

# Роль генов апоптоза в контроле агрессивного поведения, выявленная с помощью комбинированного анализа ассоциативных генных сетей, экспрессионных и геномных данных по серым крысам с агрессивным поведением

А.О. Брагин<sup>1</sup>✉, О.В. Сайк<sup>1</sup>, И.В. Чадаева<sup>1,2</sup>, П.С. Деменков<sup>1</sup>, А.Л. Маркель<sup>1,2</sup>, Ю.Л. Орлов<sup>1,2</sup>, Е.И. Погаев<sup>1,3,4,5</sup>, И.Н. Лаврик<sup>1,6</sup>, В.А. Иванисенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук, Новосибирск, Россия

<sup>2</sup> Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, Россия

<sup>3</sup> Медицинская школа Массачусетского университета в Вустере, Вустер, Массачусетс, США

<sup>4</sup> Институт общей генетики Российской Академии наук, Москва, Россия

<sup>5</sup> Центр генетики и генетических технологий, биологический факультет, факультет биоинженерии и биоинформатики, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, Россия

<sup>6</sup> Магдебургский университет имени Отто фон Гуерике, Магдебург, Германия

Агрессивное поведение животных играет важную роль при защите территории, потомства, установлении социально-иерархических отношений и т.д. При ряде заболеваний (шизофрения, маниакально-депрессивный психоз, нейродегенеративные заболевания) наблюдается повышенная агрессия. В нейрогенезе большое значение в поддержании клеточного гомеостаза имеет нейрональный апоптоз. Нарушения нейронального апоптоза отмечаются при старении и различных нейропатологиях (эпилепсия, болезнь Альцгеймера, нейротравмы), сопровождающихся изменениями психоэмоционального состояния. Известно, что в мозге высокоагрессивных крыс значительно изменяется уровень экспрессии ключевых генов нейронального апоптоза (*Casp3*, *Bax* и *Bcl-xl*). В связи с этим актуальным является изучение связей нейронального апоптоза и агрессивного поведения. Целью данной работы был анализ ассоциативных сетей, описывающих молекулярно-генетические взаимодействия между генами/белками, вовлеченными в нейрональный апоптоз, дифференциально экспрессированными генами и генами, имеющими полиморфизмы, у серых крыс с агрессивным поведением. Выявлено 819 дифференциально экспрессирующихся генов в гипоталамусе, вентральной тегментальной области и в сером веществе периакведуктума у крыс с агрессивным и дружелюбным поведением. Анализ ассоциативной сети дифференциально экспрессирующихся генов позволил выявить три вершины с максимальной центральностью, которые соответствовали генам *Stx1a*, *Mbp* и *Th*. При анализе генома было обнаружено 137 полиморфных генов, три из которых (*Lig4*, *Parp1* и *Pigt*) вовлечены в нейрональный апоптоз. Показано, что среди генов, взаимодействующих в ассоциативной сети с генами, вовлеченными в нейрональный апоптоз, статистически значимо представлены полиморфные и дифференциально экспрессированные гены ( $p$ -value < 0.01). Реконструированы три молекулярно-генетические цепочки, описывающие связи между полиморфными генами и генами/белками нейронального апоптоза, опосредованные через дифференциально экспрессированные гены. Цепочки включали полиморфные гены *Tsc1*, *Adamts4* и *Lgals3*, дифференциально экспрессированные гены *Ezr*, *Acan*, *Th* и 19 генов нейронального апоптоза. Было показано, что процесс нейронального апоптоза тесно связан с агрессивным поведением у животных.

Ключевые слова: нейрональный апоптоз; агрессивное поведение; ANDSystem; ассоциативные генные сети; дифференциально экспрессирующиеся гены; полиморфизмы.

## Role of apoptosis genes in aggression revealed using combined analysis of ANDSystem gene networks, expression and genomic data in grey rats with aggressive behavior

A.O. Bragin<sup>1</sup>✉, O.V. Saik<sup>1</sup>, I.V. Chadaeva<sup>1,2</sup>, P.S. Demenkov<sup>1</sup>, A.L. Marke<sup>1,2</sup>, Yu.L. Orlov<sup>1,2</sup>, E.I. Pogayev<sup>1,3,4,5</sup>, I.N. Lavrik<sup>1,6</sup>, V.A. Ivanisenko<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institute of Cytology and Genetics SB RAS, Novosibirsk, Russia

<sup>2</sup> Novosibirsk State University, Novosibirsk, Russia

<sup>3</sup> University of Massachusetts Medical School, Worcester, USA

<sup>4</sup> Institute of General Genetics RAS, Moscow, Russia

<sup>5</sup> Center for Genetics and Genetic Technologies, Faculty of Biology, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

<sup>6</sup> Otto von Guericke University, Magdeburg, Germany

Aggressive behavior in animals plays an important role in protecting the territory, offspring, establishing social hierarchical relations, etc. Increased aggression is observed in a number of diseases (schizophrenia, bipolar disorder, brain degenerative disorders). Neuronal apoptosis is crucial in the maintenance of developmental processes during neurogenesis. Alterations in neuronal apoptosis are observed in aging and neuropathologies accompanied by changes in psycho-emotional state (epilepsy, Alzheimer's disease, neurotrauma). The expression of key neuronal apoptosis genes (*Casp3*, *Bax* and *Bcl-xl*) in the brain of highly aggressive rats is significantly altered. The aim of this work was to analyze associative networks that describe genetic interactions between genes/proteins involved in neuronal apoptosis, differentially expressed genes and genes with polymorphisms in grey rats with aggressive behavior. Analysis revealed 819 differentially expressed genes in the hypothalamus, ventral tegmental region and periaqueductus Sylvii grey matter in grey rats with aggressive and tame behavior. The *Stx1a*, *Mbp*

and *Th* genes have the highest index of betweenness centrality in the associative network of differentially expressed genes. Genome analysis revealed 137 polymorphic genes. Three of them (*Lig4*, *Parp1* and *Pigt*) were involved in neuronal apoptosis. It was shown that polymorphic and differentially expressed genes were statistically significantly overrepresented among genes interacting with neuronal apoptosis genes ( $p$ -value < 0.01). Three molecular-genetic chains describing connections between polymorphic and neuronal apoptosis genes mediated by differentially expressed genes were reconstructed. Chains included the polymorphic genes *Tsc1*, *Adamts4* and *Lgals3*, differentially expressed genes *Ezr*, *Acan*, *Th* and 19 neuronal apoptosis genes. It was shown that neuronal apoptosis is closely related to aggressive behavior in animals.

Key words: neuronal apoptosis; aggressive behavior; ANDSystem; associative gene networks; differentially expressed genes; polymorphisms.

#### КАК ЦИТИРОВАТЬ ЭТУ СТАТЬЮ:

Брагин А.О., Сайк О.В., Чадаева И.В., Деменков П.С., Маркель А.Л., Орлов Ю.Л., Робаев Е.И., Лаврик И.Н., Иванисенко В.А. Роль генов апоптоза в контроле агрессивного поведения, выявленная с помощью комбинированного анализа ассоциативных генных сетей, экспрессионных и геномных данных по серым крысам с агрессивным поведением. Вавиловский журнал генетики и селекции. 2017;21(8):911-919. DOI 10.18699/VJ17.312

#### HOW TO CITE THIS ARTICLE:

Bragin A.O., Saik O.V., Chadaeva I.V., Demenkov P.S., Markel A.L., Orlov Yu.L., Rogaev E.I., Lavrik I.N., Ivanisenko V.A. Role of apoptosis genes in aggression revealed using combined analysis of ANDSystem gene networks, expression and genomic data in grey rats with aggressive behavior. Vavilovskii Zhurnal Genetiki i Seleksii = Vavilov Journal of Genetics and Breeding. 2017;21(8):911-919. DOI 10.18699/VJ17.312 (in Russian)

Агрессивное поведение животных, как определил его один из основоположников этологии (науки о поведении) австрийский зоолог К. Лоренц (Lorenz, 2002), или инстинкт агрессии, направленной против собратьев по виду, у животных изучается уже давно и занимает ведущее место в научных исследованиях основ поведения. В настоящее время агрессию определяют как врожденную форму поведения и считают ее частью агонистического поведения (от греч. *agonistikos* – способный к борьбе, воинственный) (Хайнд, 1975). Выявление генетических детерминант агрессивного поведения весьма актуально, поскольку в человеческом обществе повышенная агрессивность – одна из основных проблем социальных отношений, здравоохранения и других сфер деятельности. Большинство исследователей генетики агрессивного поведения сходятся на том, что этот тип поведения имеет полигенную детерминацию (Craig, Halton, 2009). И кроме генов, непосредственно участвующих в поведенческих реакциях, есть генетические ансамбли, которые детерминируют агрессивность опосредованно, через различные метаболические каскады биохимических реакций в нейронах (Benus et al., 1991).

Многофакторная система формирования агрессивного поведения предполагает поиск и использование удобных и надежных генетических моделей, например модельных животных с повышенной и пониженной агрессивностью, у которых влияние внешних факторов сведено к минимуму. Логично предположить, что разница в уровне экспрессии генов у животных с повышенной агрессивностью по сравнению с неагрессивными (обе группы получены путем генетической селекции из одной и той же исходной популяции серых крыс-пасюков – *Rattus norvegicus*) позволит определить, какие гены участвуют в реализации агрессивных реакций. Такая модель была выведена в

Институте цитологии и генетики СО РАН путем селекции серых крыс-пасюков в двух противоположных направлениях – на повышение агрессивности и на толерантное поведение по отношению к человеку (Plyusnina, Oskina, 1997). Отбор проводился при одинаковых условиях содержания и единообразной методике оценки поведенческой реакции в отношении человека на протяжении более чем 80 поколений крыс. С помощью современных технологий высокопроизводительного секвенирования ДНК агрессивное поведение в этой модели изучается не только на фенотипическом уровне, который включает наблюдение и анализ конкретных поведенческих и нейроэндокринных реакций (Кожемякина и др., 2016), но и на геномном уровне, путем исследования конкретных генов, влияющих на повышенную или пониженную агрессивность особи. В сочетании с компьютерными технологиями реконструкции генных сетей, поиском информации в базах данных по экспрессии генов в отделах мозга результаты таких комплексных исследований становятся полноценными и достоверными для понимания феномена агрессивного поведения.

Нейрональный апоптоз выполняет важнейшую физиологическую роль в нервной системе при нейрогенезе. При этом происходит апоптотическая гибель большого количества избыточных нейронов и, таким образом, поддерживается баланс клеток в развивающейся нервной системе (Franklin, 2011). В работе (Ilchibaeva et al., 2016) показано, что у крыс с высокой степенью агрессии обнаруживается значительное увеличение экспрессии гена каспазы 3 в гипоталамусе, снижение уровня экспрессии проапоптотического гена *Bax* в гиппокампе и увеличение уровня мРНК антиапоптотического гена *Bcl-xl* в области ядер шва среднего мозга. Эти данные говорят в пользу того, что генетически обусловленная агрессия у крыс

связана со значительными изменениями регуляции нейронального апоптоза.

Целью работы был анализ ассоциативных сетей, описывающих молекулярно-генетические взаимодействия между белками и генами, вовлеченными в нейрональный апоптоз, дифференциально экспрессированными генами и генами, несущими полиморфизмы у серых крыс с агрессивным поведением. Выявление генов, вовлеченных в такие взаимодействия, может быть основой для разработки лекарственных препаратов, корректирующих агрессивное поведение.

## Материалы и методы

Для построения списка дифференциально экспрессирующихся (ДЭ) и полиморфных генов у серых крыс с агрессивным поведением были использованы данные РНК-секвенирования трех отделов мозга (гипоталамус, вентральная тегментальная область среднего мозга и периакведуктум). Библиотеки чтений транскриптов от анализируемых крыс получены в результате секвенирования на платформе Illumina согласно протоколу NEBNext mRNA Library Prep Reagent Set for Illumina (NEB, США) и доступны на сайте The European Nucleotide Archive (<http://www.ebi.ac.uk/ena>) под индексом ERP011250. Всего проанализировано 12 библиотек, из них по две были получены для каждого из трех рассматриваемых отделов мозга крыс с агрессивным поведением, по две – для каждого изучаемого отдела мозга крыс с дружелюбным поведением. Картирование чтений на референсный геном крысы *Rattus norvegicus* (Rnor\_6.0) осуществляли в программе STAR (Dobin et al., 2013), входные параметры использовали заданные по умолчанию. Референсный геном *Rattus norvegicus* был взят с сайта Ensembl (Yates et al., 2015). Дифференциально экспрессирующиеся гены между крысами с агрессивным и дружелюбным поведением выявляли при помощи пакета DESeq2 (Love et al., 2014), реализованного на языке программирования R, с учетом поправки на множественное сравнение ( $p\text{-value} < 0.05$ ). Анализ сверхпредставленности Gene Ontology (GO) биологических процессов проводили веб-сервисом DAVID 6.8 (Huang et al., 2009; <https://david.ncifcrf.gov>), все настройки были взяты по умолчанию.

Поиск полиморфизмов в генах у серых крыс с агрессивным поведением проводили в пакете Samtools (Li, 2011). В качестве референсного использовали геном крысы *Rattus norvegicus* версия Rnor\_6.0 из базы данных Ensembl (Yates et al., 2015). Программой VCFtools (Danecsek et al., 2011) были отобраны полиморфизмы, которые встречаются во всех шести образцах тканей мозга агрессивных крыс, но отсутствуют у дружелюбных особей. Среди выявленных полиморфизмов с помощью программы VEP (McLaren et al., 2016) были найдены миссенс-мутации.

Реконструкцию ассоциативных генных сетей, описывающих молекулярно-генетические взаимодействия между генами и белками, осуществляли с помощью системы ANDSystem (Demenkov et al., 2012; Ivanisenko et al., 2015). Система ANDSystem предназначена для автоматического анализа текстов научных публикаций с целью извлечения информации о взаимодействиях между молекулярно-генетическими объектами (гены, белки, метаболиты,

микро-РНК), а также их ассоциативных и регуляторных связях с заболеваниями, биологическими процессами и фенотипическими признаками различных организмов. Всего рассматривали 24 типа взаимодействий, включая физические взаимодействия (белок–белок, белок–ДНК, белок–лиганд), каталитические реакции, регуляторные связи (регуляция активности, экспрессии, транспорта, деградации), коэкспрессию, ассоциацию (интегральный тип связей, характеризующий наличие любого типа взаимодействий). Следует отметить, что тип связи «ассоциация» в ANDSystem используется для описания связей между парами объектов любого типа. Центральность вершин (betweenness centrality) в генной сети оценивалась с помощью функции `nx.betweenness_centrality` пакета Networkx, реализованного на языке программирования Python (Hagberg et al., 2008). Список генов, вовлеченных в нейрональный апоптоз (GO:0051402), был получен с помощью базы данных AmiGO 2 (Ashburner et al., 2000). Статистическую значимость сверхпредставленности набора генов в анализируемой выборке вычисляли с помощью программы GeneProf (<https://www.geneprof.org>), использующей гипергеометрическое распределение.

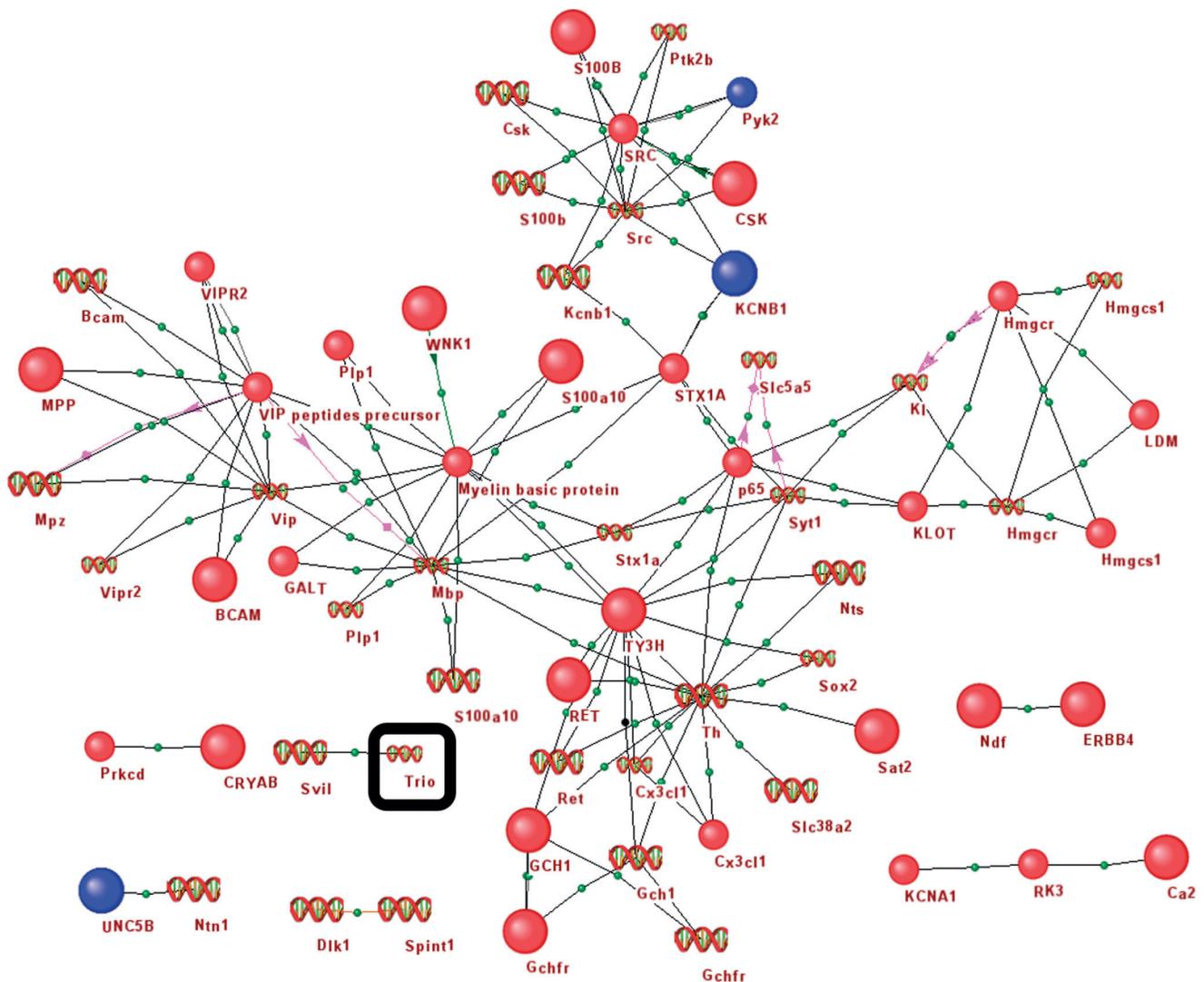
Поиск цепочек в глобальной ассоциативной генной сети ANDSystem по заданному шаблону проводился инструментом Pathway Wizard системы ANDSystem. Шаблон для поиска цепочек, связывающих полиморфные гены, ДЭ гены и нейрональный апоптоз, включал три вершины и задавался следующим образом: 1) первый участник цепочки – полиморфный ген; 2) второй участник – ДЭ ген; 3) третий участник – ген/белок, вовлеченный в нейрональный апоптоз; 4) тип связей между первым и вторым участником, а также между вторым и третьим участником цепочки может быть любой из числа представленных в системе ANDSystem.

## Результаты и обсуждение

### Анализ дифференциальной экспрессии и полиморфизмов генов серых крыс с агрессивным поведением

Было выявлено 819 генов, дифференциально экспрессирующихся у серых крыс с агрессивным поведением по сравнению с экспрессией генов у серых крыс с дружелюбным поведением. В том числе выявлено 45, 675 и 153 ДЭ гена в гипоталамусе, вентральной тегментальной области и периакведуктуме соответственно (Приложение 1)<sup>1</sup>. Экспрессия 8, 242 и 90 генов у крыс с агрессивным поведением была повышена в гипоталамусе, вентральной тегментальной области и периакведуктуме соответственно по сравнению с таковой у дружелюбных крыс, а экспрессия 37, 433 и 63 – понижена. Три гена (*Ifi27*, *Mcm7* и *AY172581.17*) были дифференциально экспрессированы в трех анализируемых отделах мозга у серых крыс с агрессивным поведением. Одновременно в вентральной тегментальной области и периакведуктуме были дифференциально экспрессированы 32 гена, в гипоталамусе и вентральной тегментальной области – 17 генов, а в гипоталамусе и периакведуктуме – 8 генов.

<sup>1</sup> Приложения 1–4 см. по адресу: <http://www.bionet.nsc.ru/vogis/download/pict-2017-21/appx14.pdf>



**Fig. 1.** Associative gene network of DE genes found to be directly interconnected according to ANDSystem.

Large icons denote DE genes/proteins with upregulated expression in laboratory rats with aggressive behavior; small icons, DE genes/proteins with downregulated expression. Genes/proteins involved in neuronal apoptosis are highlighted in blue. The polymorphic *Trio* gene is enclosed in a bar. Genes are shown as DNA helices and proteins, as balls. Gray links indicate associations and protein-protein interactions; green links, catalytic interactions; and pink links, expression regulation.

Для ряда ДЭ генов в литературе присутствует информация по их связи с агрессивным поведением. Например, для гена тирозингидроксилазы (*Th*), экспрессия которого повышена в вентральной тегментальной области крыс с агрессивным поведением, в работе (Bondar et al., 2009) показано, что у самцов мышей, проявляющих агрессивное поведение, уровень экспрессии этого гена повышается. Экспрессия гена *Kirrel3* повышена в периакведуктуме у серых крыс с агрессивным поведением. Делеция *Kirrel3* приводит к снижению межсамцовой агрессии у мышей (Prince et al., 2013). Экспрессия гена вазоактивного кишечного пептида (*Vip*) была понижена в вентральной тегментальной области у серых крыс с агрессивным поведением. У певчих птиц введение пептида VIP непосредственно в боковую перегородку влияет на агрессивное поведение (Maney et al., 2005). Экспрессия гена нейротензина (*Nts*) была повышена в вентральной тегментальной области у серых крыс с агрессивным поведением. В работе (Gammie

et al., 2009) показано, что у самок мышей, которые проявляли высокие уровни материнской агрессии, уровень *Nts* был снижен, а интрацеребровентрикулярное введение *Nts* значительно снижало материнскую агрессию. Экспрессия гена синтазы оксида азота 1 (*Nos1*) была повышена в периакведуктуме у серых крыс с агрессивным поведением. Имеются данные о том, что ингибирование гена нейрональной NO-синтазы (*nNOS*) приводит к повышению агрессивности самцов мышей (Hotchkiss et al., 2005), в то время как в исследовании (Demas et al., 1999) показано, что делеция гена эндотелиальной NO-синтазы (*eNOS*) у самцов мышей снижает агрессию.

Оказалось, что 819 дифференциально экспрессирующихся генов вовлечены в 14 сверхпредставленных Gene Ontology биологических процессов, в том числе в регуляцию трансмембранного транспорта ионов (GO:0034765), развитие нервной системы (GO:0007399), развитие мозга (GO:0007420), регуляцию секреции дофамина

(GO:0014059), положительную регуляцию развития проекции нейронов (GO:0010976) и др. (Приложение 2).

С помощью пакета Samtools (Li, 2011) выявлены 1136 полиморфизмов в 464 генах, которые были обнаружены во всех шести образцах тканей мозга агрессивных крыс. Анализ программой VEP (McLaren et al., 2016) показал, что среди этих 1136 полиморфизмов миссенс-мутациями являются 156 полиморфизмов в 141 гене. Аналогично для серых крыс с дружелюбным поведением выявлено 795 полиморфизмов в 338 генах, среди которых было 106 миссенс-мутаций в 97 генах (Приложение 3). Для дальнейшего анализа были отобраны 137 генов, несущих миссенс-мутации, которые встречаются во всех шести образцах тканей мозга агрессивных крыс, но отсутствуют у дружелюбных особей (полиморфные гены). Среди этих полиморфных генов двенадцать оказались ДЭ генами (*Frrs11*, *Gpr137b*, *Hmgcll1*, *Hps4*, *Mcm7*, *Nkd2*, *Npas2*, *Pdnp*, *Plod1*, *Sp110*, *Tnks1bp1*, *Trio*).

Для анализа взаимодействий ДЭ и полиморфных генов была построена ассоциативная генная сеть с помощью системы ANDSystem. Рассматривали только прямые связи между анализируемыми генами, без учета посредников. Ассоциативная генная сеть состояла из кластера 34 генов (рис. 1), имеющих связи хотя бы с одним из рассмотренных генов, и 910 ни с кем не связанных генов. В ассоциативной генной сети присутствовали 119 взаимодействий следующих типов: ассоциации, каталитические взаимодействия, регуляция экспрессии и белок-белковые взаимодействия (см. рис. 1). Оказалось, что с ДЭ генами имеет связи только один полиморфный ген (*Trio*), экспрессия которого была понижена у крыс с агрессивным поведением.

Анализ центральности вершин (betweenness centrality) показал, что наиболее центральными в генной сети, представленной на рис. 1, являются вершины *Stx1a*, *Mbp* и *Th*. Показатели их центральности составили 0.22, 0.18 и 0.17 соответственно. Синтаксин 1А (*Stx1a*), экспрессия которого была понижена в вентральной тегментальной области у крыс с агрессивным поведением, кодирует белок, участвующий в регуляции серотонинергических и ГАМК-ергических систем. Известно, что его экспрессия изменяется при аутизме, а ряд мутаций ассоциирован с синдромом Аспергера (Durdiaková et al., 2014). Обе эти патологии характеризуются эмоциональными нарушениями, трудностями в социальном взаимодействии и стереотипным, ограниченным, повторяющимся репертуаром интересов и действий. Экспрессия гена основного белка миелина (*Mbp*) была понижена в периакведуктуме у крыс с агрессивным поведением. По данным (Wang et al., 2004), значительное снижение уровня *Mbp* наблюдается у пациентов с болезнью Альцгеймера и нарушением когнитивных функций. Экспрессия гена тирозингидроксилазы (*Th*), связанного с агрессивным поведением у самцов мышей (Bondar et al., 2009), была повышена в вентральной тегментальной области серых крыс с агрессивным поведением. Участники генной сети, обладающие высоким показателем центральности, могут быть ключевыми регуляторами ДЭ генов и являются перспективными для дальнейшего изучения при поиске потенциальных мишеней для фармпрепаратов, направленных на снижение агрессивного поведения.

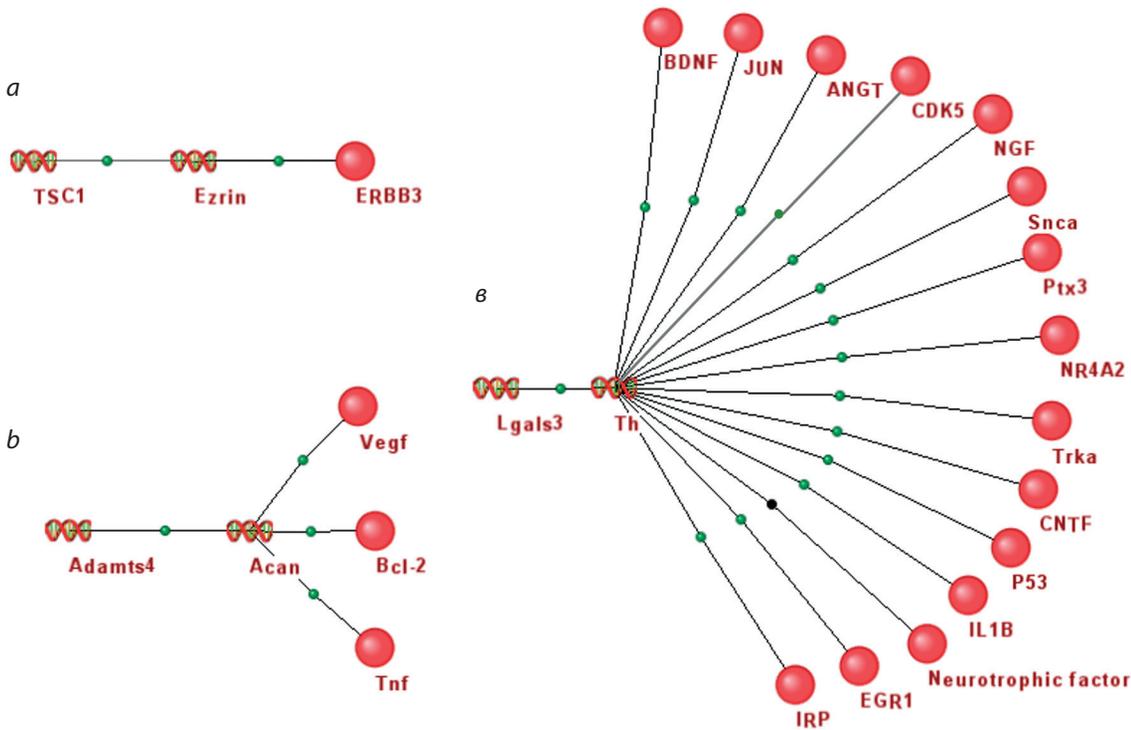
### Анализ генов нейронального апоптоза

Согласно базе данных AmiGO 2 в Gene Ontology (GO), в биологический процесс нейронального апоптоза (Neuron Apoptotic Process, GO:0051402) у крыс вовлечены 276 генов. Среди 819 ДЭ генов в нейрональном апоптозе участвуют 23 гена (*Adarb1*, *Cdk5r1*, *Cit*, *Coro1a*, *Crlf1*, *Dlx1*, *Egln3*, *Egr1*, *En1*, *Epha7*, *Gabra5*, *Gclc*, *Kcnb1*, *Mef2c*, *Ngfr*, *Nrbp2*, *Nsmf*, *Pcp4*, *Prkcg*, *Ptk2b*, *Syngap1*, *Unc5b*, *Vegfb*). Например, на рис. 1 видно, что экспрессия гена *Unc5b* повышена. Согласно (Tang et al., 2008), *Unc5b* обладает проапоптотическим действием, и в отсутствие сигнальной молекулы нетрин-1 способен активировать нейрональный апоптоз. Для гена *Egln3*, экспрессия которого повышена в вентральной тегментальной области у серых крыс с агрессивным поведением, показано, что увеличение его активности приводит к нейрональному апоптозу (Schlisio, 2009). Экспрессия гена *Egr1* была повышена в периакведуктуме у серых крыс с агрессивным поведением. Известно, что повышение уровня экспрессии гена *Egr1* способно активировать нейрональный апоптоз (Xie et al., 2011). Экспрессия гена *Mef2c* была снижена в вентральной тегментальной области и повышена в периакведуктуме у серых крыс с агрессивным поведением. В работе (Okamoto et al., 2002) показано, что активация *Mef2c* вызывает снижение нейронального апоптоза. В статье (Mao et al., 1999) говорится о том, что, хотя во время развития нервной системы активация гена *Mef2c* приводит к снижению апоптоза, в зрелых нейронах при стрессах активация этого гена способствует повышению уровня апоптоза.

Среди полиморфных генов три (*Lig4*, *Parp1*, *Pigt*) участвуют в нейрональном апоптозе. Известно, что дефицит *Lig4* приводит к повышению уровня нейронального апоптоза (Sekiguchi et al., 2001). Расщепление *Parp1* каспазой 9 вызывает апоптоз, в то время как гиперактивация этого гена приводит к некрозу (Sairanen et al., 2009).

Интересной задачей был поиск прямых межмолекулярных взаимодействий ДЭ и полиморфных генов с генами, вовлеченными в нейрональный апоптоз. С помощью системы ANDSystem было реконструировано 478 взаимодействий между ДЭ генами и генами/белками, участвующими в нейрональном апоптозе (Приложение 4). Рассматривались такие типы взаимодействий, как регуляция активности, каталитические взаимодействия, регуляция деградации, регуляция экспрессии, белок-белковые взаимодействия, регуляция транспорта и ассоциации. Наибольшее число взаимодействий наблюдалось для ассоциаций и белок-белковых взаимодействий: 401 и 34 связи соответственно. Так, нокаут гена *Sox2*, экспрессия которого была снижена в вентральной тегментальной области у крыс с агрессивным поведением, приводит к снижению уровня экспрессии гена *ErbB3* (Koike et al., 2015). В свою очередь, повышенный нейрональный апоптоз наблюдался у мышей с нокаутом гена *ErbB3* (Narkis et al., 2007). Следует отметить, что количество генов/белков нейронального апоптоза, участвующих во взаимодействиях с ДЭ генами, составило 55 из 276, что существенно превышало число, ожидаемое по случайным причинам ( $p\text{-value} < 10^{-8}$ ).

Для полиморфных генов с помощью ANDSystem было найдено 14 ассоциативных связей и 3 белок-белковых взаимодействия с генами/белками, вовлеченными в ней-



**Fig. 2.** Associative gene network describing the potential interactions of polymorphic genes, DE genes, and genes/proteins involved in neuronal apoptosis through molecular pathways reconstructed with the Pathway Wizard function of ANDSystem.

(a) The molecular pathway comprising the polymorphic *Tsc1* gene, the DE gene *Ezr*, and the *ErbB3* gene, involved in neuronal apoptosis. (b) The molecular pathway comprising the polymorphic gene *Adamts4*, the DE gene *Acan*, and three genes (*Vegf*, *Bcl-2*, *Tnf*) involved in neuronal apoptosis. (c) The molecular pathway comprising the polymorphic gene *Lgals3*, the DE gene *Th*, and 15 genes involved in neuronal apoptosis. Genes are shown as DNA helices, and proteins, as balls. Gray links indicate associative interactions.

рональный апоптоз (см. Приложение 4). Например, ингибирование полиморфного гена *Parp1* может приводить к снижению активации гена *GSK-3* (Songin et al., 2007). Интересно отметить, что ген *GSK-3* обладает как про-, так и антиапоптотическим действием, так как по-разному регулирует два основных пути апоптоза – внутренний и внешний. *GSK-3* активирует внутренний митохондриальный путь апоптоза, но ингибирует внешний путь апоптоза, опосредованный через рецепторы клеточной смерти (Beugle, Jore, 2006). Для полиморфных генов, так же как и в случае ДЭ генов, оказалось, что количество генов/белков нейронального апоптоза, участвующих во взаимодействиях с ними, превышало число, ожидаемое по случайным причинам, и составило 8 из 276. Согласно гипергеометрическому распределению, перепредставленность участников взаимодействий с полиморфными генами среди генов/белков нейронального апоптоза имела статистическую значимость ( $p\text{-value} < 0.01$ ).

Участники генных сетей могут оказывать влияние на функцию других участников посредством прямых взаимодействий, а также путем передачи сигнала по цепочкам вершин сети, имеющих между собой соответствующие связи. В настоящей работе проведен поиск всех возможных цепочек из трех вершин, описывающих связи между полиморфными генами и генами/белками нейронального апоптоза, опосредованные через ДЭ гены, инструментом Pathway Wizard, который реализован в

системе ANDSystem. Таким образом были выявлены три цепочки, связывающие, согласно заданным требованиям, три полиморфных гена (*Adamts4*, *Lgals3*, *Tsc1*), три ДЭ гена (*Acan*, *Ezr*, *Th*) и 19 генов/белков, вовлеченных в нейрональный апоптоз (рис. 2).

На рис. 2, а представлена цепочка, включающая полиморфный ген *Tsc1*, ДЭ ген *Ezr* и ген *ErbB3*, вовлеченный в нейрональный апоптоз. Продукт гена *Tsc1* – гамартин, взаимодействует с белком – продуктом гена *Ezr*, экспрессия которого снижена в вентральной тегментальной области у крыс с агрессивным поведением (Narayanan, 2003). Эти белки участвуют в организации плазматической мембраны и актинового цитоскелета, а также адгезии и миграции клеток. Экспрессия гена *Ezr* регулируется белком ErbB3. У мышей с нокаутом гена *ErbB3* наблюдался повышенный нейрональный апоптоз (Narkis et al., 2007). Кроме того, было показано снижение уровня экспрессии гена *ErbB3* при нокауте гена *Sox2*, экспрессия которого была снижена в вентральной тегментальной области у крыс с агрессивным поведением (Koike et al., 2015).

Цепочка, включающая полиморфный ген *Adamts4*, ДЭ ген *Acan* и три гена (*Vegf*, *Bcl-2*, *Tnf*), вовлеченных в нейрональный апоптоз, представлена на рис. 2, б. Фермент агреканазы *Adamts4* расщепляет агрекан, продукт гена *Acan*, экспрессия которого была повышена в вентральной тегментальной области у крыс с агрессивным поведением (Kim et al., 2009). Известно, что *Vegf*, *Tnf* и антисенс

Bcl-2 способны снижать уровень экспрессии гена *Acan* (Klooster, Bernier, 2004), а повышение уровня экспрессии гена *Bcl-2* приводит к увеличению экспрессии гена *Acan* (Feng et al., 1999). Белки *Vegf* и *Bcl-2* способны снижать уровень нейронального апоптоза (Rong et al., 2012), а *Tnf* – активировать нейрональный апоптоз (Ryan et al., 2004).

Третья цепочка (см. рис. 2, в) включает полиморфный ген *Lgals3*, ДЭ ген *Th* и 15 генов, вовлеченных в нейрональный апоптоз (*Bdnf*, *Jun*, *Angt*, *Cdk5*, *Ngf*, *Snca*, *Ptx3*, *Nr4A2*, *Trka*, *Cntf*, *P53*, *IL1B*, *Gdnf*, *Egr1*, *Irp*). Ген *Lgals3* кодирует β-галактозид-связывающий белок галектин-3, который имеет коллагеноподобный домен, обеспечивающий взаимодействие данного белка с внеклеточным матриксом. Галектин-3 участвует во многих биологических процессах, включая врожденный иммунитет, клеточную адгезию, регуляцию функции Т-клеток и микроглии (Chip et al., 2017). Показано, что галектин-3 регулирует белок CREB, который является фактором транскрипции гена *Th*, и повышенная экспрессия гена *Lgals3* приводит к увеличению экспрессии гена *Th* (Wu et al., 2010). Известно, что *Jun*, *Angt*, *Cdk5*, *Ngf*, *Ptx3*, *Nr4A2*, *Trka*, *Cntf*, *P53*, *IL1B*, *Egr1* могут положительно регулировать экспрессию гена *Th* или активность его продукта (Kansu et al., 2004; Dorofeeva et al., 2013). *Gdnf* приводит к снижению уровня экспрессии гена *Th* (Georgievska et al., 2004). В работе (Fukuchi et al., 2010) показано, что *Bdnf* может активировать экспрессию гена *Th*, тогда как в статье (Berhow et al., 1995) говорится о том, что *Bdnf* снижает уровень *Th* в вентральной тегментальной области. Гены *Snca*, *Irp* могут коэкспрессироваться с *Th* (Wang et al., 2013).

## Заключение

Анализ геномных и транскриптомных данных по лабораторным крысам с агрессивным и дружелюбным поведением с использованием реконструкции ассоциативных генных сетей позволил выявить набор генов, потенциально участвующих в регуляции нейронального апоптоза, посредством молекулярно-генетических взаимодействий с генами/белками, напрямую вовлеченными в нейрональный апоптоз. Число таких генов значительно превышало ожидаемое по случайным причинам ( $p$ -value < 0.01). Анализ молекулярно-генетических путей в ассоциативной генной сети, описывающих связи полиморфных и ДЭ генов с генами нейронального апоптоза, показал, что гены, представленные в данных путях, могут играть существенную роль в функционировании ассоциативной генной сети. В частности, участник одного из этих путей – ген *Th*, который, согласно литературным данным (Bondar et al., 2009), ассоциирован с агрессивным поведением, обладает высокой центральностью (betweenness centrality).

Таким образом, полученные результаты могут служить дополнительным свидетельством того, что процесс нейронального апоптоза играет важную роль в агрессивном поведении у животных.

## Acknowledgments

The reconstruction and analysis of associative networks of neuronal apoptosis were supported by the Russian Science Foundation, project 14-44-00011 “Programmed cell death induced via death receptors: identification of apoptosis-

triggering molecular mechanisms by molecular simulation. The search for gene polymorphisms and differentially expressed genes in rats with aggressive behavior was supported by the Government of the Russian Federation, project 14.B25.31.0033 (decree 220 of April 9, 2010). Works at the SPF Vivarium Shared Access Center were supported by project RFMEFI62117X0015. The development of scripts and algorithms for the calculation of graph node centralities was supported by State Budgeted Project 0324-2016-0008.

## Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

## References

- Ashburner M., Ball C.A., Blake J.A., Botstein D., Butler H., Cherry J.M., Davis A.P., Dolinski K., Dwight S.S., Eppig J.T., Harris M.A., Hill D.P., Issel-Tarver L., Kasarskis A., Lewis S., Matese J.C., Richardson J.E., Ringwald M., Rubin G.M., Sherlock G. Gene Ontology: tool for the unification of biology. *Nature Genetics*. 2000;25(1):25-29. DOI 10.1038/75556.
- Benus R.F., Bohus B., Koolhaas J.M., van Oortmerssen G.A. Behavioural differences between artificially selected aggressive and non-aggressive mice: response to apomorphine. *Behav. Brain Res.* 1991; 43(2):203-208. DOI 10.1016/S0166-4328(05)80072-5.
- Berhow M.T., Russell D.S., Terwilliger R.Z., Beitner-Johnson D., Self D.W., Lindsay R.M., Nestler E.J. Influence of neurotrophic factors on morphine- and cocaine-induced biochemical changes in the mesolimbic dopamine system. *Neuroscience*. 1995; 68(4):969-979.
- Beurel E., Jope R.S. The paradoxical pro- and anti-apoptotic actions of GSK3 in the intrinsic and extrinsic apoptosis signaling pathways. *Prog. Neurobiol.* 2006;79(4):173-189. DOI 10.1016/j.pneurobio.2006.07.006.
- Bondar N.P., Ul'yana A.B., Kovalenko I.L., Filipenko M.L., Kudryavtseva N.N. Molecular implications of repeated aggression: *Th*, *Dat1*, *Snca* and *Bdnf* gene expression in the VTA of victorious male mice. *PLoS ONE*. 2009; 4(1):e4190. DOI 10.1371/journal.pone.0004190.
- Chip S., Fernandez-Lopez D., Li F., Faustino J., Derugin N., Vexler Z.S. Genetic deletion of galectin-3 enhances neuroinflammation, affects microglial activation and contributes to sub-chronic injury in experimental neonatal focal stroke. *Brain Behav. Immun.* 2017;60:270-281. DOI 10.1016/j.bbi.2016.11.005.
- Craig I.W., Halton K.E. Genetics of human aggressive behaviour. *Human Genetics*. 2009;126(1):101-113. DOI 10.1007/s00439-009-0695-9.
- Danecek P., Auton A., Abecasis G., Albers C.A., Banks E., DePristo M.A., Handsaker R.E., Lunter G., Marth G.T., Sherry S.T., McVean G. The variant call format and VCFtools. *Bioinformatics*. 2011;27(15):2156-2158. DOI 10.1093/bioinformatics/btr330.
- Demas G.E., Kriegsfeld L.J., Blackshaw S., Huang P., Gammie S.C., Nelson R.J., Snyder S.H. Elimination of aggressive behavior in male mice lacking endothelial nitric oxide synthase. *J. Neurosci.* 1999; 19:RC30. DOI 0270-6474/99/190001.
- Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Kolchanov N.A., Ivanisenko V.A. ANDVisio: a new tool for graphic visualization and analysis of literature mined associative gene networks in the ANDSystem. *In Silico Biology*. 2012;11(3,4):149-161. DOI 10.3233/ISB-2012-0449.
- Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*. 2013;29(1):15-21. DOI 10.1093/bioinformatics/bts635.
- Dorofeeva N.A., Nikitina L.S., Glazova M.V., Kirillova O.D., Chernigovskaia E.V. Inactivation of p53 leads to enhancement of tyrosine hydroxylase biosynthesis in the dopaminergic brain neurons. *Zhurnal Evoliutsionnoi Biokhimii i Fiziologii*. 2013;49(2):137-143.
- Durdiaková J., Warrior V., Banerjee-Basu S., Baron-Cohen S., Chakrabarti B. *STX1A* and Asperger syndrome: a replication study. *Mol.*

- Autism. 2014;5:14. DOI 10.1186/2040-2392-5-14.
- Feng L., Balakir R., Precht P., Horton W.E. Bcl-2 regulates chondrocyte morphology and aggrecan gene expression independent of caspase activation and full apoptosis. *J. Cell. Biochem.* 1999;74(4):576-586. DOI 10.1002/(SICI)1097-4644(19990915)74:4<576::AID-JCB7>3.0.CO;2-N.
- Franklin J.L. Redox regulation of the intrinsic pathway in neuronal apoptosis. *Antioxid. Redox Signal.* 2011;14(8):1437-1448. DOI 10.1089/ars.2010.3596.
- Fukuchi M., Fujii H., Takachi H., Ichinose H., Kuwana Y., Tabuchi A., Tsuda M. Activation of tyrosine hydroxylase (TH) gene transcription induced by brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and its selective inhibition through Ca<sup>2+</sup> signals evoked via the N-methyl-d-aspartate (NMDA) receptor. *Brain Res.* 2010; 1366:18-26. DOI 10.1016/j.brainres.2010.10.034.
- Gammie S.C., D'Anna K.L., Gerstein H., Stevenson S.A. Neurotensin inversely modulates maternal aggression. *Neuroscience.* 2009; 158(4):1215-1223. DOI 10.1016/j.neuroscience.2008.11.045.
- Georgievska B., Carlsson T., Lacar B., Winkler C., Kirik D. Dissociation between short-term increased graft survival and long-term functional improvements in Parkinsonian rats overexpressing glial cell line-derived neurotrophic factor. *Eur. J. Neurosci.* 2004;20(11):3121-3130. DOI 10.1111/j.1460-9568.2004.03770.x.
- Hagberg A., Swart P., Chult D.S. Exploring network structure, dynamics, and function using NetworkX: Proc. of the 7th Python in Sci. Conf. (SciPy 2008). USA: Los Alamos National Laboratory (LANL), 2008;11-15.
- Hinde R. *Animal Behaviour: A Synthesis of Ethology and Comparative Psychology.* 2nd ed. N. Y., St. Louis, San Francisco, Dusseldorf, London, Mexico, Panama, Sydney, Toronto: McGraw-Hill, 1970. [Russ. ed.: Khaynd R. Povedenie zhivotnykh. Sintez etologii i sravnitelnoy psikhologii. Moscow: Mir Publ., 1975. (in Russian)]
- Hotchkiss A.K., Pyter L.M., Gation M.L., Wen J.C., Milman H.A., Nelson R.J. Aggressive behavior increases after termination of chronic sildenafil treatment in mice. *Physiol. Behav.* 2005;83(5):683-688. DOI 10.1016/j.physbeh.2004.09.005.
- Huang D.W., Sherman B.T., Lempicki R.A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* 2009;4(1):44-57. DOI 10.1038/nprot.2008.211.
- Ilchibaeva T.V., Tsybko A.S., Kozhemyakina R.V., Naumenko V.S. Expression of apoptosis genes in the brain of rats with genetically defined fear-induced aggression. *Mol. Biol.* 2016;50(5):719-724. DOI 10.1134/S0026893316030079.
- Ivanisenko V.A., Saik O.V., Ivanisenko N.V., Tiys E.S., Ivanisenko T.V., Demenkov P.S., Kolchanov N.A. ANDSytem: an Associative Network Discovery System for automated literature mining in the field of biology. *BMC Syst. Biol.* 2015;9(Suppl.2):S2. DOI 10.1186/1752-0509-9-S2-S2.
- Kansy J.W., Daubner S.C., Nishi A., Sotogaku N., Lloyd M.D., Nguyen C., Lu L., Haycock J.W., Hope B.T., Fitzpatrick P.F., Bibb J.A. Identification of tyrosine hydroxylase as a physiological substrate for Cdk5. *J. Neurochem.* 2004;91(2):374-384. DOI 10.1111/j.1471-4159.2004.02723.x.
- Kim M.S., Kim J.H., Lee M.R., Kang J.H., Kim H.J., Ko H.M., Choi C.H., Jung J.Y., Koh J.T., Kim B.K., Oh H.K. Effects of alendronate on a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs expression in the developing epiphyseal cartilage in rats. *Anat. Histol. Embryol.* 2009;38(2):154-160. DOI 10.1111/j.1439-0264.2008.00920.x.
- Klooster A.R., Bernier S.M. Tumor necrosis factor alpha and epidermal growth factor act additively to inhibit matrix gene expression by chondrocyte. *Arthritis. Res. Ther.* 2004;7(1):R127. DOI 10.1186/ar1464.
- Koike T., Wakabayashi T., Mori T., Hirahara Y., Yamada H. Sox2 promotes survival of satellite glial cells *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015;464(1):269-274. DOI 10.1016/j.bbrc.2015.06.141.
- Kozhemyakina R.V., Konoshenko M.Yu., Sakharov D.G., Smaigin D.A., Markel A.L. Comparative analysis of the behavior of wild Norway rats (*Rattus norvegicus*) and Norway rats selected for tolerant and aggressive behavior in the open field test. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatelnosti im. I.P. Pavlova = I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 2016;66(1):92-102. DOI 10.7868/S0044467716010093. (in Russian)
- Li H. A statistical framework for SNP calling, mutation discovery, association mapping and population genetical parameter estimation from sequencing data. *Bioinformatics.* 2011;27(21):2987-2993. DOI 10.1093/bioinformatics/btr509.
- Lorenz K. *On Aggression.* Psychology Press, 2002.
- Love M.I., Huber W., Anders S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* 2014; 15(12):550. DOI 10.1186/s13059-014-0550-8.
- Maney D.L., Erwin K.L., Goode C.T. Neuroendocrine correlates of behavioral polymorphism in white-throated sparrows. *Horm. Behav.* 2005;48(2):196-206. DOI 10.1016/j.yhbeh.2005.03.004.
- Mao Z., Bonni A., Xia F., Nadal-Vicens M., Greenberg M.E. Neuronal activity-dependent cell survival mediated by transcription factor MEF2. *Science.* 1999;286(5440):785-790. DOI 10.1126/science.286.5440.785.
- McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Riat H.S., Ritchie G.R., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. The ensembl variant effect predictor. *Genome Biol.* 2016;17(1):122. DOI 10.1186/s13059-016-0974-4.
- Narayanan V. Tuberous sclerosis complex: genetics to pathogenesis. *Pediatr. Neurol.* 2003;29(5):404-409. DOI 10.1016/j.pediatrneurol.2003.09.002.
- Narkis G., Ofir R., Manor E., Landau D., Elbedour K., Birk O.S. Lethal congenital contractural syndrome type 2 (LCCS2) is caused by a mutation in *ERBB3* (*Her3*), a modulator of the phosphatidylinositol-3-kinase/Akt pathway. *Am. J. Hum. Genet.* 2007;81(3):589-595. DOI 10.1086/520770.
- Okamoto S.I., Li Z., Ju C., Schölzke M.N., Mathews E., Cui J., Salvesen G.S., Bossy-Wetzel E., Lipton S.A. Dominant-interfering forms of MEF2 generated by caspase cleavage contribute to NMDA-induced neuronal apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002;99(6):3974-3979. DOI 10.1073/pnas.022036399.
- Plyusnina I., Oskina I. Behavioral and adrenocortical responses to open-field test in rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Physiol. Behav.* 1997;61(3):381-385. DOI 10.1016/S0031-9384(96)00445-3.
- Prince J.E., Brignall A.C., Cutforth T., Shen K., Cloutier J.F. Kirrel3 is required for the coalescence of vomeronasal sensory neuron axons into glomeruli and for male-male aggression. *Development.* 2013; 140(11):2398-2408. DOI 10.1242/dev.087262.
- Rong W., Wang J., Liu X., Jiang L., Wei F., Hu X., Han X., Liu Z. Naringin treatment improves functional recovery by increasing BDNF and VEGF expression, inhibiting neuronal apoptosis after spinal cord injury. *Neurochem. Res.* 2012;37(8):1615-1623. DOI 10.1007/s11064-012-0756-7.
- Ryan L.A., Peng H., Erichsen D.A., Huang Y., Persidsky Y., Zhou Y., Gendelman H.E., Zheng J. TNF-related apoptosis-inducing ligand mediates human neuronal apoptosis: links to HIV-1-associated dementia. *J. Neuroimmunol.* 2004;148(1):127-139. DOI 10.1016/j.jneuroim.2003.11.019.
- Sairanen T., Szepesi R., Karjalainen-Lindsberg M.L., Saksi J., Paetau A., Lindsberg P.J. Neuronal caspase-3 and PARP-1 correlate differentially with apoptosis and necrosis in ischemic human stroke. *Acta Neuropathol.* 2009;118(4):541-552. DOI 10.1007/s00401-009-0559-3.
- Schlisio S. Neuronal apoptosis by prolyl hydroxylation: implication in nervous system tumours and the Warburg conundrum. *J. Cell. Mol. Med.* 2009;13(10):4104-4112. DOI 10.1111/j.1582-4934.2009.00881.x.
- Sekiguchi J., Ferguson D.O., Chen H.T., Yang E.M., Earle J., Frank K., Whitlow S., Gu Y., Xu Y., Nussenzweig A., Alt F.W. Genetic interactions between ATM and the nonhomologous end-joining factors in genomic stability and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98(6):3243-3248. DOI 10.1073/pnas.051632098.

- Songin M., Jęško H., Czapski G., Adamczyk A., Strosznajder R.P. GSK-3 $\beta$  and oxidative stress in aged brain. Role of poly (ADP). *Folia Neuropathol.* 2007;45(4):220-229.
- Tang X., Jang S.W., Okada M., Chan C.B., Feng Y., Liu Y., Luo S.W., Hong Y., Rama N., Xiong W.C., Mehlen P. Netrin-1 mediates neuronal survival through PIKE-L interaction with the dependence receptor UNC5B. *Nat. Cell Biol.* 2008;10(6):698. DOI 10.1038/ncb1732.
- Wang D.S., Bennett D.A., Mufson E.J., Mattila P., Cochran E., Dickson D.W. Contribution of changes in ubiquitin and myelin basic protein to age-related cognitive decline. *Neurosci. Res.* 2004;48(1):93-100. DOI 10.1016/j.neures.2003.10.002.
- Wang Y.C., He F., Ma J., Zhou D., Liang Y., Gong Y.X. Impacts of electroacupuncture on ubiquitin-proteasome system in rats with Parkinson's disease. *Zhongguo Zhen Jiu = Chinese Acupuncture & Moxibustion.* 2013;33(8):725-729.
- Wu L., Zhao Q., Zhu X., Peng M., Jia C., Wu W., Zheng J., Wu X.Z. A novel function of microRNA let-7d in regulation of galectin-3 expression in attention deficit hyperactivity disorder rat brain. *Brain Pathol.* 2010;20(6):1042-1054. DOI 10.1111/j.1750-3639.2010.00410.x.
- Xie B., Wang C., Zheng Z., Song B., Ma C., Thiel G., Li M. Egr-1 transactivates *Bim* gene expression to promote neuronal apoptosis. *J. Neurosci.* 2011;31(13):5032-5044. DOI 10.1523/JNEUROSCI.5504-10.2011.
- Yates A., Akanni W., Amode M.R., Barrell D., Billis K., Carvalho-Silva D., Cummins C., Clapham P., Fitzgerald S., Gil L., Girón C.G., Gordon L., Hourlier T., Hunt S.E., Janacek S.H., Johnson N., Juettemann T., Keenan S., Lavidas I., Martin F.J., Maurel T., McLaren W., Murphy D.N., Nag R., Nuhn M., Parker A., Patricio M., Pignatelli M., Rahtz M., Riat H.S., Sheppard D., Taylor K., Thormann A., Vullo A., Wilder S.P., Zadissa A., Birney E., Harrow J., Muffato M., Perry E., Ruffier M., Spudich G., Trevanion S.J., Cunningham F., Aken B.L., Zerbino D.R., Flicek P. Ensembl 2016. *Nucleic Acids Res.* 2015;44(D1):D710-D716. DOI 10.1093/nar/gkv1157.