

УДК 575.17

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ  
И ПОЛИМОРФИЗМ AG, GA ПОВТОРОВ (ISSR-PCR)  
В ГЕНОМЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

А.В. ФЕОФИЛОВ, В.И. ГЛАЗКО

(Центр нанобиотехнологий РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева)

Выполнен сравнительный анализ полиморфизма ДНК-фрагментов у ряда пород крупного рогатого скота и яков, выявляемых в полимеразной цепной реакции, при использовании в качестве праймеров микросателлитных повторов. Получены данные о выраженных отличиях в полиморфизме спектров продуктов амплификации в зависимости от праймера. Поиск в секвенированных последовательностях генома крупного рогатого скота позволяет предполагать, что относительно повышенный полиморфизм фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами AG, обусловлен представленностью этих последовательностей в генах II класса главного комплекса гистосовместимости в отличие от повторов GA, локализованных в сайтах связывания белков-регуляторов упаковки хроматина.

**Ключевые слова:** микросателлитные локусы, инвертированные повторы, полилокусные спектры.

В последнее время микросателлитные последовательности ДНК широко используются для генотипирования особей, исследования генофондов растений и животных, описания их изменений под влиянием факторов естественного и искусственного отбора, установления происхождения, поисков связей с фенотипическими признаками, картирования главных генов количественных признаков. Предполагается, что уровень полиморфизма микросателлитных локусов хотя и выше, чем кодирующих аминокислотные последовательности структурных генов, но все же приблизительно одинакова, независимо от нуклеотидной последовательности микросателлита. Успешность решения задач общей и частной популяцион-

ной генетики сельскохозяйственных видов зависит от изученности размаха и особенностей полиморфизма молекулярно-генетических маркеров отдельных генетических элементов геномов. В то же время накапливаются данные, свидетельствующие о неслучайном распределении микросателлитных локусов по геномам, однако функциональное значение, генетические и эволюционные механизмы формирования их полиморфизма до сих пор остаются невыясненными [3].

Одним из вариантов применения микросателлитных последовательностей в генетических исследованиях является их использование в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции (ПЦР), этот тип молекулярно-генетических маркеров получил на-

звание ISSR-PCR (Inter-Simple Sequence Repeat — Polymerase Chain Reaction). К достоинствам этого типа маркеров относится возможность оценивать полиморфизм одновременно по ряду локусов, составляющих спектр продуктов амплификации, полученных на геномной ДНК одной особи с использованием одного праймера. В наших исследованиях ранее было показано, что спектр продуктов амплификации (ампликонов) может существенно различаться в зависимости как от коровою мотива микросателлита, фланкирующего амплифицируемый участок ДНК, так и от якорного нуклеотида, определяющего места отжига праймеров [1]. Для выяснения причин наблюдаемых отличий нами были сопоставлены фактические результаты амплификации ДНК крупного рогатого скота, полученные с использованием в качестве праймеров в ПЦР микросателлитных локусов с близкими по нуклеотидным последовательностям коровыми мотивами, с результатами наших исследований их локализации в секвенированных последовательностях крупного рогатого скота, представленных в ГенБанке.

В анализ были включены 11 образцов крови животных якутской породы крупного рогатого скота, 23 образца крови животных красной эстонской породы крупного рогатого скота и 10 образцов крови животных черно-пестрой голштинизированной породы, содержащихся в виварии РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева, а также образцы крови 19 яков. Для оценки полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитных локусов, в качестве праймеров использовали фрагменты микросателлитных локусов —  $(GAG)_6C$ ,  $(GA)_9C$ . Геномную ДНК выделяли из лимфоцитов периферической крови животных по стандартной методике [4]. Продукты амплификации получали по методи-

ке, разработанной Зиеткевичем и др. [4]. Разделяли ампликоны по молекулярной массе в 1,5%-м агарозном геле методом горизонтального электрофореза, используя для окраски фрагментов ДНК раствор бромистого этидия. Визуализацию фрагментов ДНК проводили в УФ свете. Размеры фрагментов ДНК определяли при помощи маркера молекулярных масс 100 bp+1.5 Kb+3 Kb (12 фрагментов от 100 до 3000 bp) M27 (СибЭнзим, Россия).

Якутский скот сохранился и содержится в чистоте в Верхоянском районе республики Саха (Якутия). Он отличается высокой жирномолочностью, устойчивостью к экстремальным природным факторам и различным болезням, неприхотлив к кормам. Характеризуется небольшим ростом, бочкообразной формой туловища, короткими крепкими ногами, оброслостью туловища и вымени. Масть разнообразная. Среднегодовой удой коров составляет 1200-1600 кг при высокой жирности молока — 4,75%. Отдельные особи могут раздаиваться до 3000 кг молока за лактацию. Обладает уникальным долголетием. Черно-пестрые голштинизированные животные относятся к молочному направлению продуктивности.

При использовании в ISSR-PCR в качестве праймера последовательности  $(GAG)_6C$  в спектрах продуктов амплификации стабильно наблюдалось 8 продуктов амплификации (ампликонов) длинами около 820, 750, 650, 540, 480, 400, 320 и 280 пар нуклеотидов (п.н.). Фрагменты длинами около 820, 540 и 320 п.н. наблюдались у всех исследованных особей. Полиморфными оказались следующие фрагменты: длиной 750 п.н. — выявлен у всех якутских животных и у 9 из 23 коров из Псковской обл.; фрагмент 650 п.н.: присутствовал у 5 из 10 представителей черно-пестрого скота вивария, у 12 из 19 яков и у 22 из 23 коров из Псковской обл.

и у 14 яков. Фрагмент длиной 280 п.н. был обнаружен только у якутских коров.

По праймеру (GA)<sub>9</sub>C нами были выявлены 3 ампликона длинами около 590, 510 и 260 п.н., причем полиморфизм в спектрах отсутствовал. С учетом полученных нами ранее данных об отсутствии полиморфизма по данному праймеру, а также о повышенном полиморфизме спектров ампликонов, полученных с помощью праймеров (AG)<sub>9</sub>C и (GAG)<sub>6</sub>C, принадлежащих к пурин-пиримидиновым трекам, нами была предпринята попытка выяснить возможные причины наблюдаемых отличий. Мы использовали алгоритмы семейства BLASTn для поиска гомологии в уже известных секвенированных последовательностях генома крупного рогатого скота, опубликованные в международном банке данных GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>). содержащем более 100 млн записей (более 100 млн нуклеотидных пар).

Для (AG)<sub>g</sub> выявлено 19 участков гомологии, в основном в комплексе генов II класса комплекса гистосовместимости, для (CT)<sub>9</sub> — 3, для пары (GA)<sub>9</sub> — (TC)<sub>9</sub> участков гомологии не выявлено. Так, большинство совпадений для последовательности (AG)<sub>g</sub>C обнаружены в разных, частично перекрывающихся, последовательностях одной цепи генов DRB главного комплекса гистосовместимости, в районе домена связывания антигена бета-цепи. Локализация повтора (AG)<sub>9</sub>C обнаруживается в последовательностях интронов генов DRB.

По праймеру (GA)<sub>9</sub>C 10 полных совпадений обнаруживаются в комплексе генов гистосовместимости, в группе генов DRB, причем в области экзона 2 гена DRB. По-видимому, именно экзонная локализация этого повтора может объяснять его консерватизм, несмотря на принадлежность к генам иммунной системы.

Видимо, относительно повышенный уровень полиморфизма участков ДНК, фланкированных инвертированными повторами (AG)<sub>9</sub>C по сравнению с (GA)<sub>9</sub>C, выявленный у исследованных животных, обусловлен локализацией повтора AG в наиболее полиморфной системе генов млекопитающих, связанных с функцией иммунной системы — в генах главного комплекса гистосовместимости, интерлейкинов.

Главный комплекс гистосовместимости (MHC) — это группа генов, продукты которых играют важнейшую роль в иммунном ответе. Функция генов MHC класса II — обеспечение гуморального иммунного ответа путем коммитирования Т-лимфоцитов презентацией чужеродного антигена в комплексе с продуктом одного из этих генов на плазматической мембране макрофага.

Молекулы продуктов генов MHC класса II построены из тяжелой альфа- и легкой бета-цепей. Ряд фактов указывает на близкое сходство альфа- и бета-цепей по общему строению. Внеклеточная часть каждой из цепей свернута в два домена и соединена коротким пептидом с трансмембранным сегментом. Трансмембранный сегмент переходит в цитоплазматический домен, содержащий примерно 10~15 остатков аминокислот. Аллельные варианты этих белков могут отличаться друг от друга по 20 аминокислотным остаткам. Большинство из аминокислотных замен локализовано в N-концевой части молекул и главным образом в доменах, формирующих антигенсвязывающий участок. Именно в этой изменчивости аминокислотной последовательности антигенсвязывающего участка заключена потенциальная возможность взаимодействия с широким спектром антигенов. В наших исследованиях обнаружено, что микросателлитные повторы AG располагаются между областями, ко-

дирующими первый и второй домены белков. По-видимому, именно локализация микросателлитных повторов AG в генах иммунной системы, полиморфизм которых направленно поддерживается естественным отбором, и может объяснять относительно повышенный полиморфизм ISSR-PCR-маркеров, полученных при использовании в качестве праймера этого микросателлита.

В последнее время наблюдается рост числа исследований белковых участников трехмерной организации генетической информации, например, GAF и CTCF. Фактор GAF (GAGA protein) является представителем семейства хроматинассоциированных белков. Было установлено, что он играет существенную роль в упаковке хроматина высокого порядка [2]. Последовательность аминокислот данного белка подразделяются на три области — ВТВ/POZ, ответственную за белок-белковые взаимодействия, область ДНК связывания и Q-конец, для которого были обнаружены 3 разных функции: деформация промотора, связывание одноцепочечной ДНК и мультимеризация. Оказывается, что для зоны ДНК-связывания консенсусной является именно последовательность GAGAG.

Кроме того, GA повторы являются мишенью связывания белка CTCF (CCCTC связывающего фактора). CCCTC связывающий фактор — многофункциональный белок цинковых пальцев с разнообразными регуляторными функциями. Новые данные указывают на участие CTCF в внутри-, и в межхромосомных дальних взаимодействиях, что делает CTCF важным фактором в определении трехмерной организации генома [2]. Так, обнаружена новая модель регуляции генов класса II главного комплекса гистосовместимости, в которой участвуют CTCF-зависимые дальние внутрихромосомные взаимодействия. Найдены доказательства наличия дальних хро-

матиновых петель между промоторами генов HLA-DRB1 и HLA-DQA1 и межгенным энхансером XL9. Эти взаимодействия зависели от комплекса, состоящего из CTCF, фактора транскрипции RFX и трансактиватора СИТА. Нокаутирование CTCF путем использования РНК-интерференции ослабляло дальние взаимодействия между энхансером XL9 и генами класса II МНС и снижало экспрессию HLA-DRB1 и HLA-DQA1. Эти факты позволяют предложить новую модель экспрессии генов класса II МНС, а также позволяют выяснить некоторые особенности функции CTCF, его участия в таких дальних взаимодействиях.

Таким образом, наблюдаемые отличия в полиморфизме и выявленный нами повышенный консерватизм профилей ДНК-фрагментов, фланкированных инвертированным повтором динуклеотидного микросателлита GA, могут быть обусловлены тем, что GA микросателлиты являются мишенью связывания белков, участвующих в регуляции программ генной транскрипции, в частности, путем влияния на изменения упаковки (фолдинга) хроматина. Существуют также данные об участии подобных последовательностей в формировании нуклеосомного уровня упаковки ДНК [2].

Полученные данные свидетельствуют о том, что распределение и полиморфизм полилокусных фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов с разными коровыми мотивами, отражают их участие в формировании различных структурно-функциональных элементов генома. Такое выраженное разнообразие по полиморфизму, структурно-функциональной организации микросателлитных локусов необходимо учитывать при их использовании в качестве маркеров для решения задач общей и частной генетики сельскохозяйственных видов животных.

### Библиографический список

1. Глазко В.И., Столповский Ю.А., Феофилов А.В., Кол Н.В. Распределение фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами ди- и тринуклеотидных микросателлитнов в геномах серого украинского скота // Известия ТСХА, 2009. Вып. 1. С. 155-162.
2. Cuddapah S., Jothi R., Schones D. E. et al. Global analysis of the insulator binding protein CTCF in chromatin barrier regions reveals demarcation of active and repressive domains// Genome Research, 2009. Vol. 19. P. 24-32.
3. You-Chun hi, Abraham B.Korol, Tzion Fahima, Avigdor Beiles and Eviatar Nevo. Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review // Molecular Ecology, 2002. P. 2453-2465].
4. Zietkiewicz E., Rafalski A., Labuda D. Genome fingerprinting by sequece repeat(SSR) — anchored polymerase chain reaction amplification// Genomics, 1994.20. P. 176-183.

### SUMMARY

The comparative analysis of polymorphism of DNA fragments in some cattle breeds and yaks revealed in polymerase chain reaction by using of microsatellite repeats as primers was carried out. The data about the expressed differences in polymorphism of amplification product spectra in relation with primer using was obtained. Search in GenBank of cattle genome sequences allowed to assume that rather high polymorphism of DNA fragments, flanked by inverted repeats AG, was caused by localization of these sequences in Main Histocompatibility Complex genes, unlike repeat GA, localized in DNA sites of factor linkage participated in chromatin folding regulation

**Key words:** microsatellite loci, inverted repeats, polyloci spectra.

**Феофилов Антон Владимирович** — асп. центра нанотехнологий РГАУ - МСХА имени К.А. Тимирязева. Эл. почта: afeofilov@timacad.ru

**Глазко Валерий Иванович** — д. с.-х. н. Эл. почта: vglazko@yahoo.com