

УДК 575.174.015.3:599.723

# АССОЦИАЦИИ ИНВЕРТИРОВАННОГО ПОВТОРА (GAG)<sub>6</sub>C (ISSR-PCR МАРКЕРЫ) СО СТРУКТУРНЫМИ ГЕНАМИ В ГЕНОМЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

В.И. Глазко<sup>1,2</sup>,  
Г.Ю. Косовский<sup>1</sup>,  
С.Н. Ковальчук<sup>1</sup>, Т.Т. Глазко<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ЦЕНТР ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ЭМБРИОЛОГИИ И РЕПРОДУКТИВНЫХ БИОТЕХНОЛОГИЙ,

<sup>2</sup>РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ АГРАРНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ – МСХФ ИМЕНИ К.А. ТИМИРЯЗЕВА

Выполнен анализ ассоциаций со структурными генами последовательности (GAG)<sub>6</sub>C, предрасположенной к формированию триплексов, в геномах черно-пестрого голштинизированного скота. В большинстве случаев гомологичные (GAG)<sub>6</sub>C последовательности локализуются в генах иммунной и клеточной сигнальной систем или на их 5' флангах в межгенном пространстве. У инфицированных вирусом бычьего лейкоза коров гомологичная последовательность обнаруживается в гене сапозина (NK-lysin). Обсуждается возможная вовлеченность последовательности (GAG)<sub>6</sub>C в регуляцию транскрипции и активности иммунного ответа.

**Ключевые слова:** микросателлиты, секвенирование, неканонические структуры ДНК, ретровирусы, регуляция транскрипции.

## ВВЕДЕНИЕ

Методы полилокусного генотипирования (геномного сканирования) варьируют от мононуклеотидного полиморфизма (Single Nucleotide Polymorphisms – SNP), до полного секвенирования. К одному из таких методов относятся оценки полиморфизма фрагментов ДНК, фланкированных инвертированными повторами участков микросателлитных локусов (Inter-Simple Sequence Repeat – ISSR-PCR) [1]. К достоинствам этого метода относится то, что в полимеразной цепной реакции (PCR) происходит множественная адресная амплификация фрагментов геномной ДНК, длиной, как правило, от 200 до 2000 пар оснований (п.о.), у которых есть выраженная структурная особенность – наличие на флангах инвертированного повтора, маркирующего предрасположенность к фор-

## ASSOCIATIONS INVERTED REPEAT (GAG)<sub>6</sub>C (ISSR-PCR MARKERS) WITH THE STRUCTURAL GENES IN THE CATTLE GENOMES

V.I. GLAZKO, G.U. KOVOSKY,  
S.N. KOVALTCHUK, T.T. GLAZKO

The analysis of the associations between of different structural genes and (GAG)<sub>6</sub>C sequences that is prone to the formation of triplexes in the genomes of black-and-white Holstein cattle was carried out. The homologous sequences were localized in genes of immune and cellular alarm systems or near the 5' flanks of them in the intergene spaces in most cases. The homologous sequence was revealed in the cows infected by Bovine Leucosis Virus in saposin gene (NK-lysin). The possible involvement of DNA areas, flanking by (GAG)<sub>6</sub>C in regulation of a transcription and activity of the immune answers was discussed.

**KEYWORDS:** *microsatellites, sequences, non-canonical DNA structures, retroviruses, regulation of transcription.*

мированию неканонических структур – ДНК петель. В то же время, существенным его недостатком, кроме доминантного характера присутствия амплифицируемого фрагмента ДНК, является «анонимность» нуклеотидных последовательностей, заключенных между известными флангами. Этот вопрос представляет особый интерес, поскольку количество амплифицируемых фрагментов ДНК, их полиморфизм у одних и тех же животных существенно отличаются в зависимости от микросателлита, участок которого используется в качестве праймера в PCR [1].

Ранее нами были получены данные, свидетельствующие о том, что по ISSR-PCR маркерам группы черно-пестрого голштинизированного скота, отличающиеся по инфицированию вирусом бычьего лейкоза (Bovine Leukose Virus – BLV) и характеристиками молочной

продуктивности, существенно дифференцируются по генетической структуре. Причем генетические взаимоотношения между группами зависят от микросателлитов, используемых в PCR в качестве праймеров. Полиморфизм спектров продуктов амплификации (ампликонов), полученных в результате применения в качестве праймеров последовательностей  $(AGC)_6C$  и  $(GAG)_6C$ , оказался сходным у всех групп коров, инфицированных BLV, вне зависимости от их молочной продуктивности, а спектры праймера  $(AG)_9C$  дифференцировали коров с высокой молочной продуктивностью от животных с низкой продуктивностью, независимо от их инфицированности BLV [3]. Секвенирование фрагмента ДНК, фланкированного инвертированным повтором  $(AGC)_6C$ , позволило обнаружить присутствие последовательностей, гомология к которым отсутствовала в секвенированном геноме герефорда (мясная порода) GenBank и относительно повышенную частоту встречаемости участков ретро-транспозонов и их рекомбинантов, видоспецифичных для *Bos taurus*, у инфицированных BLV животных [2]. Это позволило выдвинуть предположение о том, что у инфицированных животных относительно понижена активность внутриклеточных систем, препятствующих ретротранспозициям и интеграции в геном ДНК копий ретровирусных последовательностей [2]. Полученные данные соответствуют результатам геномного секвенирования, свидетельствующим о тесной связи микросателлита с коровым мотивом AGC с видоспецифичным ретротранспозоном и их ассоциированным распространением в геноме крупного рогатого скота [18].

В настоящей работе выполнено секвенирование и анализ полученных результатов фрагмента геномной ДНК, фланкированного инвертированным повтором  $(GAG)_6C$ , у коров, инфицированных BLV и свободных от инфекции. Последовательности, фланкированные этим микросателлитом, представляют особый интерес не только потому, что при использовании его в качестве праймера коров, инфицированных BLV, оказываются сходными по ISSR-PCR маркерам, вне зависимости от их молочной продуктивности [3], но и потому, что  $(GAG)_6$  является пурип/пиримидиновым треком, предрасположенным к формированию таких неканонических структур ДНК, как триплексы, выполняющих существенную роль в формировании вторичных структур ДНК и РНК, влияющих на процессы репликации, транскрипции, частоту мутационных событий [9]. Следует отметить, что последовательности, предрасположенные к формированию триплексов, обнаруживаются и в провирусной ДНК самого инфекционного агента BLV [16].

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали образцы тотальной ДНК, выделенной из цельной крови 6 коров черно-пестрой

В. И. ГЛАЗКО, Г. Ю. КОСОВСКИЙ,  
С. Н. КОВАЛЬЧУК, Т. Т. ГЛАЗКО  
АССОЦИАЦИИ ИНВЕРТИРОВАННОГО ПОВТОРА  
 $(GAG)_6C$  (ISSR-PCR МАРКЕРЫ) СО СТРУКТУРНЫМИ  
ГЕНАМИ В ГЕНОМЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

голштинизированной породы. Пробы крови были отобраны в декабре 2011 г. из хвостовой вены стерильными катетерами с использованием ЭДТА в качестве антикоагулянта. По результатам предыдущих исследований [4], три коровы были инфицированы вирусом бычьего лейкоза (№ 494, 513, 519) и три коровы оказались свободными от инфекции (№ 500, 515, 534).

ДНК выделяли с помощью набора Magna™ DNA Prep 200 («Лаборатория Изоген», Россия). Инкубационная смесь объемом 20 мкл содержала 2 мкл 10-кратного буфера и 1 мкл (5 ед.) Taq-полимеразы («Синтол», Россия), 2 мкл раствора dNTP (10 мМ каждого), 1 мкл праймера  $(AGC)_6G$  (20 пкмоль), 2 мкл (0,5–1 мкг) ДНК, 12 мкл деионизированной воды. ПЦР проводили при следующих условиях: начальная денатурация в течение 1 мин при 94° С; 35 циклов (30 с при 94° С, 30 с при 55° С, 2 мин при 72° С); финальная элонгация при 72° С в течение 10 мин. Электрофорез продуктов амплификации проводили в 1% агарозном геле. В качестве маркеров использовали M25 DNA Ladder и M11 DNA Ladder («СибЭнзим», Россия). На секвенирование были взяты фрагменты ДНК длиной 450–550 пар нуклеотидов (п.н.), выделенные из агарозных гелей. Получение библиотеки фрагментов ДНК проводили по протоколу подготовки быстрых библиотек, клональную эмульсионную ПЦР и секвенирование проводили с использованием наборов реактивов согласно рекомендациям фирмы-производителя (Roche). Определение нуклеотидных последовательностей ампликонов проводилось на геномном анализаторе GS Junior (Roche). Определено около 22 млн п.н., 70 223 прочтений были идентифицированы как пригодные для дальнейшего анализа, из них были отобраны только последовательности длиной не менее 380 нп.

Секвенированные данные организовывали с учетом разработанных методов такого анализа [11–12, 14]. Последовательности группировались в отдельные кластеры («риды») на основании их идентичности.

Выравнивание секвенированных последовательностей каждого кластера с хромосомными последовательностями *Bos taurus* выполняли с использованием алгоритмов программы BLASTn (ресурс <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>). Для анализа присутствия в секвенированных последовательностях участков, идентичных микросателлитам и диспергированным повторам, использовали компьютерные программы RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) и Giri (<http://www.girinst.org>). Принадлежность генов, в которых присутствовали участки гомологии к секвенированным последовательностям, к различным функциональным группам и метаболическим путям, определяли с использованием базы данных GeneCards.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате выполненных процедур амплификации, выделения и секвенирования фрагмента геном-

ной ДНК черно-пестрых голштинизированных коров, получен ряд нуклеотидных последовательностей, анализ которых выполнялся с использованием алгоритмов программ BLASTn ([ресурс https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/](https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/)), RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) и Giri (<http://www.girinst.org/>), а также базы данных GeneCards.

С использованием алгоритмов программы BLSTn, выполнен поиск участков гомологии к последовательности праймера gagaggaggaggaggagc в плюс- и минус цепях секвенированного генома коровы мясной породы герефорд, представленных в базе GenBank. Оказалось, что таких последовательностей в геноме существенно меньше по сравнению, например, с таким микросателлитом, как agcagcagcagcagcagcagcagc [2]. Если учитывать только полную гомологию, суммарно таких участков 79, с одной или двумя заменами – 762. В связи с низкой частотой встречаемости микросателлит с коровым мотивом gag даже не вошел в результаты геномного анализа частот встречаемости три-нуклеотидных микросателлитов у крупного рогатого скота, в отличие от микросателлита с мотивом agc [18].

Учитывая нуклеотидные ошибки, возникающие при проведении полимеразной цепной реакции, процедуры самого секвенирования, наличия фильтров для удаления из результатов недостаточно качественно секвенированных участков, традиционно рекомендуется в анализ секвенированных последовательностей включать только те, которые образуют кластеры («риды»), содержащие не менее 12 идентичных копий нуклеотидных последовательностей [5].

В результате секвенирования получены следующие данные. В последовательностях, несущих участки гомологии к праймеру (GAG)<sub>6</sub>C в «ридах», содержащих более 12 идентичных копий, среди межгенных областей только 4 встречаются у всех без исключения коров (хромосома 3, на 3' конце участка гомологии к gagaggaggaggaggag располагается ген предшественника макрофаг-колонии стимулирующего фактора; хромосома 20 – ген фактора регуляции транскрипции IRX-1, опухоль-супрессирующий фактор; хромосома 22 – ген белка RFT1, участвующего в гликолизировании белков для их транспорта в каналцы эндоплазматического ретикулюма; хромосома 25 – ген рибосомально-го белка 39S L28, митохондриального предшественника) и 8 в структурных генах (хромосома 5 – cytohesin-4 – член семейства белков PSCD, участвующих в белковом сортинге и связывании белков с плазматическими мембранами; хромосома 8 – palladin isoform X2, AKT1 – член семейства серин/треонин киназ, ингибирующих апоптоз; хромосома 13 – potassium voltage-gated channel subfamily B member 1, участвующий в контроле клеточного объема и ионной проводимости; хромосома 15 – arf-GAP с доменом Rho-GAP – ADP-рибозилирующий фактор (ARF) GTPаза активирующий белок, участвующий в перестройках цитоскелета

в процессах клеточной дифференцировки; хромосома 16 – MAP kinase-activated protein kinase 2 – член семейства серин/треонин киназ MAP метаболического пути, который является интегральной точкой пересечения множества внутриклеточных процессов, таких как пролиферация, цитодифференцировка, регуляция транскрипции; хромосома 18 – phosphorylase b kinase регуляторная субъединица, взаимодействует с кальмодулином, участвует в фосфорилировании серина в ряде субстратов, в частности, тропонина; хромосома 19 – ras-related protein Rab-40B, участвует в формировании внутриклеточных секреторных везикул; хромосома 27 – deoxycytidylate deaminase, специфичная ДНК-одноцепочечная цитидин-деаминаза, связана с соматическим гипермутационным процессом, генной конверсией и класс-переключающей рекомбинацией В-лимфоцитов.

В общем, из 12 разных участков полной гомологии к последовательности gagaggaggaggaggagc, два связаны с регуляцией транскрипции, два с функцией иммунной системы, все остальные – со структурными элементами клетки, плазматическими и внутриклеточными мембранами, элементами цитоскелета.

Сама последовательность микросателлита с коровым мотивом GAG предрасположена не только к формированию триплексов, в том числе и межмолекулярных (ДНК-РНК), но и к образованию G4 квадруплексов – сложной вторичной структуре ДНК, непосредственно вовлекаемой как в регуляцию генной экспрессии, так и в повышенную частоту мутационных событий [20]. Можно ожидать, что ее локализация в перечисленных геномных участках в определенной степени ассоциирована с регуляторными событиями, вовлеченными в функцию иммунной системы, а также перестройки клеточной архитектуры.

В связи с тем, что фланги секвенированного участка включали инвертированный повтор микросателлита, что само по себе предполагает высокую вероятность возникновения спонтанных мутаций и ошибок при получении конечных данных, далее в анализ мы включали все без исключения последовательности, даже если в кластере («риде») их количество не превышало двух копий.

При анализе всех секвенированных последовательностей получены следующие данные. В отличие от фрагментов ДНК, фланкированных инвертированным повтором (AGC)<sub>6</sub>C [2], все, без исключения, кластеры имели участки гомологии в полностью секвенированном геноме *Bos taurus*, представленном в GenBank, полученном на основании генома коровы мясной породы герефорд [18].

Участки гомологии к 49 фрагментам обнаруживались в межгенном пространстве на разных хромосомах. Анализ функциональных особенностей структурных генов, локализованных по данным GenBank на 3' концах таких участков гомологии с использованием

базы данных GeneCards, позволил их подразделить на 13 функциональных групп. Чаще всего, в 8 из 49 случаев, их 3' концы находились вблизи с 5' флангами генов, участвующими в функционировании иммунной системы, такими как макрофаг-стимулирующий фактор, семейства иммуноглобулин-подобных рецепторов лейкоцитов, тяжелая цепь иммуноглобулинов эпсилон, поверхностные рецепторы Т-клеток. Вторая по частоте встречаемости функциональная группа таких последовательностей включала системы передачи сигнала (в 6 из 49 случаев), такие как ольфакторные рецепторы, содержащие домен SH3 киназа – связывающие белки, тирозин фосфатазы, гены цАМФ метаболического пути. Остальные фрагменты гомологии локализовались рядом с началами генов, которые относились к регуляторам пролиферации (3 участка), ДНК фолдинга (4 участков), геометрии клетки (4 участка), адгезии (1 участок), к факторам регуляции транскрипции (5 участков), рибосомальным белкам (4 участка), к регуляторам транспорта в клетку (3 участка), секреции (2 участка), убиквитин-зависимых путей (4 участка), липидного синтеза (2 участка), углеводного синтеза (3 участка). В общем, участки гомологии к секвенированным последовательностям, локализованные в межгенных пространствах и обладающие предрасположенностью к формированию триплексов (как содержащие пуриновые/пиримидиновые треки), располагались преимущественно перед структурными генами, продукты которых участвуют в функциях иммунной системы и клеточных каскадах передачи сигнала.

Собственно в структурных генах обнаружено 57 участков гомологии, причем, в отличие от 13 функциональных групп генов на 3' флангах таких участков, в выборке генов с внутренними гомологичными последовательностями обнаруживается 11 функциональных групп, без генов, продукты которых участвуют в регуляции секреции и липидного синтеза. Ведущими группами оказались гены иммунной системы (7 генов), клеточных систем передачи сигналов (8 генов) и регуляции транскрипции (8 генов). Несколько иное распределение обнаруживается и по участкам гомологии в генах, продукты которых участвуют в регуляции пролиферации (6 генов), ДНК фолдинга (5 генов), геометрии клетки (3 гена), адгезии (5 генов), рибосомальным белкам (3 гена), к регуляторам транспорта в клетку (4 гена), убиквитин-зависимых путей (4 гена), углеводного синтеза (4 гена).

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что среди секвенированных последовательностей чаще всего встречаются ассоциированные с генами иммунной и сигнальной систем. Причем из 8 генов, расположенных на 3' фланге участков гомологии к микросателлиту (GAG)<sub>6</sub>C, и из 7 структурных генов, в которых есть участки гомологии к этой последовательности, продукты которых вовлечены в функции иммунной системы, четыре гена одинаковы (табл. 1).

В. И. ГЛАЗКО, Г. Ю. КОСОВСКИЙ,  
С. Н. КОВАЛЬЧУК, Т. Т. ГЛАЗКО  
АССОЦИАЦИИ ИНВЕРТИРОВАННОГО ПОВТОРА  
(GAG)<sub>6</sub>C (ISSR-PCR МАРКЕРЫ) СО СТРУКТУРНЫМИ  
ГЕНАМИ В ГЕНОМЕ КРУПНОГО РОГАТОГО СКОТА

То есть, такие гены, как antimicrobial peptide NK-lysin-like isoform X2 (хромосома 11); leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member (хромосома 18); immunoglobulin heavy constant epsilon (хромосома 21) и cancer/testis antigen 47A-like (хромосома X) могут нести участки гомологии к последовательности gagaggaggaggaggagc как в межгенном пространстве, на своем 5' конце, так и внутри гена. Следует отметить, что на хромосоме 21 ген immunoglobulin heavy constant epsilon (присутствующий в результатах секвенирования у всех исследованных коров) расположен вблизи гена B-cell lymphoma/leukemia 11B isoform X и между ними у некоторых животных также обнаруживается участок гомологии к последовательности (GAG)<sub>6</sub>C. Из этого следует, что участок гомологии может располагаться как рядом с 5' флангом этого гена, внутри него и за его 3' концом. Причем ген B-cell lymphoma/leukemia 11B isoform X хорошо известен предпочтительной интеграцией в нем провирусной ДНК при миелоидной лейкемии у мышей, индуцируемой встройкой ретровируса.

Известно также, что длинные концевые повторы (LTR) провирусной ДНК вируса BLV содержат последовательности, предрасположенные к формированию таких неканонических структур ДНК, как G4 квадруплексы [6], триплексы (*in vivo* и *in vitro*, [16]). В наших собственных исследованиях ранее нами было показано, что сравнительно длинный пурино-пиримидиновый трек длиной в 13 п.о., предрасположенный к формированию межмолекулярных триплексов ДНК-РНК, и отличающийся относительно повышенным консерватизмом как в секвенированных последовательностях GenBank, так и лимфомах, индуцированных BLV, начинается в LTR BLV с 90 нуклеотида (СТТССССТТТССС) и локализован в области второго участка T<sub>x</sub>RE [6]. Нами также были выявлены короткие пурино-пиримидиновые треки, которые могут создавать как шпильчатые, так и триплексные структуры в LTR BLV – два участка ТСТСТССТ, от 364 нуклеотида и от 458 нуклеотида, и одна инвертированная по отношению к ним последовательность AGGAGAGA (с позиции 485 нуклеотид), первая на расстоянии в 113 нуклеотидов от инвертированной последовательности, вторая – на расстоянии 19 нуклеотидов. Можно ожидать, что встройки провирусной ДНК с такими флангами, предрасположенными к формированию неканонических структур ДНК, оказывают существенное влияние на экспрессию рядом расположенных генов.

Участок T<sub>x</sub>RE (Tax-responsive elements), связывающий активатор транскрипции провирусной ДНК (Tax), в котором выявлен пурино-пиримидиновый трек, представляет особый интерес, поскольку локализован в энхансерном участке LTR. Показано, что Tax непосредственно участвует в регуляции транскрипции провирусной ДНК BLV и оказывает существенное влияние

ТАБЛИЦА 1.

Гены иммунной системы, в которых обнаруживаются участки гомологии к нуклеотидной последовательности (GAG)<sub>6</sub>C, или расположенные рядом с 3' концом этой последовательности

Межгенное пространство с участками гомологии к (GAG) <sub>6</sub> C, на 3' флангах которой расположены следующие гены:								
Гены на 3' флангах	antimicrobial peptide NK-lysin-like isoform X2	leukocyte immunoglobulin-like receptor subfamily B member	cancer/testis antigen 47A-like	immunoglobulin heavy constant epsilon	receptor-type tyrosine-protein phosphatase U precursor	T-cell surface glycoprotein CD4 isoform X	B-cell lymphoma/leukemia 11B isoform X	macrophage colony-stimulating factor
	Хромосома 11	Хромосома 18	Хромосома X	Хромосома 21	Хромосома 2	Хромосома 5	Хромосома 21	Хромосома 3
Структурные гены с участками гомологии к (GAG) <sub>6</sub> C								
Структурные гены	antimicrobial peptide NK-lysin-like isoform X2	leukocyte immunoglobulin-like receptor, subfamily B	cancer/testis antigen 47A-like	immunoglobulin heavy constant epsilon	C-C motif chemokine 25 precursor	rho guanine nucleotide exchange factor 40	paired box protein Pax-5 isoform X1	
	Хромосома 11	Хромосома 18	Хромосома X	Хромосома 21	Хромосома 7	Хромосома 10	Хромосома 8	

на экспрессию генов хозяина, связанных с клеточной пролиферацией и дифференцировкой, иммортализацией первичных клеточных популяций в системе *in vitro*, увеличения скорости мутирования путем подавления эксцизионной репарации ДНК [8]. Показано, что Tax активирует белки, принадлежащие сигнальному пути активаторов белков 1 (activator protein 1 – AP-1), в который входят, в частности, FBJ остеосаркома онкоген (FOS), jun proto-oncogene – JUN) и ряд других, через взаимодействие с другими транскрипционными метаболическими путями (G-protein, GTP-binding proteins и т.д.) [7]. Не смотря на широкий спектр мишеней регуляторных эффектов Tax белка, принято считать, что в общем, одной из ведущих мишеней регуляторных эффектов этого белка являются гены, кодирующие белки, связанные с функцией иммунной системы [8]. Мотивы TaxRE, предрасположенные к формированию неканонических вторичных структур ДНК, как мишени опознавания Tax, могут быть вовлечены в эти процессы. В наших исследованиях последовательности gaggaggaggaggaggagc, предрасположенные к формированию G<sub>4</sub> квадруплексов и межмолекулярных триплексов (ДНК-РНК), также обнаруживаются преимущественно в связи с генами, продукты которых участвуют в функциях иммунной системы, а также в передаче сигналов.

Среди полученных нами результатов секвенирования геномных фрагментов инфицированных BLV и свободных от инфекции коров был только один структурный ген antimicrobial peptide NK-lysin, участок которого всегда входил в секвенированные последовательности продукта амплификации геномной ДНК, фланкированной инвертированным повтором gaggaggaggaggaggagc, у всех трех инфицированных BLV коров и отсутствовал у 2-х коров, свободных от инфекции. То есть, у всех инфицированных коров высокая вероятность подавления экспрессии этого гена

за счет образования межмолекулярного триплекса (ДНК-РНК) и, соответственно, подавления транскрипции [9]. У двух коров, свободных от BLV, участки гомологии к (GAG)<sub>6</sub>C в этом гене отсутствовали, что приводило к его отсутствию в секвенированных продуктах амплификации при использовании (GAG)<sub>6</sub>C в полимеразной цепной реакции в качестве праймера.

У третьей коровы, свободной от инфекции, присутствие этого участка в структурном гене совпадало с присутствием его же в межгенном пространстве на 5' конце гена, что позволяет предполагать сложный механизм взаимодействия между ними.

Очевидно, что связь между присутствием в гене NK – lysin (сапозин) последовательности, предрасположенной к формированию неканонических ДНК структур и сниженной чувствительностью коров к инфицированию BLV, требует дальнейших экспериментальных исследований. Однако факт совпадения присутствия в нем инвертированной последовательности (GAG)<sub>6</sub>C, предрасположенной к формированию сложных неканонических вторичных структур ДНК и снижению эффективности транскрипции, у инфицированных BLV коров, по нашему мнению, заслуживает особого внимания. Сапозин – член семейства сапозин-подобных белков (SAPLIP), локализованных в цитотоксических гранулах Т клеток, освобождающихся при антиген стимуляции. Этот белок присутствует в цитотоксических гранулах цитотоксических Т лимфоцитов и нуллеров-киллеров (NK клетки), описана их антимикробная активность по отношению к туберкулезной бактерии *M. tuberculosis*, других инфекционных агентов, а также участие в защите от некоторых ретровирусных инфекций, таких как вирус иммунодефицита человека (HIV) [10, 15, 17, 19].

Следует подчеркнуть, что HIV по ряду своих характеристик очень близок к BLV и исследования организации

последнего, взаимодействия его с многоклеточными организмами часто используются как модель для получения новой информации об особенностях HIV [13].

С использованием программ RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org/>) и Gini (<http://www.girinst.org>) был выполнен в секвенированных последовательностях поиск участков гомологии среди диспергированных повторов. В отличие от результатов такого поиска в секвенированных последовательностях ДНК, фланкированных инвертированным повтором (AGC)<sub>6</sub>G, выполненного нами ранее [2], в данном случае диспергированных повторов оказалось всего 12, причем участки гомологии были относительно короткими (табл. 2).

В общем, участки гомологии к последовательности (GAG)<sub>6</sub>C обнаруживаются в трех ДНК транспозонах и в девяти ретротранспозонах, среди которых *Soria* и *Gypsy* одни из широко распространенных представителей этого класса мобильных генетических элементов.

Полученные данные позволяют сделать следующее заключение. Секвенированные последовательности длиной около 550 п.о., фланкированные инвертированным повтором (GAG)<sub>6</sub>C, в геномной ДНК крупного рогатого скота черно-пестрой голштинизированной породы имеют высокую степень гомологии

(более 90%) с участками геномной ДНК породы герефорда, представленной в GenBank. Участки гомологии расположены в основном либо в генах иммунной системы и клеточной передачи сигнала, либо в межгенном пространстве рядом с 5' флангами таких генов. Обнаружено, что инфицированные вирусом BLV животные отличались от свободных от инфекции присутствием в гене *NK-lysin* (сапозин) участка ДНК, фланкированного инвертированным повтором (GAG)<sub>6</sub>C. Можно ожидать, что предрасположенность последовательности *gaggaggaggaggaggag* к формированию межмолекулярных триплексов (ДНК-РНК) снижает транскрипционную активность этого гена, что может способствовать повышенной чувствительности животных к инфицированию BLV.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Глазко Т.Т. Введение в геномную селекцию животных. М.: ООО «Приятная компания», 2012. 258 с.
2. Глазков В.И., Косовский Г.Ю., Ковальчук С.Н., Архипов А.В., Петрова И.О., и др. Инвертированный повтор микросателлита (AGC)<sub>6</sub>G фланкирует районы ДНК с участками гомологии к ретротранспозонам в геноме крупного рогатого скота

ТАБЛИЦА 2.

Мобильные генетические элементы, гомология к которым обнаружена в секвенированных фрагментах, фланкированных инвертированным повтором (GAG)<sub>6</sub>C, в геномной ДНК коров, инфицированных вирусом бычьего лейкоза (+BLV), и свободных от инфекции (-BLV)

№ коровы	494 +BLV	500 -BLV	513+BLV	515-BLV	519+BLV	534-BLV
Транспозоны	Координаты участков гомологии в п.о. (гомология не менее 80%)					
ДНК транспозон Sola1-1_ACas	1–53	нет	1–53	1–53	1–53	нет
ДНК транспозон DNA/hAT	нет	нет	нет	нет	нет	2031–2116
ДНК транспозон CHARLIE2A	нет	нет	нет	нет	нет	12–96
Ретротранспозон Soria-22_PIT-I	257–305	257–305	160–208	161–209	нет	нет
Ретротранспозон Soria-8_TA-I	нет	349-461	нет	нет	нет	нет
Ретротранспозон Gypsy-15_CFI-I	нет	нет	358–437	357–436	358–437	нет
Ретротранспозон Gypsy-18_SCH-I	нет	нет	366–421	367–422	1–56	нет
Ретротранспозон Gypsy-32_Mad-I	нет	нет	нет	нет	нет	126–222
Ретротранспозон LTR76_EC	нет	401–484	400–484	нет	нет	нет
Ретротранспозон LTR-14B_Crp	429–457	нет	нет	нет	нет	нет
Ретротранспозон RMER17C2 (ERV/ERV2)	нет	нет	нет	нет	нет	472–503
Ретротранспозон REP-19_CPB	нет	нет	322–433	нет	нет	нет

- // Инновационные технологии в медицине. 2014. № 2(03). С. 63–79.
3. КОСОВСКИЙ Г.Ю., ГЛАЗКО В.И., АРХИПОВ А.В., ПЕТРОВА И.О., ГЛАЗКО Т.Т. Популяционно-генетическая дифференциация молочного скота по ISSR-PCR маркерам // Доклады Российской академии сельскохозяйственных наук. 2014. № 5. С. 53–56.
  4. КОСОВСКИЙ Г.Ю., СОТНИКОВА Е.А., МУДРИК Н.Н., CUONG V.C., ТОАН Т.Х., НОАН Т.Х., ГЛАЗКО В.И. Диагностика лейкоза КРС с помощью праймеров к генам gag и pol. // Ветеринария. 2013. № 8. С. 58–61.
  5. РЕБРИКОВ Д.В., КОРОСТИН Д.О., ШУБИНА Е.С., ИЛЬИНСКИЙ В.В. NGS: высокопроизводительное секвенирование. М.: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2014. 232 с.
  6. САМУЙЛЕНКО А.Я., КОСОВСКИЙ Г.Ю., ГРИНЬ С.А., СИНКОВЕЦ С.М., ГЛАЗКО Т.Т., ГЛАЗКО В.И. Полиморфизм и потенциальные неканонические структуры в LTR вируса бычьего лейкоза / Научные основы производства и обеспечения качества биологических препаратов для АПК. Мат-лы междунар. научно-практической конф., посвященной 45-летию института ВНИТИБП, 27–28 ноября 2014. М., 2014. С. 106–117.
  7. AIDA Y., MURAKAMI H., TAKAHASHI M., TAKESHIMA S.-N. Mechanisms of pathogenesis induced by bovine leukemia virus as a model for human T-cell leukemia virus // Front. Microbiol. 2013. Vol. 4, article 328, doi: 10.3389/fmicb.2013.00328.
  8. ARAINGA M., TAKEDA E., AIDA Y. Identification of bovine leukemia virus tax function associated with host cell transcription, signaling, stress response and immune response pathway by microarray-based gene expression analysis // BMC Genomics. 2012, 13:12, <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/13/121>.
  9. BUSKE F.A., MATTICK J.S., BAILEY T.L. Potential *in vivo* roles of nucleic acid triple-helices // RNA Biology 2011. V. 8, N 3. P. 427–439.
  10. ENDSLEY J.J., FURRER J.L., ENDSLEY M.A., MCINTOSH M.A., MAUE A.C. ET AL. Characterization of bovine homologues of granulysin and NK-lysin // J. of Immunology. 2004. Vol. 173. P. 2607–2614.
  11. EWING B., GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. Genome Res. 1998. Vol. 8. P. 186–194.
  12. EWING B., HILLIER L., WENDL M.C., GREEN P. Basecalling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment // Genome Res. 1998. Vol. 8. P. 175–185.
  13. GILLET N.A., GUTIERREZ G., RODRIGUEZ S.M., DE BROGNIEZ A., RENOTTE N. ET AL. Massive depletion of bovine leukemia virus proviral clones located in genomic transcriptionally active sites during primary infection // PLoS Pathog. 2013. Vol. 9, N 10. e1003687. doi:10.1371/journal.ppat.1003687.
  14. GORDON D., ABAJIAN C., GREEN, P. Consed: a graphical tool for sequence finishing // Genome Res. 1998, Vol. 8. P. 195–202.
  15. LEE M.O., KIM E.-H., JANG H.-J., PARK M.-N., WOO H.-J., HAN J.-Y., WOMACK J.E. Effects of a single nucleotide polymorphism in the chicken NK-lysin gene on antimicrobial activity and cytotoxicity of cancer cells // PNAS. 2012. Vol. 109, N 30. P. 12087–12092.
  16. LIMANSKAYA O.YU. Polypurine/polypyrimidine sequences with potential of forming triplexes in the proviral DNA of bovine retroviruses // Cytology and Genetics. 2010. Vol. 44, N 1. P. 10–18.
  17. PITABUT N., SAKURADA S., TANAKA T., RIDRUENHAI C., TANUMA J. ET AL. Potential function of granulysin, other related effector molecules and lymphocyte subsets in patients with TB and HIV/TB Coinfection // Int. J. Med. Sci. 2013. Vol. 10, N 8. P. 1003–1014.
  18. TELLAM R.L., WORLEY K.C. The genome sequence of taurine cattle: a window to ruminant biology and evolution // Science. 2009. Vol. 324. P. 522–528.
  19. ZHANG M., LI M.-F., SUN L. NKLP27: a teleost nk-lysin peptide that modulates immune response, induces degradation of bacterial dna, and inhibits bacterial and viral infection. PLoS ONE. 2014. Vol. 9, № 9, e106543. doi:10.1371/journal.pone.0106543.
  20. ZYBAILOV B.L., SHERPA M.D., GLAZKO G.V., RANEY K.D., GLAZKO V.I. G4-quadruplexes and genome instability // Molecular Biology. 2013. Vol. 47. N 2. P. 197–204.
- 
- Глазко Валерий Иванович**,  
д.с.-х.н., профессор, академик РАСХН (иностранный член),  
ведущий сотрудник Центра экспериментальной эмбриологии  
и репродуктивных биотехнологий, зав. Центром на-  
нобиотехнологий Российского государственного аграрного  
университета – МСХА имени К.А. Тимирязева  
☎ тел.: +7 (916) 145-38-60, e-mail: [vigvalery@gmail.com](mailto:vigvalery@gmail.com)
- Косовский Глеб Юрьевич**,  
д.б.н., директор Центра экспериментальной эмбриологии и  
репродуктивных биотехнологий
- Ковальчук Светлана Николаевна**,  
к.б.н., доцент, зав. отделом молекулярных биотехнологий  
Центра экспериментальной эмбриологии и репродуктив-  
ных биотехнологий
- Глазко Татьяна Теодоровна**,  
д.с.-х.н., профессор кафедры кормления и разведения жи-  
вотных Российского государственного аграрного универси-  
тета – МСХА имени К.А. Тимирязева, ведущий сотрудник  
Центра экспериментальной эмбриологии и репродуктив-  
ных биотехнологий (ЦЭЭРБ)  
☎ тел.: +7 (915) 301-89-60, e-mail: [tglazko@rambler.ru](mailto:tglazko@rambler.ru)
- ☎ 127422 г. Москва, ул. Костякова, д. 12, стр. 4,  
Центр экспериментальной эмбриологии и репродуктив-  
ных биотехнологий (ЦЭЭРБ)
- ☎ 127550 г. Москва, ул. Тимирязевская, д. 49,  
Российский государственный аграрный университет  
– МСХА им К.А. Тимирязева