

УДК 57.054:57.081.23:616-001.7

## СКРИНИНГ ДИФФЕРЕНЦИАЛЬНО ЭКСПРЕССИРУЕМЫХ микроРНК, ИМЕЮЩИХ ОТНОШЕНИЕ К РАСТЯЖЕНИЮ МЫШЦ, И ИХ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ<sup>#</sup>

© 2013 г. Zуганг Shen, Dongsheng Li, Yanxun Zhao, Jialin Guo\*

*Department of Emergency Surgery, Tongji Hospital, Shanghai, China*

Поступила в редакцию 15.12.2012 г.

Принята к печати 24.01.2013 г.

Растяжение мышц — одна из самых распространенных мышечных травм, с которой сталкиваются практикующие врачи. С целью лучше понять причины этого недуга мы идентифицировали дифференциально экспрессируемые микроРНК (miРНК) в мышечных стволовых клетках, полученных из поврежденных тканей мышей. В данной работе из банка данных Gene Expression Omnibus взяты результаты анализа экспрессии генов (GSE26780) на микрочипах. Набор данных содержал в сумме 12 образцов (мышечные стволовые клетки мышей), в том числе нормальные клетки для контроля и образцы, полученные спустя различное время после повреждения. Дифференциально экспрессируемые miРНК идентифицировали с использованием пакета программ LIMMA (Linear Models for Microarray Data) и затем с помощью TargetScan нашли гены-мишени miРНК mmu-miR-143. Далее с использованием инструмента KUPS сконструировали сеть белок-белковых взаимодействий для продуктов этих генов-мишеней. И наконец, программа Cytoscape и ее плагины были использованы для идентификации и анализа частей этой сети. Обнаружено 121, 136 и 148 дифференциально экспрессируемых miРНК в образцах поврежденных тканей в каждой временной точке, и среди них 60 дифференциально экспрессируемых miРНК перекрывались во всех трех группах. Среди этих miРНК наиболее значительно изменялся уровень экспрессии mmu-miR-143 в диапазоне 36–72 ч после повреждения. Выявлено 510 генов-мишеней mmu-miR-143 и сконструирована сеть взаимодействий для продуктов этих генов. В этой сети выделено два модуля. Учитывая данные более ранних исследований, мы предположили, что вошедшие в модуль В белки, большая часть которых представлена коллагенами и интегринами, скорее всего, принимают участие в заживлении растяжений через процессы клеточной адгезии.

**Ключевые слова:** растяжение мышц, mmu-miR-143, клеточная адгезия, дифференциально экспрессируемые микроРНК, анализ модулей.

SCREENING OF DIFFERENTIALLY EXPRESSED miRNAs RELATED TO MUSCLE STRAIN AND THEIR TARGET GENES, by Zуганг Shen, Dongsheng Li, Yanxun Zhao, Jialin Guo\* (Department of Emergency Surgery, Tongji Hospital, Shanghai, China; \*e-mail: guojialinguojl@hotmail.com). Muscle strain is one of the most common muscle injuries seen in the office of a practicing physician. To get a better understanding of this injury, we identified the differentially expressed miRNAs in muscle stem cells collected from injured muscle tissues of mouse. In this study, we downloaded the gene expression microarray (GSE26780) from Gene Expression Omnibus database. The dataset contained a total of 12 samples (murine muscle stem cells), including normal controls and samples collected from tissues at different time points after the injury. Differentially expressed miRNAs were identified by LIMMA package and target genes of mmu-miR-143 were found by TargetScan. Then, a protein-protein interaction (PPI) network was constructed for the products of these target genes by using KUPS. Finally, Cytoscape and its plugins were used to identify and analyze the modules in this network. According to the results, 121, 136 and 148 differentially expressed miRNAs were identified in injured samples at each time point, and among them, 60 miRNAs were overlapping between all three groups. The expression values of mmu-miR-143 were most significantly altered over time at 36–72 h after the injury. Therefore, 510 target genes of mmu-miR-143 were found and a PPI network for the products of these target genes was constructed. Moreover, two modules were identified in the PPI network. Together with the previous studies, we suppose that proteins in module B, most of which are collagens or integrins, most likely participate in healing of strain injuries through cell adhesion processes.

**Keywords:** strain injury, mmu-miR-143, cell adhesion, differentially expressed miRNAs, module analysis.

DOI: 10.7868/S0026898413050236

Принятые сокращения: miРНК — микроРНК; 3'UTR — 3'-нетранслируемая область.

<sup>#</sup> Текст представлен авторами на английском языке.

\* Эл. почта: guojialinguojl@hotmail.com

## ВВЕДЕНИЕ

Растяжение мышц – одна из наиболее распространенных мышечных травм, которая случается во время слишком сильных или неестественных сокращений мышц. Такие повреждения мышц или сухожилий происходят из-за перенапряжения и могут приводить к частичному или полному разрыву мышечных волокон [1]. Этот вид травмы мышц наиболее распространен среди спортсменов и становится основной причиной их инвалидности [2]. Кроме того, растяжение угрожает не только спортсменам, а может случиться с каждым человеком даже во время обычных ежедневных занятий. Более того, однажды травмированный мышечно-сухожильный блок становится значительно более чувствительным к воздействиям, из-за чего возрастает риск его последующих повреждений [3]. В зависимости от тяжести растяжения для облегчения боли могут проводиться различные процедуры. Однако до настоящего времени лечение ограничивается отдыхом, прикладыванием льда, массажем и применением противовоспалительных препаратов. Следует отметить, что большинство из этих воздействий зачастую неэффективны [4].

В то же время заживление и растяжение мышц контролируется сложной регуляторной сетью, включающей множество факторов. Среди них все больше и больше внимания привлекают микроРНК (miРНК). Это эндогенные некодирующие РНК (~22 н.), которые обычно играют важную роль в регуляции множества биологических процессов, таких как развитие, пролиферация клеток, дифференцировка и апоптоз [5]. miРНК могут связываться с 3'-нетранслируемой областью (3'UTR) целевой матричной РНК (мРНК). Полная комплементарность между miРНК и мРНК-мишенью приводит к блокированию ее трансляции, или сайленсингу, и, как следствие, к снижению количества кодируемого этой мРНК белкового продукта [6].

К настоящему моменту известен огромный список miРНК, которые могут играть важную роль в процессах заживления растяжений, например, miR-1, miR-133, miR-181, miR-195, miR-206 [7]. Среди них наиболее известна miR-206. Показано, что эта miРНК интенсивно экспрессируется во вновь образованных мышечных волокнах и вызывает регенерацию скелетных мышц в лабораторных экспериментах [8]. Однако крайне редко используются возможности современной биоинформатики для скрининговых исследований дифференциально экспрессируемых miРНК в мышечных стволовых клетках поврежденных тканей.

Нами идентифицированы дифференциально экспрессируемые miРНК в мышечных стволовых клетках мышей с травмой растяжения мышц. Затем с помощью инструмента TargetScan найдены

гены-мишени для miРНК mmu-miR-143 и построена сеть белок-белковых взаимодействий для продуктов этих генов. В итоге, в этой сети идентифицировано и проанализировано два модуля. Привлекли наше внимание белки, входящие в модуль В, поскольку большинство из них относится к семейству СОL и семейству интегринов, которые, по нашим прогнозам, могут участвовать в заживлении растяжений через процессы клеточной адгезии.

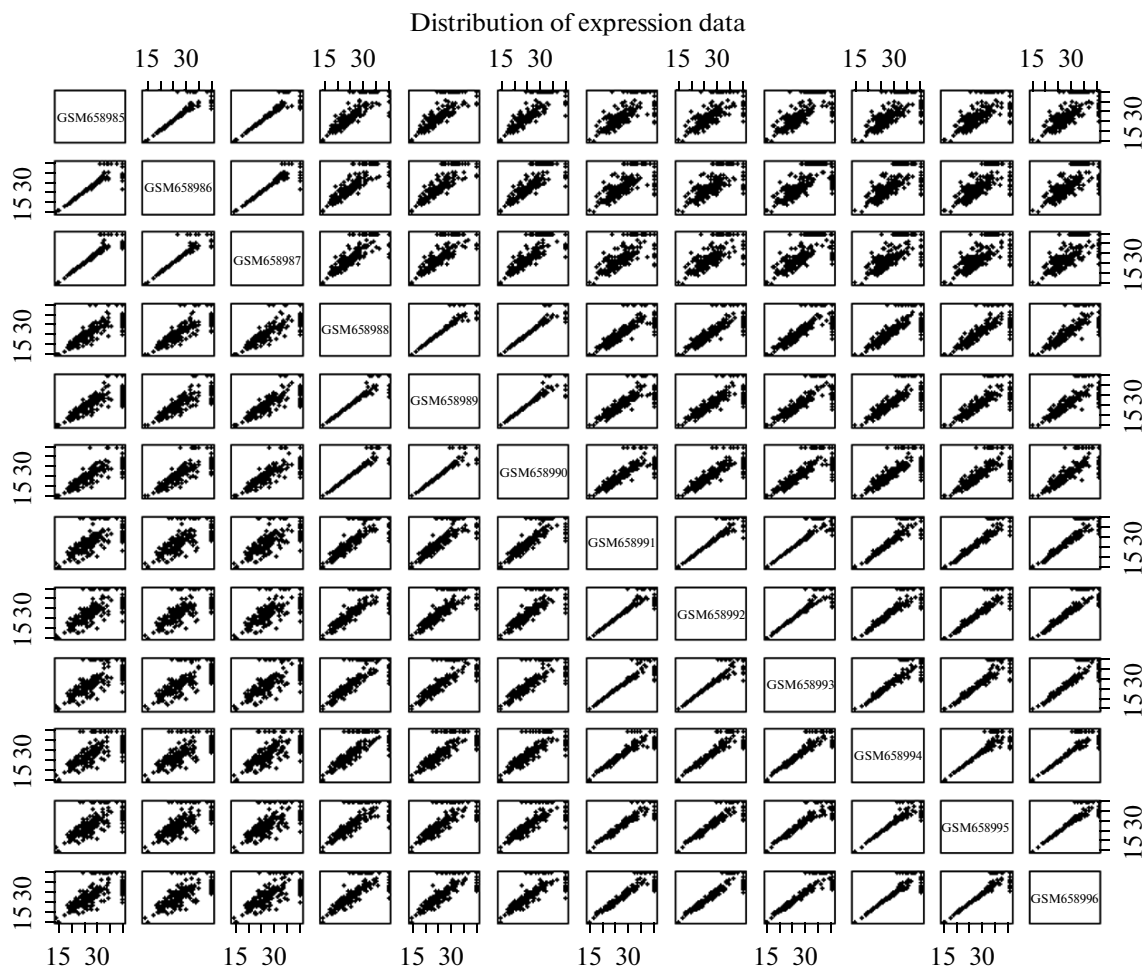
## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Данные анализа на микрочипах.** Транскрипционный профиль GSE26780 [9] на основе микрочипа GPL11636 TaqMan® Rodent miRNA card A v2.0 взят из базы данных NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). Аннотации зондов получены из базы данных miRBase. Набор данных содержал всего 12 образцов (стволовые клетки мышц мыши). Среди этих образцов три относились к контролям в норме, а остальные взяты от мышей с растяжением мышц (по три образца, отобранных через 36, 60 и 72 ч после повреждения).

**Анализ дифференциальной экспрессии.** Для идентификации miРНК, которые существенно различаются по кинетике экспрессии в поврежденных тканях (через 36, 60, 72 ч после повреждения) и в неповрежденном контроле, использован пакет программ LIMMA на языке программирования R с применением метода многократных уточнений результатов сравнения (метод Бенджамини-Хохберга, ВН-метод) [10–13]. С целью статистически достоверно определить общие экспрессируемые miРНК в каждой временной точке, мы задали параметры: поправленное  $p$ -value < 0.05 или FDR < 0.05 и  $|\log FC| > 1$ .

**Предсказание генов-мишеней для дифференциально экспрессируемых miРНК.** МикроРНК и их гены-мишени у мышей получены из базы данных TargetScan. TargetScan – это один из наиболее используемых биоинформатических инструментов для предсказания мишеней, который ищет потенциальные биологические мишени miРНК путем обнаружения консервативных сайтов 7mer-1a, 7mer-m8 и 8mer, совпадающих с “seed”-областью каждой miРНК [14].

**Конструирование сети белок-белковых взаимодействий с помощью KUPS.** В целях дальнейшего анализа предсказанных генов-мишеней для идентифицированных нами дифференциально экспрессируемых miРНК мы построили сеть белок-белковых взаимодействий для продуктов этих генов-мишеней при помощи инструмента KUPS (The Kansas University Proteomics Service). Это инструмент, который позволяет отобразить высококачественные данные о белок-белковых взаимодействиях и полезен исследователям, разрабатывающим и оценивающим вычислительные модели



**Рис. 1.** Распределение данных экспрессии. Каждая точка соответствует одному гену. По горизонтальной и вертикальной осям отложены значения экспрессии по данным соответствующего микрочипа; большая часть точек расположена вдоль диагонали каждого квадрата, что указывает на правильно подобранные (оптимизированные) условия анализа.

для предсказания взаимодействий между белками [15].

**Анализ модулей полученной белковой сети.** Продукты генов, локализованные в одном модуле, зачастую имеют одинаковые или сходные функции: они работают вместе, чтобы реализовать их биологическую роль. Программа Cytoscape [16] и ее плагин Mcode [17] использованы для визуализации и идентификации модулей в полученной белковой сети (пороговое значение: порядок каждого узла в модуле не менее 2). Затем с помощью инструмент Bingo (Biological Networks Gene Ontology tool) [18] оценили, какие значения онтологии генов (GO) наиболее часто встречаются в полученных нами модулях (поправленное  $p$ -value < 0.01).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *Анализ дифференциальной экспрессии*

Полученные в ходе анализа дифференциальной экспрессии данные стандартизовали и использова-

ли для выявления дифференциально экспрессируемых miРНК (рис. 1). При помощи пакета программ LIMMA (на языке программирования R) с учетом выбранных нами критериев (поправленное  $p$ -value < 0.05 или FDR < 0.05,  $|\lgFC| > 1$ ) в каждой временной точке (36, 60 и 72 ч после травмы) идентифицировано соответственно 121, 136 и 148 дифференциально экспрессируемых miРНК (Приложение, табл. 1. См. дополнительные материалы на сайте [www.molecbio.com/downloads/2013/5/supp\\_zugang.shen\\_en.pdf](http://www.molecbio.com/downloads/2013/5/supp_zugang.shen_en.pdf)), из них 60 встречались во всех временных точках (Приложение, табл. 2). Среди этих перекрывающихся miРНК экспрессия 15 усиливалась в каждой последующей из трех посттравматических временных точек (рис. 2a). Уровень их экспрессии постепенно возрастал и достигал максимума при 72 ч после повреждения. Уровень экспрессии остальных 45 miРНК снижался в течение первых 60 ч (рис. 2б). Что интересно, среди этих 45 дифференциально экспрессируемых miРНК экспрессия семи подвержена очень резким колебаниям: в пер-

**Таблица 1.** Биологические процессы, преобладающие в модуле А

GO-ID <sup>a</sup>	<i>p</i> -value	FDR <sup>b</sup>	Описание функции
45449	6.92E-09	6.28E-07	регуляция транскрипции
10556	1.30E-08	6.28E-07	регуляция процесса биосинтеза макромолекул
19219	1.57E-08	6.28E-07	регуляция процессов метаболизма гетероциклических оснований, нуклеозидов, нуклеотидов и нуклеиновых кислот
10468	1.59E-08	6.28E-07	регуляция генной экспрессии
51171	1.71E-08	6.28E-07	регуляция процессов метаболизма соединений азота
31326	1.85E-08	6.28E-07	регуляция процессов биосинтеза
9889	1.98E-08	6.28E-07	регуляция процессов биосинтеза
60255	3.82E-08	7.52E-07	регуляция процессов метаболизма макромолекул
80090	4.99E-08	9.20E-07	регуляция процессов первичного метаболизма
31323	6.90E-08	1.07E-06	регуляция процессов клеточного метаболизма
19222	1.09E-07	1.40E-06	регуляция процессов метаболизма
44260	8.04E-07	6.78E-06	процессы клеточного метаболизма макромолекул
43170	1.87E-06	1.31E-05	процессы метаболизма макромолекул
44237	7.54E-06	4.19E-05	процессы клеточного метаболизма
44238	9.93E-06	5.14E-05	процессы первичного метаболизма
50794	2.50E-05	1.18E-04	регуляция клеточных процессов
8152	2.78E-05	1.28E-04	процессы метаболизма
50789	3.54E-05	1.60E-04	регуляция биологических процессов
65007	5.45E-05	2.33E-04	биологическая регуляция
9987	2.65E-04	1.03E-03	клеточные процессы

<sup>a</sup> GO-ID – идентификационный номер в онтологии генов.

<sup>b</sup> FDR – средняя доля ложных отклонений поправленного *p*-value.

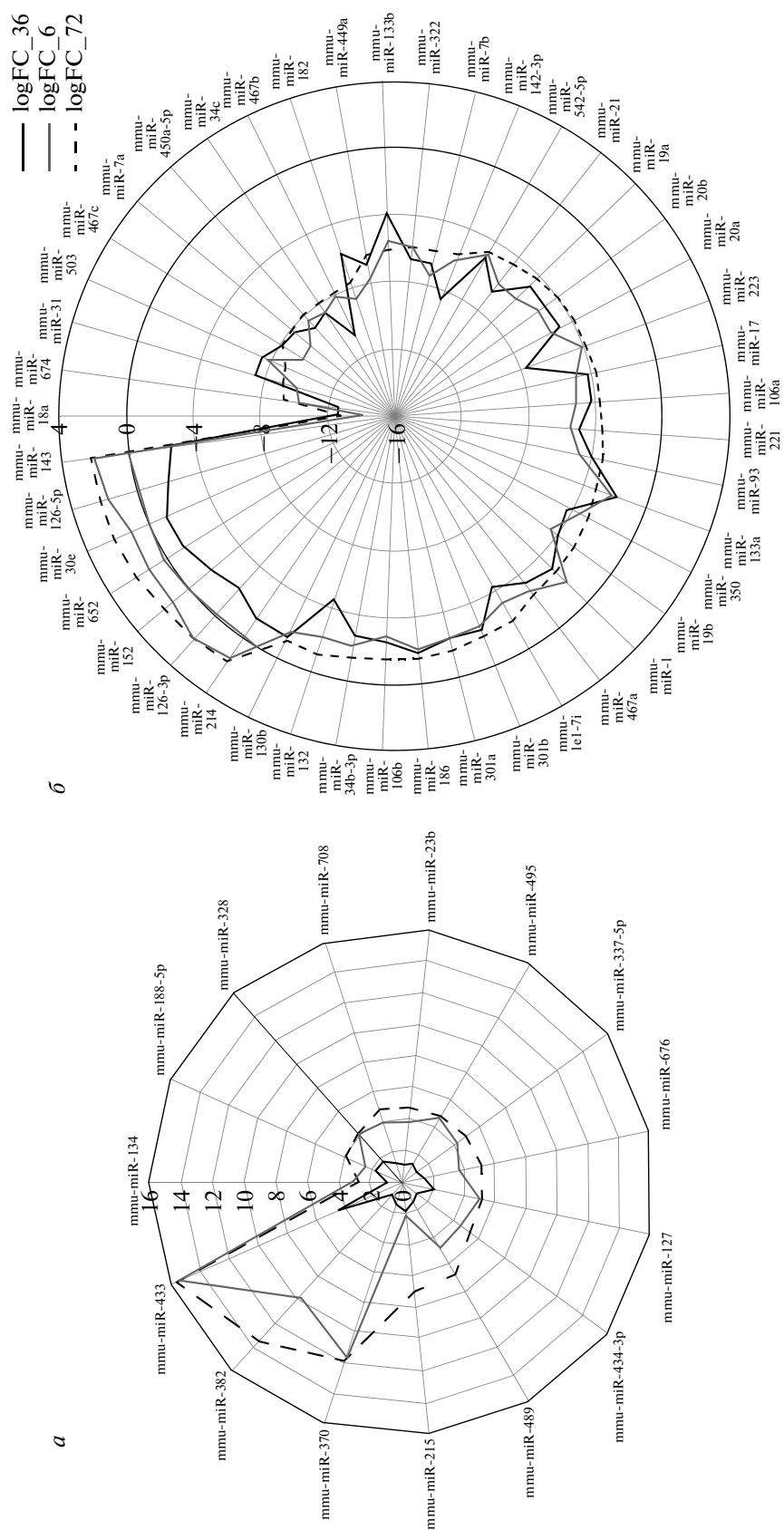
**Таблица 2.** Биологические процессы, преобладающие в модуле В

GO-ID	<i>p</i> -value	FDR	Описание функции
7155	4.63E-08	3.90E-06	клеточная адгезия
22610	4.63E-08	3.90E-06	биологическая адгезия
48513	1.24E-05	3.14E-04	развитие органов
16043	2.77E-05	6.29E-04	организация компонентов клетки
48731	4.16E-05	8.59E-04	системное развитие
48856	6.58E-05	1.24E-03	развитие анатомических структур
7275	1.17E-04	1.77E-03	развитие многоклеточных организмов
32502	1.64E-04	2.33E-03	процессы развития
9987	2.65E-04	3.00E-03	клеточные процессы
32501	1.52E-03	1.08E-02	процессы в многоклеточном организме

вые 60 ч снижается, а затем растет. Наиболее значительным колебаниям подвержена экспрессия miРНК mmi-miR-143, и, скорее всего, именно эта miРНК играет существенную роль в процессе заживлении растяжений мышц.

### ***Поиск генов-мишеней для mmi-miR-143***

Набор miРНК и их генов-мишеней получен из базы данных TargetScan; 510 генов идентифицированы как гены-мишени mmi-miR-143 (Приложение, табл. 3).



**Рис. 2.** Профили экспрессии общих для всех временных точек дифференциально экспрессируемых miRNA (визуализация с помощью Strip, линии смоделированы по точкам). *а* — logFC распределение для miRNA, уровень экспрессии которых снижен по сравнению с контролем; *б* — logFC распределение для miRNA, уровень экспрессии которых выше, чем в контроле.

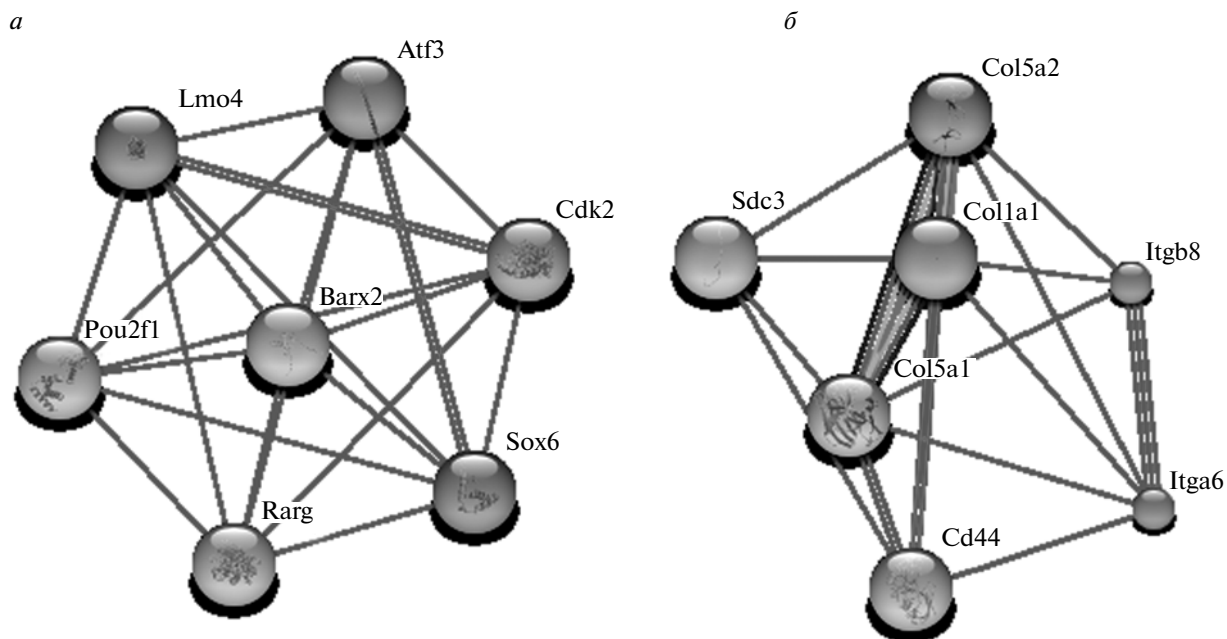


Рис. 3. Два идентифицированных модуля белковой сети: модуль А (а) и модуль В (б).

#### Построение сети белок-белковых взаимодействий с помощью KUPS

Продукты найденных 510 генов-мишеней проанализированы с помощью KUPS – с целью предсказать взаимодействия между ними. Полученная в результате белковая сеть включает 314 пар белков (Приложение, табл. 4).

#### Анализ модулей в сети белковых взаимодействий

В полученной белковой сети с помощью плагина Mcode (FDR < 0.05) найдено два модуля. Как показано на рис. 3, каждый модуль содержит по 7 белков. За исключением Cdk2, большинство генов в модуле А не известны, тогда как большинство продуктов генов из модуля В относятся к семейству COL (Col1a, Col5a и Col5b) и к семейству интегринов (Itgb8 и Itga6).

#### Анализ наиболее представленных элементов геной онтологии (GO)

Функции каждого модуля аннотированы с помощью гипергеометрического анализа онтологии генов. В модуле А и модуле В наиболее представлены 20 и 10 биологических процессов, самыми распространенными оказались, соответственно, регуляция транскрипции и клеточная адгезия (табл. 1 и 2).

#### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Растяжение – это одно из наиболее распространенных повреждений мышц, и до сих пор не найдены эффективные способы его лечения. Между тем, заживление растяжения представляет собой комплексный процесс, требующий совместных усилий многих регуляторов. Изучение механизма заживления растяжения методами биоинформатики может привести к новым подходам в терапевтических методах лечения этой травмы.

В данной работе в стволовых клетках мышц мышцей с растяжением мышц нами идентифицировано 60 дифференциально экспрессируемых miРНК. Среди них наиболее значительно меняется уровень экспрессии mmi-miR-143, поэтому эту miРНК мы приняли за маркер тканей, травмированных растяжением.

Mmi-miR-143 – это мышечный вариант miR-143, высококонсервативной среди всех позвоночных. Считается, что aberrantная экспрессия miR-143 задействована в развитии многих заболеваний, таких как рак или патологии сердца [19, 20]. С недавних пор все большее число исследователей связывают miR-143 с излечением травм. Например, сообщается, что miR-143 активируется после травмы и совместно с miR-145 инактивирует транскрипционные репрессоры, таким образом вызывая дифференцировку и подавляя пролиферацию клеток мышц [21]. В другой работе показано, что формирование рубцовой ткани в ответ на повреждение значительно заторможено у мутантных мышцей, у которых отсутствует miR-

143, что связано с дезорганизацией актиновых волокон и снижением миграционной активности стволовых клеток мышц [22]. Таким образом, полученные нами результаты согласуются с ранее известными, что miR-143 играет важную роль в регуляции дифференцировки мышечных клеток и регенерации тканей после повреждения.

Нами показано, что в модуль А попали продукты 7 генов-мишеней mmi-miR-143, в том числе Cdk2, и большинство из них участвуют в регуляции транскрипции. Cdk2 относится к семейству циклин-зависимых киназ, весьма похожа на Cdk1 человека и играет важную роль в переходе клеток из G1- в S-фазу, выступая как каталитическая субъединица в циклинкиназном комплексе [23]. Белки клеточного цикла могут регулировать пролиферацию клеток в процессе заживления растяжения. Действительно, количество Cdk2 повышается через трое суток после травмы [24]. Хотя для большинства генных продуктов из модуля А не известна связь с растяжением мышц, их можно рассматривать как потенциальные маркеры этого заболевания.

Наше внимание было сосредоточено на модуле В белковой сети. В этот модуль также вошли продукты 7 генов, и большая их часть относится к семействам COL (Col1a, Col5a и Col5b) и интегринов (Itgb8 и Itga6) (рис. 3б). Неудивительно, что модуль В обогащен белками, функционально связанными с процессом клеточной адгезии.

Члены семейства COL – это группа белков, которые относятся к коллагенам. Всего описано около 34 белков. Коллаген – основной компонент внеклеточного матрикса и наиболее распространенный белок в организме млекопитающих – составляет 25–35% всего белка, содержащегося в организме [25]. Функции внеклеточного матрикса не ограничиваются связыванием клеток в тканях, он также направляет развитие и перемещение стволовых клеток в процессе заживления повреждений. Более того, внеклеточный матрикс передает клеткам сигналы окружающей среды [26], и важнейшим компонентом этого пути передачи сигнала служат интегрины.

Интегрины – это рецепторы на поверхности клеток, которые, как считается, опосредуют связи между клетками и тканями. Интегрины могут связываться с различными компонентами межклеточного матрикса, например, с коллагенами, и действовать совместно с ними, обеспечивая взаимодействие клеток и межклеточного матрикса, что позволяет клеткам давать быстрый ответ на изменения в окружающей среде [27]. Заживление повреждений представляет собой комплексный процесс, требующий совместных усилий многих различных компонентов. И интегрины, и коллаген способствуют пролиферации, миграции и адгезии клеток в поврежденном участке [28, 29].

Сообщается, что коллаген типа VIII и интегрин  $\beta 1$  экспрессируются в большом числе тканей, подверженных активной реконструкции после полученной травмы [30]. Тем не менее, исследователи редко фокусируют внимание на этой области. Мы впервые сообщаем о том, что коллаген (Col1a, Col5a и Col5b) и интегрины (Itgb8 и Itga6) при совместной работе могут участвовать в заживлении растяжений. Конечно, для понимания механизмов того, как эти гены реализуют свои биологические функции в процессе заживления растяжения, требуется экспериментальная проверка.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В образцах поврежденных тканей идентифицировано 60 дифференциально экспрессируемых miРНК. Одна из этих miРНК, mmi-miR-143, предсказана как возможный маркер растяжения мышц. Выявлено 510 генов-мишеней mmi-miR-143 и для кодируемых ими продуктов построена сеть, включающая 314 пар взаимодействующих белков. В этой сети выделено два модуля. Мы сосредоточили свое внимание на модуле В. На основании полученных результатов нами выдвинуто предположение, что коллагены (Col1a, Col5a и Col5b) и интегрины (Itgb8 и Itga6) работают совместно, способствуя заживлению растяжений через процессы клеточной адгезии. Конечно, гипотеза требует дальнейшей проработки и подтверждения.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Slavotinek J.P. 2010. Muscle injury: the role of imaging in prognostic assignment and monitoring of muscle repair. *Semin. Musculoskelet. Radiol.* 194–200.
2. Garrett Jr W.E. 1990. Muscle strain injuries: clinical and basic aspects. *Med. Sci. Sports Exercise.* 22, 436–443
3. Järvinen T.A.H., Kääriäinen M., Järvinen M., Kalimo H. 2000. Muscle strain injuries. *Curr. Opin. Rheumatol.* 12, 155–161.
4. Kasemkijwattana C., Menetrey J., Bosch P., Somogyi G., Moreland M.S., Fu F.H., Buranapanitkit B., Watkins S.S., Huard J. 2000. Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 370–272.
5. Ge Y., Zhao K., Qi Y., Min X., Shi Z., Qi X., Shan Y., Cui L., Zhou M., Wang Y. 2013. Serum microRNA expression profile as a biomarker for the diagnosis of pertussis. *Mol. Biol. Rep.* 40, 1325–1332.
6. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell.* 120, 15–20.
7. Callis T.E., Deng Z., Chen J.F., Wang D.Z. 2008. Muscling through the microRNA world. *Exp. Biol. Med.* 233, 131–138.

8. Liu N., Williams A.H., Maxeiner J.M., Bezprozvanaya S., Shelton J.M., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. 2012. MicroRNA-206 promotes skeletal muscle regeneration and delays progression of Duchenne muscular dystrophy in mice. *J. Clin. Investigation*. **122**, 2054–2065.
9. Cheung T.H., Quach N.L., Charville G.W., Liu L., Park L., Edalati A., Yoo B., Hoang P., Rando T.A. 2012. Maintenance of muscle stem-cell quiescence by microRNA-489. *Nature*. **482**, 524–528.
10. Troyanskaya O., Cantor M., Sherlock G., Brown P., Hastie T., Tibshirani R., Botstein D., Altman R.B. 2001. Missing value estimation methods for DNA microarrays. *Bioinformatics*. **17**, 520–525.
11. Fujita A., Sato J.R., Rodrigues L.O., Ferreira C.E., Sogayar M.C. 2006. Evaluating different methods of microarray data normalization. *BMC Bioinformatics*. **7**, 469.
12. Smyth G. 2005. Limma: linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and computational biology solutions using R and bioconductor*. Eds Gentleman R., Carey V., Dudoit S., Irizarry R., Huber W. Springer, N.Y., pp. 397–420.
13. Patil A., Nakai K., Nakamura H. 2011. HitPredict: a database of quality assessed protein–protein interactions in nine species. *Nucl. Acids Res.* **39**, D744–D749.
14. Friedman R.C., Farh K.K.H., Burge C.B., Bartel D.P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105.
15. Chen X., Jeong J.C., Dermyer P. 2011. KUPS: constructing datasets of interacting and non-interacting protein pairs with associated attributions. *Nucl. Acids Res.* **39**, D750–D754.
16. Shannon P., Markiel A., Ozier O., Baliga N.S., Wang J.T., Ramage D., Amin N., Schwikowski B., Ideker T. 2003. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* **13**, 2498–2504.
17. Rivera C.G., Vakil R., Bader J.S. 2010. NeMo: network module identification in Cytoscape. *BMC Bioinformatics*. **11**, S61.
18. Maere S., Heymans K., Kuiper M. 2005. BiNGO: a Cytoscape plugin to assess overrepresentation of gene ontology categories in biological networks. *Bioinformatics*. **21**, 3448–3449.
19. Trakooljul N., Hicks J., Liu H.C. 2010. Identification of target genes and pathways associated with chicken microRNA miR143. *Anim. Genet.* **41**, 357–364.
20. Song T., Zhang X., Wang C., Wu Y., Dong J., Gao J., Cai W., Hong B. 2011. Expression of miR-143 reduces growth and migration of human bladder carcinoma cells by targeting cyclooxygenase-2. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **12**, 929–933.
21. Ivey K.N., Srivastava D. 2010. MicroRNAs as regulators of differentiation and cell fate decisions. *Cell Stem Cell*. **7**, 36–41.
22. Xin M., Small E.M., Sutherland L.B., Qi X., McAnally J., Plato C.F., Richardson J.A., Bassel-Duby R., Olson E.N. 2009. MicroRNAs miR-143 and miR-145 modulate cytoskeletal dynamics and responsiveness of smooth muscle cells to injury. *Genes Dev.* **23**, 2166–2178.
23. Liu H.F., Zhang F.M., Liu B.C., Jia X.W., Ye M. 2011. Roles of DNA dependent protein kinase in silica-induced cyclin E and CDK2 expressions and cell cycle changes in human embryo lung fibroblasts. *Zhonghua Lao Dong Wei Sheng Zhi Ye Bing Za Zhi [Chin. J. Ind. Hyg. Occup. Dis.]* **29**, 241–245.
24. Chung J.K., Lee T., Jung I.M., Kim Y.K., Min S.K., Suh J.W., Kim S.J. 2004. Expression of cell cycle regulators during smooth muscle cell proliferation after balloon catheter injury of rat artery. *J. Korean Med. Sci.* **19**, 327–332.
25. Di Lullo G.A., Sweeney S.M., Körkkö J., Ala-Kokko L., San Antonio J.D. 2002. Mapping the ligand-binding sites and disease-associated mutations on the most abundant protein in the human, type I collagen. *J. Biol. Chem.* **277**, 4223–4231.
26. Hynes R.O. 2009. The extracellular matrix: not just pretty fibrils. *Science*. **326**, 1216–1219.
27. Hynes R.O. 2002. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell*. **110**, 673–687.
28. Upadhyay J., Aitken K.J., Damdar C., Bolduc S., Bāgli D.J. 2003. Integrins expressed with bladder extracellular matrix after stretch injury *in vivo* mediate bladder smooth muscle cell growth *in vitro*. *J. Urol.* **169**, 750–755.
29. Moiseeva E.P. 2001. Adhesion receptors of vascular smooth muscle cells and their functions. *Cardiovasc. Res.* **52**, 372–386.
30. Hou G., Mulholland D., Gronska M.A., Bendeck M.P. 2000. Type VIII collagen stimulates smooth muscle cell migration and matrix metalloproteinase synthesis after arterial injury. *Am. J. Pathol.* **156**, 467–476.