264_hsa_circ_001634
miR-34a, miR-122	MAN1A2_hsa_circ_001022, MAN1A2_hsa_circ_001812, MAN1A2_hsa_circ_002057, MAN1A2_hsa_circ_002089, MAN1A2_hsa_circ_002173

2.2 7 种 miRNAs 靶基因的生物信息学预测与网络分析

分别比较 miRWALK 中 7~9 个以上软件共有的 miRNAs 及其与靶基因的关系,发现 CHD7 基因是唯一一个在 3 种不同预测范围内与 miR-21、miR-148a、miR-148b 和 miR-152 等 4 种 miRNAs 相对应的靶基因. CNOT6、NBEA、ZDHHC174 与 ZFYVE26 是在 2 种不同预测范围内与至少 4 个 miRNAs 相对应的靶基因(表 3). Cytoscape 对 8 个数据库共有的 miRNAs 与靶基因关系进行网络分析见图 2. 在 7 种 miRNAs 所预测靶基因相关的 KEGG 信号通路中, 7~9 个软件以上共有的信号

通路为 Focal adhesion 信号通路、MAPK 信号通路、Notch 信号通路与 TGF-beta 信号通路.

2.3 microRNA、circRNAs 与靶基因间相互作用分析

在已知文献报道的 Wnt1 的 let-7e^[11]、miR-21^[12]、miR-34a^[12]、miR-122^[13]、miR-148a^[14]、miR-148b^[15]与 miR-152^[16]等 7 种靶 miRNAs 中,发现 circRNAMRPS35_hsa_circ_001042 同时与 let-7e、miR-148a、miR-148b 和 miR-152 等 4 个不同的 microRNAs 相互作用. ARHGAP35_hsa_circ_001101、KIAA0922_hsa_circ_001421 和 PARP16_hsa_circ_000601 等共 3 种 circRNAs 均与 miR-34a、

Table 3 Wnt1-targeting miRNAs and their four common targeting gene predicated by more than 7 or 8 different miRNAs predication softwares

表 3 7 或 8 个以上软件共有的靶向 Wnt1 的 miRNAs 及其靶基因

Software number	Target gene			
	CNOT6	NBEA	ZDHHC17	ZFYVE26
≥7	miR-21, miR-34a, miR-148a, miR-148b, miR-152	miR-21, miR-148a, miR-148b, miR-152	miR-21, miR-34a, miR-148a, miR-148b, miR-152	let-7e, miR-148a, miR-148b, miR-152
≥8	miR-152, miR-148a, miR-34a, miR-148b	miR-21, miR-148a, miR-148b, miR-152	miR-21, miR-34a, miR-148a, miR-148b, miR-152	let-7e, miR-148a, miR-148b, miR-152

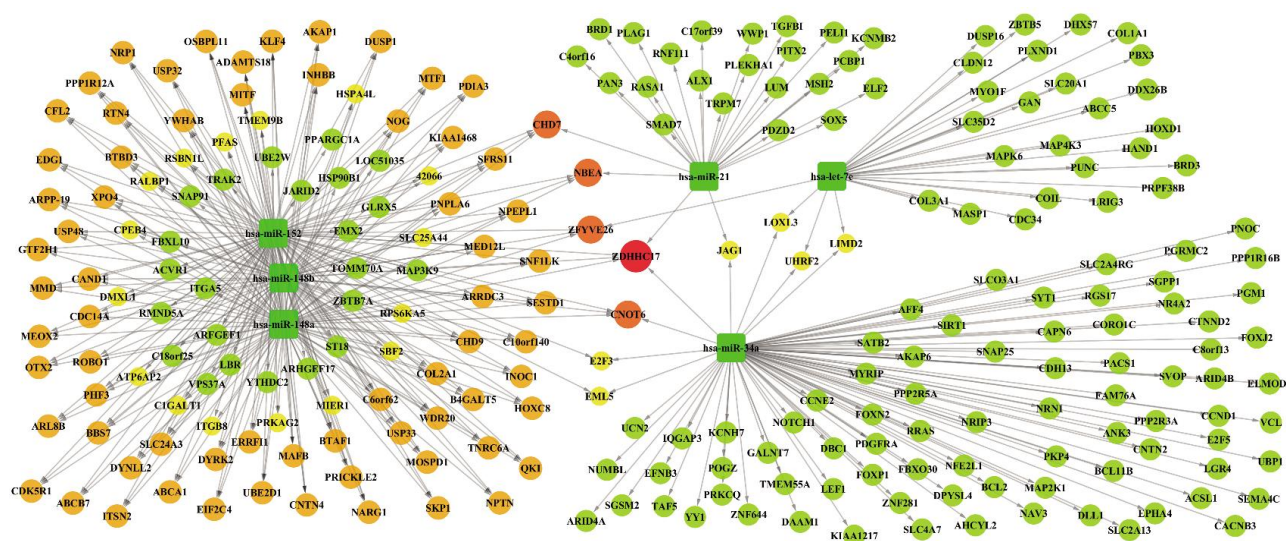


Fig. 2 Predicted interaction of Wnt1-targeting miRNAs and their corresponding target genes

图 2 靶向 Wnt1 的 miRNAs 及其预测的靶基因

miR-148a、miR-148b 和 miR-152 等 4 种 microRNAs 同时作用。此外, 3 种不同的 microRNAs 所共有 circRNA 包括 AKR1A1_hsa_circ_000048 等共 25 种, 目前均无文献报告。

CHD7 基因是同时与 miR-21、miR-148a、miR-148b 和 miR-152 等 4 种 miRNAs 相互作用的可信度最好的靶基因。CNOT6、NBEA、ZDHHC17 与 ZFYVE26 这 4 个基因与至少与 4 个 miRNAs 相对应, 其中 miR-148a、miR-148b 和 miR-152 3 个 miRNAs 是这 4 个基因共同靶向的。此外, LIMD2 基因与 let-7e、miR-34a、miR-152、miR-148a 和 miR-148b 等 5 个 miRNAs 相互作用。在 7 种 Wnt1 靶向的 miRNAs 所预测的可信度较高的靶基因中, 均发现它们与至少 miR-148a、miR-148b 和 miR-152 这 3 个 miRNAs 相互作用, 这些基因包括 BCL11A、CHD7、CNOT6、CPEB4、DUSP1、E2F3、EIF2C4、FOXK2、INHBB、KIAA1217、KLF4、LIMD2、MPPED2、NBEA、OXSRI、RMND5A、SLC25A44、TGIF2、USP32、ZADH2、ZFYVE26 与 ZDHHC17 等共 22 个。

在 7 种 miRNAs 所预测靶基因相关的 KEGG 信号通路中, 7~9 个软件以上共有的信号通路为

Focal adhesion 信号通路、MAPK 信号通路、Notch 信号通路和 TGF-beta 信号通路。

Focal adhesion 信号通路中 COL2A1 与 miR-148a、miR-148b 及 miR-152 等 3 种 miRNAs 相作用, 而这些 miRNAs 与 A_hsa_circ_000037、AKR1A1_hsa_circ_000048、AZ1B_hsa_circ_001192 等 25 种 circRNAs 相对应(表 1)。MAPK 信号通路中 DUSP1 与 miR-21、miR-148a、miR-148b 及 miR-152 等 4 种 miRNAs 相互作用, 而这些 miRNAs 只与 MRPS35_hsa_circ_001042 相对应。TGF-beta 通路中 INHBB 基因是唯一与 let-7e、miR-148a、miR-148b 及 miR-152 等 4 种 miRNAs 相互作用的靶基因。相应的 microRNA、circRNAs 与靶基因间相互作用见图 3。

3 讨 论

近期 circRNAs 在 microRNA-7 和 microRNA-138 中作为 miRNAs 分子的海绵功能被发现, 其中 microRNA-7 有 70 个左右的 circRNAs 结合位点, microRNA-138 上有 16 个 circRNAs 的结合位点, 并且这些 circRNAs 与相应 miRNAs 所作用的靶基因在表达水平上表现出一致性^[17-18]。由上述结果, MRPS35_hsa_circ_001042 能否作为 let-7e、

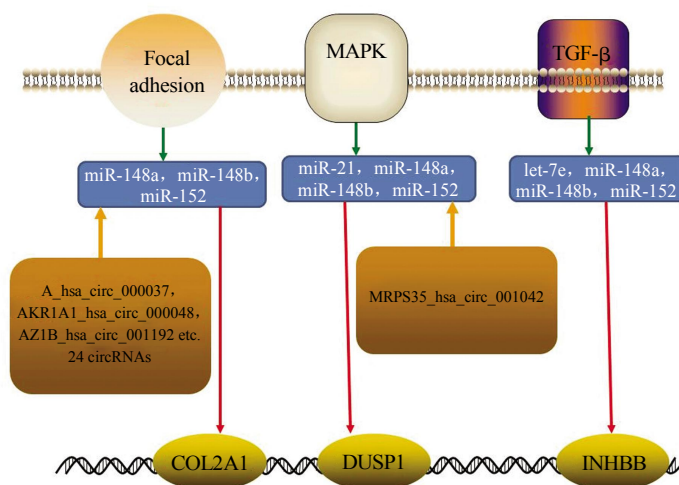


Fig. 3 Co-interaction of Wnt1-targeting miRNAs, predicted circRNAs and target genes in three different signal pathways

图3 在三种信号通路中靶向 Wnt1 的 miRNAs 所预测的 circRNAs 与靶基因间的相互作用

miR-148a、miR-148b 和 miR-152 等 4 个不同的 microRNAs 分子的海绵功能，ARHGAP35_hsa_circ_001101、KIAA0922_hsa_circ_001421 和 PARP16_hsa_circ_000601 等共 3 种 circRNAs 能否作为 miR-34a、miR-148a、miR-148b 和 miR-1524 等 4 种 microRNAs 分子的海绵功能，AKR1A1_hsa_circ_000048 等共 25 种 circRNAs 能否作为 3 种不同的 microRNAs 分子的海绵功能，尚需进一步实验验证。

CHD7 基因是核仁中核糖体 RNA 生物合成的重要调解器。CNOT6 对含 5 个 3-腺嘌呤结构的底物具有多聚(A)核酸外切酶活性，亦与小鼠或人 CAF1 指导的酵母发酵中共表达^[22]。此外，CNOT6 基因的多聚(A)核酸酶活性通过 FOS 基因主蛋白编码的不稳定性(mCRD)来介导 mRNA 的消除^[23]。该基因通过 NIF1 辅助因子复合体增加配体依赖性，转录激活包括 ESR1、GCCR、RARA、RXRA 和 THRA 在内的多种核受体^[24]。NBEA 基因主要编码一个多蛋白，该蛋白能够参与神经元特异性膜的转运进而影响大脑的发育^[25]。HeLa 细胞免疫沉淀反应分析表明，ZFYVE26 与 C20ORF29、DKFZp761E198、KIAA0415 和 SPG11 形成核心蛋白复合物。敲除该复合物中的 C20ORF29、KIAA0415 或 ZFYVE26 基因，会使 HeLa 细胞同源重组减少，而敲除 DKFZp761E198 或 SPG11 则没有这样的效果^[26]。ZDHHC17 蛋白在大脑中富集，显示与 HTT 在纹状体部分共存并在带突出的放射

神经元中发现，它是影响亨廷顿病的神经元亚群。内源性 ZDHHC17 在棕榈酰转移酶催化 NMNAT2 半胱氨酸棕榈酰化和膜定位的反应中起主导作用^[27]。

目前已发现多条信号通路参与了成骨细胞分化及骨形成的调节，包括 BMP-Smads^[28-29]、FGF^[30-31]、Hedgehog^[32]、MAPK^[33]、Notch^[34]、Wnt^[35]等信号通路。在 7 种 miRNAs 所预测靶基因相关的 KEGG 信号通路中，7~9 个软件以上共有的信号通路为 Focal adhesion 信号通路、MAPK 信号通路、Notch 信号通路与 TGF-beta 信号通路。

DUSP1 基因由 Emslie 等^[36]和 Martell 等^[37]分别通过荧光原位杂交定位于 5q34 和 5q35。Brondello 等^[38]发现它在调节 CHO 细胞有丝分裂信号蛋白降解方面具有重要作用。MRPS35_hsa_circ_001042 能否作为 miR-21、miR-148a、miR-148b、miR-152 的海绵功能，影响靶基因 DUSP1 的表达尚有待于进一步实验研究。TGF-beta 通路中 INHBB 基因是唯一与 let-7e、miR-148a、miR-148b 及 miR-152 等 4 种 miRNAs 相互作用的靶基因，而与这 4 种 miRNAs 相应的 circRNAs 的发现尚需进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Nusse R, Varmus H E. Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell*, 1982, **31**: 99-109
- [2] Wurst W, Prakash N. Wnt1-regulated genetic networks in midbrain

- dopaminergic neuron development. *Journal of Molecular Cell Biology*, 2014, **6**(1): 34-41
- [3] Akalay I, Tan T Z, Kumar P, *et al.* Targeting WNT1-inducible signaling pathway protein 2 alters human breast cancer cell susceptibility to specific lysis through regulation of KLF-4 and miR-7 expression. *Oncogene*, 2015, **34**(17): 2261-2271
- [4] Jonsson M, Dejmek J, Bendahl P O, *et al.* Loss of Wnt-5a protein is associated with early relapse in invasive ductal breast carcinomas. *Cancer Research*, 2002, **62**(2): 409-416
- [5] Yang J, Brown A, Ellisor D, *et al.* Dynamic temporal requirement of Wnt1 in midbrain dopamine neuron development. *Development*, 2013, **140**(6): 1342-1352
- [6] 鲁艳芹, 任秀智, 王延宙, 等. 成骨不全及其分子机制. *生物化学与生物物理进展*, 2015, **42**(6): 511-518
Lu Y Q, Ren X Z, Wang Y Z, *et al.* Progress in Biochemistry and Biophysics, 2015, **42**(6): 511-518
- [7] 徐超, 韩金祥, 鲁艳芹. 成骨不全的分子机制. *中国生物化学与分子生物学报*, 2012, **28**(4): 310-315
Xu C, Han J X, Lu Y Q. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2012, **28**(4): 310-315
- [8] Lu Y, Ren X, Wang Y, *et al.* Mutational and structural characteristics of four novel heterozygous C-propeptide mutations in the pro α 1(I) collagen gene in Chinese osteogenesis imperfecta patients. *Clinical Endocrinology*, 2014, **80**(4): 524-531
- [9] Julius Brennecke, David R. Hipfner, Alexander Stark, *et al.* Bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene *hid* in *Drosophila*. *Cell*, 2003, **113**: 25-36
- [10] Baulcombe D. DNA events. An RNA microcosm. *Science*, 2002, **297**(5589): 2002-2003
- [11] Vinas J L, Ventayol M, Brune B, *et al.* miRNA let-7e modulates the Wnt pathway and early nephrogenic markers in mouse embryonic stem cell differentiation. *PloS One*, 2013, **8**(4): e60937
- [12] Hashimi S T, Fulcher J A, Chang M H, *et al.* MicroRNA profiling identifies miR-34a and miR-21 and their target genes JAG1 and WNT1 in the coordinate regulation of dendritic cell differentiation. *Blood*, 2009, **114**(2): 404-414
- [13] Chang J, Nicolas E, Marks D, *et al.* miR-122, a mammalian liver-specific microRNA, is processed from hcr mRNA and may downregulate the high affinity cationic amino acid transporter CAT-1. *RNA Biology*, 2004, **1**(2): 106-113
- [14] Gailhouste L, Gomez-Santos L, Hagiwara K, *et al.* miR-148a plays a pivotal role in the liver by promoting the hepatospecific phenotype and suppressing the invasiveness of transformed cells. *Hepatology*, 2013, **58**(3): 1153-1165
- [15] Zhang J G, Shi Y, Hong D F, *et al.* MiR-148b suppresses cell proliferation and invasion in hepatocellular carcinoma by targeting WNT1/beta-catenin pathway. *Scientific Reports*, 2015, **5**: 80-87
- [16] Tsuruta T, Kozaki K, Uesugi A, *et al.* miR-152 is a tumor suppressor microRNA that is silenced by DNA hypermethylation in endometrial cancer. *Cancer Research*, 2011, **71**(20): 6450-6462
- [17] Hansen T B, Kjems J, Damgaard C K. Circular RNA and miR-7 in cancer. *Cancer Research*, 2013, **73**(18): 5609-5612
- [18] Hansen T B, Jensen T I, Clausen B H, *et al.* Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature*, 2013, **495**(7441): 384-388
- [19] Li J H, Liu S, Zhou H, *et al.* starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, 2014, **42**(Database issue): D92-97
- [20] Shannon P, Markiel A, Ozier O, *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, 2003, **13**(11): 2498-2504
- [21] Dweep H, Gretz N, Sticht C. miRWalk database for miRNA-target interactions. *Methods in Molecular Biology*, 2014, **1182**: 289-305
- [22] Huang Da W, Sherman B T, Lempicki R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nature Protocols*, 2009, **4**(1): 44-57
- [23] Chang T C, Yamashita A, Chen C Y, *et al.* UNR, a new partner of poly(A)-binding protein, plays a key role in translationally coupled mRNA turnover mediated by the c-fos major coding-region determinant. *Genes Dev*, 2004, **18**(16): 2010-2023
- [24] Garapaty S, Mahajan M A, Samuels H H. Components of the CCR4-NOT complex function as nuclear hormone receptor coactivators *via* association with the NRC-interacting Factor NIF-1. *The Journal of Biological Chemistry*, 2008, **283**(11): 6806-6816
- [25] Savelyeva L, Sagulenko E, Schmitt J G, *et al.* The neurobeachin gene spans the common fragile site FRA13A. *Human Genetics*, 2006, **118**(5): 551-558
- [26] Slabicki M, Theis M, Krastev D B, *et al.* A genome-scale DNA repair RNAi screen identifies SPG48 as a novel gene associated with hereditary spastic paraplegia. *PLoS Biology*, 2010, **8** (6): e1000408
- [27] Milde S, Coleman M P. Identification of palmitoyltransferase and thioesterase enzymes that control the subcellular localization of axon survival factor nicotinamide mononucleotide adenylyltransferase 2 (NMNAT2). *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, **289**(47): 32858-32870
- [28] 叶华虎, 董罡, 袁菊芳, 等. 外源基因对精子的影响及其在山羊早期胚胎中的表达. *遗传*, 2008, **30**(11): 1421-1426
Ye H H, Dong G, Yuan J F, *et al.* *Hereditas*, 2008, **30** (11): 1421-1426
- [29] Li S, Lu K, Wang J, *et al.* Ubiquitin ligase Smurf1 targets TRAF family proteins for ubiquitination and degradation. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 2010, **338**(1-2): 11-17
- [30] Marie P J, Miraoui H, Severe N. FGF/FGFR signaling in bone formation: progress and perspectives. *Growth Factors*, 2012, **30**(2): 117-123
- [31] Kim B G, Kim H J, Park H J, *et al.* Runx2 phosphorylation induced by fibroblast growth factor-2/protein kinase C pathways. *Proteomics*, 2006, **6**(4): 1166-1174
- [32] Regard J B, Malhotra D, Gvozdenovic-Jeremic J, *et al.* Activation

- of Hedgehog signaling by loss of GNAS causes heterotopic ossification. *Nature Medicine*, 2013, **19**(11): 1505–1512
- [33] Huang X F, Yuan S J, Yang C. Effects of total flavonoids from *Drynaria fortunei* on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells. *Molecular Medicine Reports*, 2012, **6**(3): 547–552
- [34] Geissler K, Zach O. Pathways involved in *Drosophila* and human cancer development: the Notch, Hedgehog, Wingless, Runt, and Trithorax pathway. *Annals of Hematology*, 2012, **91**(5): 645–669
- [35] Farias G G, Alfaro I E, Cerpa W, *et al.* Wnt-5a/JNK signaling promotes the clustering of PSD-95 in hippocampal neurons. *The Journal of Biological Chemistry*, 2009, **284**(23): 15857–15866
- [36] Emslie E A, Jones T A, Sheer D, *et al.* The CL100 gene, which encodes a dual specificity (Tyr/Thr) MAP kinase phosphatase, is highly conserved and maps to human chromosome 5q34. *Human Genetics*, 1994, **93**(5): 513–516
- [37] Martell K J, Kwak S, Hakes D J, *et al.* Chromosomal localization of four human VH1-like protein-tyrosine phosphatases. *Genomics*, 1994, **22**(2): 462–464
- [38] Brondello J M, Pouyssegur J, McKenzie F R. Reduced MAP kinase phosphatase-1 degradation after p42/p44MAPK-dependent phosphorylation. *Science*, 1999, **286**(5449): 2514–2517

Bioinformatics Interaction Analysis of Wnt1-Targeting miRNAs and Their Corresponding circRNAs and Target Genes*

ZHANG Yao^{1,2)}, REN Xiu-Zhi³⁾, WANG Yan-Zhou⁴⁾, MA Xiang^{1,2)},

ZUO Qing-Li^{1,2)}, HAN Jin-Xiang^{1,2)}, LU Yan-Qin^{1,2)**}

⁽¹⁾ Key Laboratory for Rare & Uncommon Diseases of Shandong Province, Shandong Medicinal Biotechnology Centre, Shandong Academy of Medical Sciences, Jinan 250062, China;

⁽²⁾ School of Medicine and Life Sciences, University of Jinan-Shandong Academy of Medical Sciences, Shandong 250200, China;

⁽³⁾ The People's Hospital of Wuqing District, Tianjin 301700, China;

⁽⁴⁾ Department of Pediatric Orthopaedics, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, China)

Abstract To predict circRNAs and target genes for seven known Wnt1-targeting miRNAs, then further analyze the interaction among these seven miRNAs and their corresponding circRNAs and target genes, seven reported Wnt1-targeting miRNAs including let-7e, miR-21, miR-34a, miR-122, miR-148a, miR-148b and miR-152 were predicted for their interacting circRNAs and target genes by Starbase and miRWALK softwares, respectively. Then the network analysis of miRNA and their interaction circRNAs and target genes was built by Cytoscape3.2.1 software. DAVID was performed to analyze signaling pathway according to miRNAs predicted target genes. The number of target circRNAs predicted by Starbase software for these 7 different miRNAs were 58, 15, 41, 20, 28, 28 and 28, respectively. Comparing the relationship between miRNAs and their target gene in more than 7~9 softwares predicted by miRWALK, we found that the CHD7 gene is the only one corresponding with miR-21, miR-148-a and miR-148 and miR-152 in more than 7 softwares predications. CNOT6, NBEA, ZFYVE26 and ZDHHC17 were the target genes equivalent with at least 4 miRNAs predicted by both 7 and 8 different softwares in miRWALK. For KEGG signaling pathways, FcγR adhesion, MAPK, Notch and TGF-beta signaling pathways were all predicted by seven miRNAs' target genes in more than 7 different predication softwares of miRWALK. In the MAPK signaling pathway, DUSP1 was found to have interaction with miR-21, miR-148a, miR-148b and miR-152 simultaneously, MRPS35_hsa_circ_001042 was also predicted to interact with these four miRNAs. We found that the DUSP1 and MRPS35_hsa_circ_001042 in the MAPK signaling pathway, are the target genes and circRNA, interacted with miR-21, miR-148a, miR-148b, and miR-152, respectively. In the study, we analyzed known Wnt1-targeting miRNAs and their corresponding circRNAs and predicted target genes, signaling pathway and interaction network were also involved. The study laid the foundation for the further analysis of the interaction among Wnt1-targeting miRNAs, circRNAs and target genes.

Key words Wnt1 gene, miRNA, circRNA, interaction, KEGG signaling pathway

DOI: 10.16476/j.pibb.2016.0236

*This work was supported by grants from The Talent Fund Project of Shandong Province(2015ZRC03171), and the International Cooperation Project for the Department of Science& Technology of Shandong Province.

**Corresponding author.

Tel: 86-531-82919611, E-mail: yanqinlu@yahoo.com

Received: August 1, 2016 Accepted: October 20, 2016