

Исследование экспрессии генов рецептора глюкокортикоидов и микроРНК в гиппокампе и концентрации кортизола в крови у лисиц, селекционируемых по реакции на человека

В.Ю. Овчинников, Е.В. Антонов, Г.В. Васильев, С.Г. Шихевич, Д.В. Шепелева, Ю.Э. Гербек 

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

Стресс-реакция во многих случаях является одной из причин формирования агрессивного поведения как у животных, так и у человека. Ослабление стресс-ответа, по-видимому, существенно снижает агрессию по отношению к человеку у domesticированных животных. Однако механизмы этого снижения по-прежнему остаются далеко не ясны. В настоящей работе на экспериментальной модели доместикации, серебристо-черной лисице (*Vulpes vulpes*), полученной путем многолетнего отбора на реакцию к человеку, изучен ответ на стресс по уровню кортизола в крови у domesticируемых и агрессивных лисиц, вызванный 15-минутным удержанием на руках человека. Кроме того, у животных из этих поведенческих групп исследован один из важных механизмов глюкокортикоидной отрицательной обратной связи – экспрессия гена рецептора глюкокортикоидов (*NR3C1*) в гиппокампе. В работах последних лет существенное внимание уделяется различиям в профиле экспрессии микроРНК у животных с разным поведением и стресс-реакцией, а также микроРНК-регуляции экспрессии генов при стрессе, в том числе *NR3C1*. В этой работе проведен miRNA-seq анализ образцов участка дорзального гиппокампа. Показано, что удержание на руках человека вызывает глюкокортикоидный стресс-ответ как у domesticируемых, так и у агрессивных лисиц. При этом у агрессивных животных стресс-индуцированный уровень кортизола был достоверно выше по сравнению с domesticируемыми. В то же время различий экспрессии гена *NR3C1* в дорзальном гиппокампе и профиле экспрессии микроРНК не обнаружено. Таким образом, снижение стресс-ответа при отборе лисиц на отсутствие агрессивной и проявление эмоционально-положительной реакции к человеку, по-видимому, не связано с такими важными механизмами регуляции, как изменение экспрессии гена *NR3C1* и микроРНК-регуляция.

Ключевые слова: доместикация; кортизол; ручные лисицы; *NR3C1*; микроРНК.

КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Овчинников В.Ю., Антонов Е.В., Васильев Г.В., Шихевич С.Г., Шепелева Д.В., Гербек Ю.Э. Исследование экспрессии генов рецептора глюкокортикоидов и микроРНК в гиппокампе и концентрации кортизола в крови у лисиц, селекционируемых по реакции на человека. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2018;22(2):230-234. DOI 10.18699/VJ18.352

HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Ovchinnikov V.Yu., Antonov E.V., Vasilyev G.V., Shihevich S.G., Shepeleva D.V., Herbeck Yu.E. Hippocampal glucocorticoid receptor and microRNA gene expression and serum cortisol concentration in foxes selected for behavior toward humans. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2018;22(2):230-234. DOI 10.18699/VJ18.352 (in Russian)

Hippocampal glucocorticoid receptor and microRNA gene expression and serum cortisol concentration in foxes selected for behavior toward humans

V.Yu. Ovchinnikov, E.V. Antonov, G.V. Vasilyev, S.G. Shihevich, D.V. Shepeleva, Yu.E. Herbeck 

Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

In many cases, stress reactivity is one of the important bases of aggressive behavior. It appears as if reduced stress reactivity underlies an abrupt decrease in aggression towards man in domesticated animals. However, the mechanisms of this reduction have yet to be resolved. In this work, we used an experimental domestication model, the silver fox selected for many years for the response to humans to study cortisol stress reactivity in tame and aggressive foxes in response to immobilization in human arms. Additionally, these behavioral fox groups were explored for one of the important mechanisms of glucocorticoid negative feedback, the expression of the glucocorticoid receptor gene (*NR3C1*) in a portion of the dorsal hippocampus. In recent years, attention has been paid to differences in miRNA expression patterns between animals with different behavior and stress reactivity, as well as to miRNA regulation under stress. The same applies to *NR3C1* mRNA as well. That is why we performed a miRNA-seq analysis on a portion of the fox dorsal hippocampus. It has been demonstrated that immobilization in human arms leads to significantly higher stress-induced cortisol levels in aggressive than tame foxes. At the same time, no differences have been found between hippocampal *NR3C1* gene expression and the pattern of miRNA expression. Thus, reduced stress reactivity in foxes during selection for the absence of aggressive responses and for the presence of emotionally positive responses to humans does not seem to be associated with important mechanisms of regulation such as alterations in hippocampal *NR3C1* gene expression or microRNA-mediated silencing.

Key words: domestication; cortisol; tame foxes; *NR3C1*; miRNA.

В исследованиях последнего десятилетия показана важная роль микроРНК в регуляции нейральных функций. В частности, они участвуют в регуляции поведения (тревожности/страха), обучении, формировании памяти. Роль микроРНК в регуляции стресс-ответа также широко изучается в последнее время (Hollins, Cairns, 2016). Это относится и к генетически закрепленным различиям в поведении и стресс-ответе. Например, линии крыс, селекционированных на высокую (bHR) и низкую (bLR) активность в новых условиях, у которых различны уровни стресс-реакции, агрессивности и других поведенческих реакций, имеют также различия в паттерне экспрессии микроРНК как в покое, так и после стресса в разных структурах мозга (Hamilton et al., 2014). Есть работы и на других видах, в том числе собаках разных пород, имеющих различные характеристики по толерантности к стрессу (Luo et al., 2016). В исследованиях на человеке выявлена ассоциация однонуклеотидных полиморфизмов (ОНП) в последовательностях микроРНК с агрессивным поведением и возникновением заболеваний ЦНС (Hollins, Cairns, 2016).

Для изучения регуляции стресс-ответа одной из наиболее важных структур мозга является гиппокамп, осуществляющий глюкокортикоидную отрицательную обратную связь, купирующую стресс. В настоящее время известно большое количество микроРНК, изменяющих свою экспрессию в гиппокампе под воздействием стрессорных факторов различной природы и продолжительности – от острого до хронического и пренатального стресса. Многие из этих микроРНК участвуют и в других нервных процессах (Hollins, Cairns, 2016).

Важным для понимания природы таких форм поведения, как агрессия, ручное поведение, тревожность/страх, является изучение процессов доместикации животных. Историческая доместикация коренным образом изменила поведение животных. Вероятно, основой этого было ослабление стресс-ответа, благодаря чему человек перестал вызывать стресс у животных (Беляев, 1981; Coppinger R., Coppinger L., 2002). В данной работе использовали экспериментальную модель доместикации, созданную на лисицах в Институте цитологии и генетики СО РАН (г. Новосибирск) путем длительной селекции против агрессии и по усилению эмоционально-положительного ответа по отношению к человеку. Ранее у доместизируемых лисиц было показано снижение глюкокортикоидного стресс-ответа и базального уровня глюкокортикоидов в крови (Беляев и др., 1971; Оськина и др., 2008), а также ослабление активности гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системы (ГГНС) в других звеньях. Более быстрое возвращение кортизола к базальному уровню после стресса указывает на усиление глюкокортикоидной отрицательной обратной связи у доместизируемых лисиц (Trut et al., 2009). Это может быть связано с повышенной экспрессией гена рецепторов глюкокортикоидов (*NR3C1*) в гиппокампе, отношением количества рецепторов глюкокортикоидов и минералокортикоидов (*NR3C1/NR3C2*), снижением *CRHR1* в гипоталамусе и рядом других генов (Weaver et al., 2004; de Kloet et al., 2017; Dow-Edwards, Silva, 1917). Из литературы известно, что изменение экспрессии этих генов во время стресс-ответа может быть обусловлено с

микроРНК-регуляцией (Jung et al., 2015; Hollins, Cairns, 2016). В частности, показано, что miR-124 изменяет свою экспрессию в гиппокампе грызунов при длительном стрессе и депрессии (Meerson et al., 2010; Wang et al., 2017), при этом мРНК *NR3C1* является ее мишенью (Wang et al., 2017). Для исследования возможного участия микроРНК в формировании доместикационного поведения и снижении стресс-ответа у доместизируемых лисиц в первую очередь нужно изучить различия в уровне микроРНК в покое. Так, укрепление глюкокортикоидной отрицательной обратной связи и снижение стресс-ответа у взрослых крыс, подвергавшихся неонатальному хэндлингу, и у потомков матерей, активно заботящихся о детенышах, ассоциировано именно с повышенной экспрессией гена *NR3C1* в гиппокампе в покое. Причем показана прямая связь количества мРНК с количеством белка Nr3c1 (Liu et al., 1997; Weaver et al., 2004).

Целью данного исследования было изучение базальной экспрессии гена рецептора глюкокортикоидов и профиля экспрессии микроРНК в дорзальном гиппокампе лисиц в зависимости от поведения по отношению к человеку и активности ГГНС.

Проведен анализ базального количества мРНК *NR3C1* методом ОТ-ПЦР в реальном времени и профиля экспрессии с помощью метода miRNA-seq в участке дорзального гиппокампа, а также базального и стрессорного уровня кортизола в ответ на 15-минутное удержание животного на руках человека, с применением высокоэффективной жидкостной хроматографии.

Материалы и методы

Экспериментальные животные. Лисицы селекционированы и содержатся в ЦКП «Генофонды пушных и сельскохозяйственных животных» ИЦиГ СО РАН (Новосибирск). Доместизируемые лисицы получены путем длительной селекции на эмоционально-положительную реакцию на человека, а агрессивные – на усиление агрессивной реакции (Trut et al., 2009). Образцы крови взяты у шестимесячных самцов перед удержанием на руках человека в течение 15 мин и сразу после этого воздействия. Лисиц умерщвляли путем введения 5.0 % раствора тиопентала натрия. Фрагменты дорзального гиппокампа взяты у семимесячных самцов. Эксперименты проводили в соответствии с международными европейскими биоэтическими стандартами (директива 2010/63/EU).

Хроматографический анализ. Содержание кортизола в сыворотке крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (хроматограф Agilent 1200 Series LC) с применением диодноматричного детектора. Для концентрирования образцов использовали жидкостную экстракцию дихлорэтаном. Элюирование проводили в изократическом режиме – 30 % ацетонитриле в воде со скоростью подачи элюента 1 мл/мин. Для количественного анализа выбрана длина волны 246 нм. Хроматографическое разделение выполняли на колонке ZORBAX C18 2 × 150 мм (5 мкм). Концентрации вычисляли по внутреннему стандарту (дексаметазон). Следует отметить, что процедура забора образцов крови или умерщвления для взятия образцов мозга у лисиц занимает 5 мин. За это время уровень кортизола уже успевает под-

няться достоверно, хотя и на малую величину (Беляев и др., 1971). Поэтому базальный уровень нельзя считать таковым в полной мере.

Выделение суммарной РНК и ОТ-ПЦР в реальном времени. Суммарную РНК выделяли с помощью TRIzol™ Reagent (Invitrogen, США) ($n = 5$ животных в каждой группе). Удаление геномной ДНК проводили с использованием фермента ДНКазы I, свободного от рибонуклеаз (Thermo Fisher Scientific, США). кДНК синтезировали в реакционной смеси объемом 20 мкл, включающей 0.2 мкг суммарной РНК, обратную транскриптазу RevertAid (Thermo Fisher Scientific, США) и праймер полиТ(15) (Биоссет, Россия). ПЦР в реальном времени (денатурация ДНК 95 °C 5 мин и 40 циклов амплификации: 95 °C 30 с, 60 °C 20 с и 72 °C и 20 с) проводили на приборе ViiA7 Real-Time PCR System (Life Technologies) с применением реакционной смеси Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, США). Последовательности праймеров к генам *NR3C1* (F: 5'-ACTGCTTCTCTTCCAGTTCC-3'; R: 5'-AGTTCTGGCTGGAGTTCCC-3') и *CANX* (референсный ген; F: 5'-GATGCCCTGCTAAGATTCC-3'; R: 5'-CTTCATCCCAATCCTCTGGC-3') подобраны при посредстве данных транскриптома лисицы (Kukekova et al., 2011). Специфичность продуктов ПЦР определяли с помощью секвенирования по Сенгеру (ЦКП «Геномика» СО РАН), анализа кривых плавления и гель-электрофореза. Все ПЦР выполнены в тройных технических повторях. Оценку количества мРНК проводили путем анализа значений пороговых циклов Ct с помощью модифицированного метода $\Delta\Delta Ct$ с применением программы GenEx 5.4.1 (MultiD, Швеция). Эффективность реакции определяли серией разбавлений кДНК.

Секвенирование микроРНК. Фракции малой РНК выделены из препаратов тотальной РНК с помощью mirVana kit (Thermo Fisher Scientific, США). Качество и доля микроРНК в составе фракции малых РНК определены на биоанализаторе BA2100 набором Small RNA Kit (Agilent). Баркодированные библиотеки для секвенирования сконструированы благодаря использованию TruSeq Small RNA Library Preparation Kit (Illumina) в соответствии с протоколом изготовителя. Количество взятого в реакцию материала рассчитано так, чтобы доля фракции микроРНК (зона 20–40 нт) составляла 80 нг. Для амплификации использовано 11 циклов ПЦР. Финальную очистку проводили набором AMPure XP (Agencourt). Из полученных библиотек дополнительно выделена фракция 145–160 нт, содержащая последовательности микроРНК, с помощью LabChip XT (Caliper Life Sciences). Качество полученных библиотек и их молярность определены на биоанализаторе BA2100 набором DNA High Sensitivity. Все библиотеки отсекутены на приборе NextSeq 550 (Illumina) с длиной чтения 36 п. н.

Биоинформатический анализ. Результаты секвенирования отфильтрованы по качеству, с дальнейшим удалением последовательности адаптера и отбором по длине (в анализе остались последовательности с длиной 18–26 нуклеотидов). Геномная последовательность лисицы для предсказания микроРНК представлена в (Kukekova et al., unpublished). При использовании генома, программы miRCandRef (Fromm et al., 2013) и набора критериев мик-

роРНК (Fromm et al., 2015) были предсказаны микроРНК-кандидаты. Для удаления транскрибируемых геномных повторов и других РНК, кроме микроРНК, результаты предсказания были прокартированы программой Bowtie (Langmead, 2010) на последовательности из базы данных Rfam (12.3), кроме последовательностей микроРНК, на набор РНК собаки, полученный из баз данных RefSeq (Release 83) и GeneBank (Release 220), и на геном лисы, обработанный программой RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>). Далее мы определяли консервативные микроРНК среди некартированных последовательностей с помощью программы BLAST и набора микроРНК *Canis lupus familiaris* из базы данных miRBase (<http://mirbase.org/>).

Статистическая обработка результатов. При определении количества кортизола в крови применяли двухфакторный дисперсионный анализ с дальнейшим попарным сравнением с применением t -теста Стьюдента. Для попарного сравнения данных относительной экспрессии гена *NR3C1* и микроРНК в гиппокампе использовали критерий Манна–Уитни (U). Результаты представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего. Для всех случаев величина $p < 0.05$ считалась статистически значимой.

Результаты

Анализ количества кортизола в сыворотке крови в ответ на стресс. Двухфакторный дисперсионный анализ выявил эффект генотипа ($F_{1,37} = 26.01, p < 0.001$) и эффект стресса на уровень кортизола ($F_{1,37} = 64.5; p < 0.001$). Взаимодействие фактора генотипа и фактора стресса также достоверно ($F_{1,37} = 6.23; p < 0.001$). Базальный уровень кортизола в сыворотке крови у домашних лисиц был ниже, чем у агрессивных (рис. 1; $p < 0.05$). Повышение уровня кортизола в крови достоверно не зависело от генотипа ($p < 0.001$). У домашних лисиц рост уровня кортизола был достоверно ниже, чем у агрессивных (см. рис. 1; $p < 0.001$).

Анализ экспрессии гена *NR3C1* в участке дорзального гиппокампа. Уровень экспрессии гена *NR3C1* в участке дорзального гиппокампа сравнивали у домашних лисиц и агрессивных лисиц с использованием метода ОТ-ПЦР в реальном времени. Однако анализ полученных данных не выявил достоверных различий между группами (рис. 2; $p > 0.05$).

Биоинформатический анализ микроРНК. Обнаружено 319 консервативных микроРНК (163 семейства) и 9 новых микроРНК (Приложение 1¹) в гиппокампе лисицы. Но достоверных различий в экспрессии между группами не выявлено ($p > 0.05$).

Обсуждение

Полученные результаты показали, что удержание на руках человека является стрессом не только для агрессивных, но и для домашних лисиц, причем группы достоверно различаются как по базальному, так и по стресс-индуцированному уровню кортизола. Это подтверждает данные, полученные на предыдущих поколениях селекции (Трут и др., 1972; Trut et al., 2009).

¹ Приложения 1 и 2 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2018-22/app5.pdf>

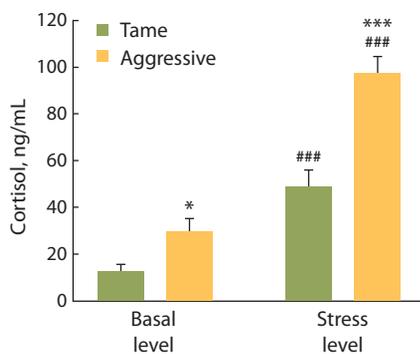


Fig. 1. Serum cortisol concentrations in tame and aggressive silver foxes before ("Basal level") and immediately after ("Stress level") 15-min immobilization in human arms, ng/mL.

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ in comparison with tame foxes at the same time since the beginning of the stress, ### $p < 0.001$ in comparison with the basal level.

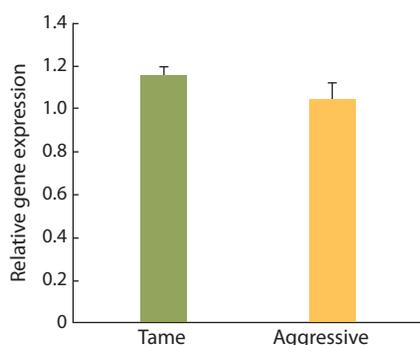


Fig. 2. Relative amounts of dorsal hippocampal *NR3C1* mRNA in tame and aggressive foxes.

В настоящей работе использован дополнительный стрессор – человек, на различное поведение к которому и селекционировали лисиц. В более ранних работах в качестве ограничения движения использовали рестриктор (Попова и др., 1980; Оськина и др., 2008). На другой экспериментальной модели доместикации, серой крысе, обнаружен сниженный уровень базального и стресс-индуцированного кортикоостерона (Дыгало и др., 1985; Plyusnina, Oskina, 1997), что свидетельствует о ключевой роли снижения стресс-ответа (Беляев, 1981; Coppinger R., Coppinger L., 2002). Однако более поздние поколения ручных и агрессивных крыс уже не имели достоверных отличий в уровне кортикоостерона за счет снижения стресс-реактивности у агрессивных животных.

При этом уровень агрессии сохранялся прежним (Прасолова и др., 2014). Тем не менее следует учитывать, что на крысах до сих пор не проведен эксперимент, где в качестве стрессора выступал бы человек.

Несмотря на различия в количестве мРНК *NR3C1* и его белка у ручных и агрессивных крыс в гиппокампе (Оськина и др., 2008; Гербек и др., 2010), аналогичных различий в количестве мРНК этого гена в гиппокампе лисиц в данном исследовании не обнаружено. Возможно, у domesticируемых лисиц пониженный стресс-ответ и его более быстрое купирование (Оськина и др., 2008) осуществляются с помощью других механизмов отрицательной обратной связи, например изменения соотношения *NR3C1/NR3C2* в гипоталамусе или эндоканнабиноидной системы.

При анализе микроРНК в участке дорзального гиппокампа мы выявили 319 консервативных микроРНК (163 семейства) и 9 новых микроРНК (Приложение 1). Следует отметить, что последовательности предшественников ортологичных микроРНК собаки и лисицы в основном идентичны. Мы ожидали увидеть разницу в уровнях экспрессии микроРНК в гиппокампе у двух групп лисиц, отличающихся по стресс-ответу, агрессии и тревожности, так как микроРНК-регуляция затрагивает ряд генов, участвующих в этих реакциях в разных структурах мозга (Hamilton et al., 2014; Hollins, Cairns, 2016). Исследование базального уровня микроРНК у двунаправленно селекционируемых групп крыс (bHR и bLR), отличающихся по подобным же признакам, показало достоверные различия между группами в *nucleus accumbens* и *prelimbic cortex*. Д.Е. Hamilton с коллегами предполагают наличие подобных различий в профиле микроРНК также в гиппокампе и миндалине (Hamilton et al., 2014). Однако в нашем исследовании не выявлено значимой разницы в экспрессии не только у микроРНК, ортологи которой, по данным литературы, изменяют экспрессию при разных формах стресса (Hollins, Cairns, 2016) (Приложение 2), но и у остальных обнаруженных микроРНК.

Таким образом, ни количество *NR3C1* мРНК, ни профиль микроРНК достоверно не различаются в гиппокампе, ключевой площадке регуляции стресс-ответа, несмотря на достоверные различия в базальном и стресс-индуцированном уровне кортизола. По-видимому, отбор на разные формы поведения не повлиял на уровень экспрессии гена рецептора глюкокортикоидов и на профиль экспрессии микроРНК в дорзальном гиппокампе, а связанные с этим видом отбора изменения в стресс-реактивности обусловлены изменениями в других ветвях регуляции функционирования ГГНС.

Acknowledgments

This work was supported by the Russian Science Foundation, project 16-14-10216. The infrastructure of the study was supported by State Budgeted Project 0324-2018-0016.

The authors acknowledge the help of Cand. Sci. (Biol.) A.V. Kharlamova and to A.V. Vladimirova, I.V. Pivovarova, T.I. Semenova, and the staff of the Shared Access Center "Gene Pools of Fur and Farm Animals", Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk. miRNA sequencing was conducted at the Shared Access Center for Genomic Studies, Institute of Cytology and Genetics, Novosibirsk.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References

- Belyaev D.K. Destabilizing selection as a factor in domestication. *Genetika i blagosostoyanie chelovechestva [Genetics and Animal Well-Being]*. Moscow: Nauka Publ., 1981;53-66. (in Russian)
- Belyaev D.K., Naumenko E.V., Trut L.N., Korshunov E.A. Function of the adrenal cortex and its seasonal changes in silver foxes. *Doklady AN SSSR = Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR*. 1971;200(5):1249-1251. (in Russian)
- Coppinger R., Coppinger L. *Dogs: a New Understanding of Canine Origin, Behavior and Evolution*. Chicago, 2002.
- de Kloet E.R., Ortiz Z., Meijer O.C. Manipulating the brain corticosteroid receptor balance: focus on ligands and modulators. *Stress: Neuroendocrinology and Neurobiology*. 2017;367-383.

- Dow-Edwards D., Silva L. Endocannabinoids in brain plasticity: Cortical maturation, HPA axis function and behavior. *Brain Res.* 2017; 1654:157-164. DOI 10.1016/j.brainres.2016.08.037.
- Dygalov N.N., Shishkina G.T., Borodin P.M., Naumenko E.V. Role of the brain neurochemical systems in altering the reactivity of the hypothalamic-adrenal system in the gray rat selected for behavior. *Zhurnal evolyutsionnoy biokhimi i fiziologii = Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology.* 1985;21(4):342-347. (in Russian)
- Fromm B., Billipp T., Peck L.E., Johansen M., Tarver J.E., King B.L., Newcomb J.M., Sempere L.F., Flatmark K., Hovig E., Peterson K.J. A uniform system for the annotation of vertebrate microRNA genes and the evolution of the human microRNAome. *Annu. Rev. Genet.* 2015;49:213-242. DOI 10.1146/annurev-genet-120213-092023.
- Fromm B., Worren M.M., Hahn C., Hovig E., Bachmann L. Substantial loss of conserved and gain of novel microRNA families in flatworms. *Mol. Biol. Evol.* 2013;30:2619-2628. DOI 10.1093/molbev/mst155.
- Hamilton D.E., Cooke C.L., Carter B.S., Akil H., Watson S.J., Thompson R.C. Basal microRNA expression patterns in reward circuitry of selectively bred high-responder and low-responder rats vary by brain region and genotype. *Physiol. Genomics.* 2014;46:290-301. DOI 10.1152/physiolgenomics.00152.2013.
- Herbeck Y.E., Oskina I.N., Gulevich R.G., Plyusnina I.Z. Effects of maternal methyl-supplement diet on hippocampal glucocorticoid receptor mRNA expression in rats selected for behavior. *Cytology and Genetics.* 2010;44:108-113. DOI 10.3103/S0095452710020064.
- Hollins S.L., Cairns M.J. MicroRNA: Small RNA mediators of the brains genomic response to environmental stress. *Prog. Neurobiol.* 2016;143:61-81. DOI 10.1016/j.pneurobio.2016.06.005.
- Jung S.H., Wang Y., Kim T., Tarr A., Reader B., Powell N., Sheridan J.F. Molecular mechanisms of repeated social defeat-induced glucocorticoid resistance: Role of microRNA. *Brain Behav. Immun.* 2015;44:195-206. DOI 10.1016/j.bbi.2014.09.015.
- Kukekova A.V., Johnson J.L., Teiling C., Li L., Oskina I.N., Kharlamova A.V., Gulevich R.G., Padte R., Dubreuil M.M., Vladimirova A.V., Shepeleva D.V., Shikhevich S.G., Sun Q., Ponnala L., Temnykh S.V., Trut L.N., Acland G.M. Sequence comparison of prefrontal cortical brain transcriptome from a tame and an aggressive silver fox (*Vulpes vulpes*). *BMC Genomics.* 2011;12. DOI 10.1186/1471-2164-12-482.
- Langmead B. Aligning short sequencing reads with Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinform.* 2010;32:11.7.1-11.7.14. DOI 10.1002/0471250953.bi1107s32.
- Liu D., Diorio J., Tannenbaum B., Caldji C., Francis D., Freedman A., Sharma S., Pearson D., Plotsky P.M., Meaney M.J. Maternal care, hippocampal glucocorticoid receptors, and hypothalamic-pituitary-adrenal responses to stress. *Science.* 1997;277:1659-1662. DOI 10.1126/science.277.5332.1659.
- Luo W., Fang M., Xu H., Xing H., Fu J., Nie Q. Comparison of miRNA expression profiles in pituitary-adrenal axis between Beagle and Chinese Field dogs after chronic stress exposure. *PeerJ.* 2016;4:e1682. DOI 10.7717/peerj.1682.
- Meerson A., Cacheaux L., Goossens K.A., Sapolsky R.M., Soreq H., Kaufer D. Changes in brain MicroRNAs contribute to cholinergic stress reactions. *J. Mol. Neurosci.* 2010;40:47-55. DOI 10.1007/s12031-009-9252-1.
- Oskina I.N., Herbeck Yu.E., Shikhevich S.G., Plyusnina I.Z., Gulevich R.G. Alterations in the hypothalamus-pituitary-adrenal and immune systems during selection of animals for tame behavior. *Informatsionnyy vestnik VOGiS = The Herald of Vavilov Society for Geneticists and Breeders.* 2008;12(1/2):39-49. (in Russian)
- Plyusnina I., Oskina I. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Physiol. Behav.* 1997;61:381-385. DOI 10.1016/S0031-9384(96)00445-3.
- Popova N.K., Voitenko N.N., Pavlova S.I., Trut L.N., Naumenko E.V., Belyaev D.K. Genetics and phenogenetics of the hormonal characteristics of animals. VII. Correlation between brain serotonin and the hypothalamo-pituitary-adrenal system in domesticated and undomesticated silver foxes during emotional stress. *Genetika = Genetics (Moscow).* 1980;16:1865-1870. (in Russian)
- Prasolova L.A., Gerbek Yu.E., Gulevich R.G., Shikhevich S.G., Koshchenko M.Yu., Kozhemyakina R.V., Oskina I.N., Plyusnina I.Z. The effects of prolonged selection for behavior on the stress response and activity of the reproductive system of male grey rats (*Rattus norvegicus*). *Russian Journal of Genetics.* 2014;50(8):846-852. DOI 10.1134/S1022795414080031.
- Trut L.N., Naumenko E.V., Belyaev D.K. Change in the pituitary-adrenal function of silver foxes during selection according to behavior. *Genetika = Genetics (Moscow).* 1972;8(5):35-43. (in Russian)
- Trut L., Oskina I., Kharlamova A. Animal evolution during domestication: The domesticated fox as a model. *BioEssays.* 2009;31:349-360. DOI 10.1002/bies.200800070.
- Wang S-S., Mu R-H., Li C-F., Dong S-Q., Geng D., Liu Q., Yi L-T. microRNA-124 targets glucocorticoid receptor and is involved in depression-like behaviors. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 2017;79:417-425. DOI 10.1016/j.pnpbp.2017.07.024.
- Weaver I.C.G., Cervoni N., Champagne F.A., D'Alessio A.C., Sharma S., Seckl J.R., Dymov S., Szyf M., Meaney M.J. Epigenetic programming by maternal behavior. *Nat. Neurosci.* 2004;7:847-854. DOI 10.1038/nm1276.