



АССОЦИАЦИЯ ПОЛИМОРФИЗМА ISSR И IRAP МАРКЕРОВ С ОСОБЕННОСТЯМИ ГЕНОМНОЙ ЛОКАЛИЗАЦИИ НА ПРИМЕРЕ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ МЛЕКОПИТАЮЩИХ И ПРЕСМЫКАЮЩИХСЯ

Ассоциация полиморфизма ISSR и IRAP маркеров с особенностями геномной локализации

И.Г. Блохин^{1*}, Т.Т. Глазко³, П.С. Апашкин², В.И. Глазко³

¹Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Российский государственный аграрный университет – МСХА имени К.А. Тимирязева»

Россия, 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская ул., 52,

*e-mail: blokhin.ivan96@gmail.com

²Московский финансово-промышленный университет «Синергия»

Россия, 105318, г. Москва, ул. Измайловский вал, д.2

³ФГБНУ «Научно – исследовательский институт пушного звероводства и кролиководства имени В.А. Афанасьева»

Россия, 140143, Московская обл., Раменский район, пос. Родники, ул. Трудовая, д. 6.

Одной из проблем использования ДНК-маркеров в популяционно-генетических исследованиях является необходимость подбирать наиболее полиморфные системы каждый раз для исследования новой группы организмов. Проведен сравнительный анализ полиморфизма спектров продуктов амплификации у различных таксонов, таких как домашняя собака *Canis familiaris* (n=53) и прыткая ящерица *Lacerta agilis* (n=55). В качестве праймеров для проведения полимеразной цепной реакции использовали микросателлиты ((ACC)₆T, (TGC)₆C, (GAG)₆C) и длинные концевые повторы эндогенных ретровирусов (SIRE 1, Sabrina). Оценка ко-локализации праймеров вблизи нуклеотидных последовательностей, ассоциированных с повышенной изменчивостью, (транспозоны, G4-квадруплексы, микроРНК) проведена биоинформатическими методами в соответствующих референтных геномах. Наиболее высокой является частота встречаемости микросателлита (GAG)₆C (у ящерицы – 37088, у собаки – 16204), наиболее низкими – частоты встречаемости участков гомологии к длинным концевым повторам двух ретровирусов – SIRE 1 (17 участков гомологии в геноме ящерицы, 6 – в геноме собаки) и Sabrina (21- у ящерицы, 5- у собаки). Наибольшее количество ампликонов у ящериц получено с использованием праймера Sabrina – 19, наименьшее – 8 с использованием праймера (TGC)₆C. У собак наибольшее число ампликонов выявлено в спектрах праймера SIRE 1 (21), наименьшее – (TGC)₆C (6). У прыткой ящерицы максимальное число G4-квадруплексов без перекрытий (17) обнаружено в участке ДНК, фланкированном микросателлитом (TGC)₆C, с полиморфизмом 87,5%, больше всего G4-квадруплексов с перекрытиями (1756) обнаружено в участке ДНК, фланкированном праймером (GAG)₆C, с наименьшим полиморфизмом (36,4%). В референтном геноме домашней собаки наибольшее количество квадруплексов обнаружено в участках спектра микросателлита (GAG)₆C (13 с перекрытиями и 3789 – без перекрытий) с полиморфизмом 83%. Таким образом, имеется ассоциация между плотностью G4-квадруплексов и пониженным полиморфизмом ДНК-маркеров.

Ключевые слова: мобильные генетические элементы, микросателлиты, G4-квадруплексы, микроРНК, полиморфизм.

Микросателлиты и ретротранспозоны являются наиболее полиморфными участками генома и удобными инструментами для описания популяционно-генетической структуры разных видов [1-3]. Мобильные генетические элементы, их фрагменты, продукты рекомбинаций между ними у большинства видов занимают около половины ге-

номов. В последние годы во многих работах представлены примеры их вовлечения в горизонтальные переносы генетического материала даже между царствами животных и растений [4-6], а также существенной роли в геномных реорганизациях, затрагивающих различные процессы и структуры организма [7, 8]. Полиморфизм этих геномных

структур позволяет отслеживать изменения в популяционно-генетических структурах разных популяций и видов с высоким разрешением [9].

Такие методы, как амплификация фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированным повтором микросателлита (Inter Simple Sequence Repeat – ISSR-PCR маркеры) или участком гомологии к длинному концевому фрагменту эндогенного ретровируса (Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism – IRAP-PCR маркеры), получили достаточно широкое распространение в связи с быстротой получения конечных результатов и легкостью их интерпретации [10].

В то же время, одной из проблем использования таких маркеров в популяционно-генетических исследованиях являются отличия в полиморфизмах спектров продуктов амплификации, полученных в полимеразной цепной реакции, с использованием в качестве праймеров различных нуклеотидных последовательностей. Это приводит к необходимости подбирать наиболее полиморфные системы каждый раз для исследования новой группы организмов. Можно ожидать, что одним из подходов к подбору таких маркеров может быть выяснение ко-локализации в геномах участков гомологии к праймерам и нуклеотидных последовательностей, способствующих повышенной изменчивости таких районов. К последним могут относиться, в частности, транспозоны, а также взаимное позиционирование гуанинов, лежащих в основе формирования таких вторичных структур ДНК, как G4 квадруплексы [11]. G4 квадруплексы являются маркерами локальной геномной нестабильности и предрасположенности к рекомбинациям [12, 13].

Ещё одним источником изменчивости генома может быть микроРНК, играющая важную роль в регуляции экспрессии генов. Известно, что источником микроРНК являются мобильные генетические элементы и именно это является существенным путем их влияния на формирование регуляторных сетей, определяющих профили генной экспрессии и их динамику у многоклеточных организмов [14].

Домашняя собака (*Canis familiaris*) как объект исследования представляет интерес как самый первый одомашненный человеком вид, который является популярным объектом исследований, в том числе с применением молекулярно-генетических методов. Прыткая ящерица (*Lacerta agilis*) обладает высокой численностью и широким ареалом, что также делает её популярным модель-

ным объектом во многих исследованиях. Особый интерес рептилии в подобных исследованиях представляют как эволюционно более древняя группа, предшествующая млекопитающим.

В связи с вышеизложенным, в настоящей работе предпринята попытка сопоставить полиморфизм ISSR-PCR и IRAP-PCR маркеров, выявляемых у таких объектов, как домашняя собака и прыткая ящерица в экспериментальных исследованиях, и ко-локализация в участках гомологии к используемым праймерам в референтных геномах этих видов транспозонов, G4 квадруплексов и микроРНК.

Материалы и методы исследований

У пойманных особей прыткой ящерицы (*Lacerta agilis*) (n=55) прижизненно купировали хвосты, мышцы которых и служили источником геномной ДНК, у собак трёх пород (грейхаунд (n=18), русская псовая борзая (n=18), хортая борзая (n=17)) были взяты образцы буккального эпителия. В качестве маркеров оценивали полиморфизм фрагментов геномной ДНК, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов (Inter Simple Sequence Repeat – ISSR-PCR маркеры), а также участками длинных концевых повторов (Long Terminal Repeat – LTR) эндогенных ретровирусов (InterRetrotransposon Amplified Polymorphism – IRAP-PCR маркеры).

Геномную ДНК выделяли из биообразцов стандартным набором ДНК Экстран II («Синтол»). Полимеразная цепная реакция (PCR) проводилась на амплификаторе «Терцик» со следующими параметрами: первичная денатурация (t=94°C, 2 мин), денатурация (t=94°C, 30 сек.), отжиг (t=58°C, 30 сек.), элонгация (t=72°C, 2 мин) – 40 циклов, финальная элонгация (t=72°C, 10 мин).

В качестве праймеров были использованы три-нуклеотидные микросателлиты (ACC)₆T, (TGC)₆C, (GAG)₆C и участки длинных концевых повторов эндогенных ретровирусов LTR SIRE1 (5' – GCAG TTATGCAAGTGGGATCAGCA – 3') и Sabrina 11 (5' - AAACAAGAAGTACTGACACTTGGCACT- 3').

Продукты амплификации разделяли в 1,5% агарозном геле в ТАЕ-буфере. Визуализация производилась при помощи УФ трансиллюминатора. 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). Для каждого спектра продуктов амплификации, полученного с соответствующим праймером, строилась

матрица, отображающая присутствие, либо отсутствие конкретного продукта амплификации (ампликона), каждый из которых рассматривался как локус. В случае отсутствия фрагмента ДНК соответствующей длины такой генотип оценивали как гомозиготу по рецессивному аллелю. В качестве популяционно-генетических характеристик оценивали долю полиморфных локусов (% полиморфных фрагментов ДНК по отношению к общему количеству ампликонов, выявленных в спектре каждого праймера).

Поиск участков гомологии с идентичностью не менее 90% к используемым праймерам в референтных геномах домашней собаки (GCF_014441545.1 [15]) и прыткой ящерицы (GCF_009819535.1 [16]) производился с помощью алгоритмов NCBI BLAST+ Standalone [17], языка программирования Python и библиотеки Biopython [18]. Для обнаруженных участков был произведен поиск инвертированных повторов ко всем праймерам на расстоянии от 100 до 2000 п.н. В случае отсутствия инвертированного повтора поиск производился с использованием 100% участка гомологии к используемому праймеру с флангами по 500 нуклеотидов. Из найденных участков для ретротранспозонов и микросателлитов выбирался один участок с наибольшим процентом идентичности, в котором производился поиск мобильных генетических элементов, квадруплексов и микроРНК. Наличие и количество мобильных генетических элементов, квадруплексов и микроРНК оценивали с помощью CENSOR [19], QGRS Search Options [20], miRBase [21].

Результаты исследований и обсуждение

Наибольшее количество амплифицируемых фрагментов в спектрах прыткой ящерицы и домашней собаки и наиболее высокие показатели полиморфизма (в среднем на спектр ампликонов одного праймера) обнаруживаются по IRAP-PCR маркерам по сравнению с ISSR-PCR маркерами (табл.1).

Таким образом, полиморфизм ретротранспозонов и микросателлитов не зависит от выявленных рядом участков гомологии к мобильным генетическим элементам. В референтном геноме прыткой ящерицы в участках около фрагмента SIRE 1 их найдено 2, как и в участках (GAG)₆C, хотя полиморфизм спектров праймера SIRE 1 составляет 100%, а полиморфизм спектров (GAG)₆C – 36,4% (табл. 1).

Такая же ситуация наблюдается при оценке количества мобильных генетических элементов в геноме домашней собаки – в участках микросателлита (TGC)₆C выявлено 3 мобильных генетических элемента, в участках ретротранспозона Sabrina – 2 при полиморфизме спектров 17% и 100% соответственно (табл. 2).

В участках генома прыткой ящерицы, фланкированных инвертированными повторами фрагментов ретротранспозонов SIRE 1 и Sabrina, несмотря на выявленный в экспериментальных исследованиях их высокий полиморфизм, отмечается самое низкое число квадруплексов с перекрытиями (наложение нуклеотидной последовательности квадруплекса на последовательность соседнего квадруплекса) и без перекрытий (98 и 6 – в участ-

Таблица 1. Результаты анализа генома прыткой ящерицы *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758 Table 1. Results of genome analysis of the sand lizard *Lacerta agilis* Linnaeus, 1758

Праймер / Primer	Количество амплифицируемых фрагментов / Number of fragments to be amplified	ДЛ спектров амплифицируемых фрагментов, % / PPL spectra of amplifiable fragments, %	Количество участков гомологии в референтном геноме / Number of homology sites in the reference genome	Последовательности между инвертированными повторами длиной от 100 до 2000 н. / Sequences between inverted repeats between 100 and 2000 n.	В участках референтного генома длиной около 1000 нуклеотидов / In sections of the reference genome about 1000 nucleotides long			
					Количество мобильных генетических элементов / Number of mobile genetic elements	Кол-во квадруплексов (без перекрытий) / Number of quadruplexes (no overlaps)	Кол-во квадруплексов (с перекрытиями) / Number of quadruplexes (with overlaps)	МикроРНК / MicroRNA
SIRE 1	16	88	17	0	2	6	98	14
Sabrina	19	100	21	0	1	6	1	43
(ACC) ₆ T	16	75	3314	21	1	8	658	36
(TGC) ₆ C	8	87,5	12350	476	2	17	1015	13
(GAG) ₆ C	11	36,4	37088	3216	2	13	1756	26

Таблица 2. Результаты анализа генома домашней собаки *Canis familiaris* Linnaeus, 1758 Table 2. Results of genome analysis of the domestic dog *Canis familiaris* Linnaeus, 1758

Праймер / Primer	Количество амплифицируемых фрагментов / Number of fragments to be amplified	ДЛ спектров амплифицируемых фрагментов, % / PPL spectra of amplifiable fragments, %	Количество участков гомологии в референтном геноме / Number of homology sites in the reference genome	Последовательности между инвертированными повторами длиной от 100 до 2000 н. / Sequences between inverted repeats between 100 and 2000 n.	Количество мобильных генетических элементов / Number of mobile genetic elements	Кол-во квадруплексов (без перекрытий) / Number of quadruplexes (no overlaps)	Кол-во квадруплексов (с перекрытиями) / Number of quadruplexes (with overlaps)	МикроРНК / MicroRNA
SIRE 1	21	100	6	0	1	2	3	21
Sabrina	18	100	5	0	2	2	9	21
(ACC) ₆ T	19	95,2	6422	0	1	5	70	131
(TGC) ₆ C	6	17	4055	15	3	5	12	395
(GAG) ₆ C	18	83	16204	468	2	13	3789	312

ках ретротранспозона SIRE 1, 43 и 1 – в участках ретротранспозона Sabrina). Максимальное число G4 квадруплексов без перекрытий (17) обнаружено в участке ДНК, фланкированном инвертированным повтором микросателлита (TGC)₆C. Больше всего G4 квадруплексов с перекрытиями обнаружено в участке ДНК, фланкированном (GAG)₆C, (1756), что ожидаемо в связи с присутствием в самом праймере повторяющихся нуклеотидов GG. В то же время, полиморфизм спектров продуктов амплификации, полученных в экспериментальных исследованиях при использовании в качестве праймеров данных микросателлитов, составляет 87,5% и 36,4% соответственно (табл. 1).

В референтном геноме домашней собаки наибольшее количество квадруплексов с перекрытиями и без перекрытий обнаружено в участках спектра микросателлита (GAG)₆C (13 и 3789), при этом полиморфизм его спектров в эксперименте – 83%. В участках ДНК, фланкированных остальными праймерами, число квадруплексов было значительно ниже, хотя полиморфизм их спектров в экспериментальных исследованиях превышает полиморфизм спектров (GAG)₆C (исключением является микросателлит (TGC)₆C с уровнем полиморфизма его спектров 17%) (табл. 2). Таким образом, можно отметить определенную тенденцию к связи относительно большего количества квадруплексов с низким полиморфизмом спектра праймера.

В референтных геномах у разных видов наиболее высокой является среди исследованных последовательностей частота встречаемости микросателлита (GAG)₆C, наиболее низкими – частоты встречаемости участков гомологии к длин-

ным концевым повторам двух ретровирусов – SIRE 1 и Sabrina, однако это не ассоциировано с результатами экспериментальных исследований полиморфизма спектров фланкируемых ими геномных фрагментов (табл. 1, 2). Таким образом, отсутствует прямая связь между ко-локализацией участков гомологии к ним в референтных геномах и мобильными генетическими элементами, а также их полиморфизмом в экспериментальных исследованиях. В то же время обнаруживается у обоих видов определенная негативная ассоциация между частотой встречаемости ко-локализации G4 квадруплексов в участках референтных геномов, фланкируемых последовательностями, используемыми в эксперименте в качестве праймеров, и полиморфизмом их спектров при проведении полимеразной цепной реакции. Выраженные отличия между частотой встречаемости G4-квадруплексов в рассматриваемых участках референтных геномов домашней собаки и прыткой ящерицы согласуются с данными о видоспецифичности их представленности [22].

Обращают на себя внимание существенные отличия частот встречаемости участков гомологии к последовательностям микроРНК в рассматриваемых нуклеотидных последовательностях референтных геномов: у домашней собаки такие участки встречаются на порядок чаще, чем у прыткой ящерицы, в геномных районах, фланкированных инвертированными повторами микросателлитов (табл. 1, 2).

Интересно, что в наших исследованиях обнаруживается обратная зависимость между частотой встречаемости участков гомологии к микроРНК и плотностью G4 квадруплексов в рас-

смаатриваемых фрагментах референтных геномов домашней собаки и прыткой ящерицы. Из этой ассоциации выпадают только участки, фланкированные инвертированным повтором микросателлита (GAG)₆C, частота встречаемости которого существенно выше остальных рассмотренных микросателлитов в референтных геномах обоих видов. Выявленные межвидовые отличия по частоте встречаемости участков гомологии к микроРНК и G4 квадруплексов в исследуемых участках референтных геномов домашней собаки и прыткой ящерицы не соответствуют представлениям о том, что две эти геномные характеристики, в общем, тесно связаны друг с другом [23].

Нуклеотидная последовательность микросателлита (GAG)_n относится к участкам ДНК, потенциально предрасположенным к формированию триплексов (пурин-пиримидиновых треков), выполняющих существенную роль в формировании вторичных структур ДНК, связывании ДНК:РНК, организации хроматина, регуляции генной экспрессии [24]. Многообразие функциональной вовлеченности таких последовательностей в структурно-функциональную организацию генома, по-видимому, и может объяснять отличия их распределения в референтных геномах обоих видов от других микросателлитных последовательностей.

Заключение

В общем, сравнительный анализ полиморфизма фрагментов геномной ДНК двух видов в экспериментальных исследованиях популяционно-генетических структур с использованием ISSR-PCR и IRAP-PCR маркеров и распределения участков гомологии к используемым в качестве праймеров в полимеразной цепной реакции нуклеотидных последовательностей в референтных геномах домашней собаки и прыткой ящерицы позволяет предполагать определенную ассоциацию между плотностью G4 квадруплексов и полиморфизмом таких маркеров.

Известно, что G4 квадруплексы являются неотъемлемой частью сложных регуляторных систем, тесно связаны с перемещением ретротранспозонов у млекопитающих [25]. Накапливаются данные, свидетельствующие о том, что имеется тонкий баланс между нестабильностью генома, вызванной G4 квадруплексами, и процессами его восстановления, стимулируемыми теми же G4 квадруплексами. Предполагается, что именно это обеспечивает стабильность структур G4 *in vitro* и

in vivo [26], их определенный консерватизм [27]. Высокая плотность G4 квадруплексов в «горячих» точках мононуклеотидных замен, не всегда совпадающая с повышенной частотой рекомбинаций, свидетельствует о возможном влиянии нуклеотидного контекста и различных особенностях формирования вторичной структуры ДНК [28].

Выполненные исследования позволяют предполагать, что, несмотря на полифункциональность и сложность распределения рассмотренных нуклеотидных мотивов, взаимосвязей между ними, предварительный анализ референтных геномов по распределению участков гомологии к потенциальным праймерам и их ассоциаций с частотой встречаемости G4 квадруплексов может способствовать увеличению эффективности применения ISSR-PCR и IRAP-PCR маркеров в популяционно-генетических исследованиях.

Список литературы

1. Блохин И.Г., Глазко В.И. Генетические и фенотипические характеристики в оценках популяционной дифференциации прыткой ящерицы. Юг России: экология, развитие. 2021;16(3):47-58. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2021-3-47-58>.
2. Календарь Р.В., Глазко В.И. Типы молекулярно генетических маркеров и их применение // Физиология и биохимия культурных растений. 2002. Т. 34. N 4. С. 279-295.
3. Глазко В.И., Косовский Г.Ю., Блохина Т.В., Есин А.Г., Глазко Т.Т. Геномный «портрет» некоторых видов псовых, полученный с помощью ISSR-PCR и IRAP-PCR маркеров Кролиководство и звероводство. 2020. № 1. С. 28-39.
4. Atma M. Ivancevic, R. Daniel Kortschak, Terry Bertozzi, and David L. Adelson. Horizontal transfer of BovB and L1 retrotransposons in eukaryotes. *Genome Biology*, 2018. – doi:10.1186/s13059-018-1456-7.
5. Eri Nishiyama and Kazuhiko Ohshima. Cross-Kingdom Commonality of a Novel Insertion Signature of RTE-Related Short Retroposons. *Genome Biol. Evol.* 2018. 10(6):1471–1483. doi:10.1093/gbe/evy098.
6. Hua-Hao Zhang, Cedric Feschotte, Min-Jin Han, and Ze Zhang. Recurrent Horizontal Transfers of Chapaev Transposons in Diverse Invertebrate and Vertebrate Animals. *Genome Biol. Evol.* 2014. 6(6):1375–1386. doi:10.1093/gbe/evu112.
7. Ferrari, R.; Grandi, N.; Tramontano, E.; Dieci, G. Retrotransposons as Drivers of Mammalian Brain Evolution. *Life* 2021, 11, 376. <https://doi.org/10.3390/life11050376>.
8. Bo Xia, Weimin Zhang, Aleksandra Wudzinska, Emily Huang, Ran Brosh, Maayan Pour, Alexander Miller, Jeremy S. Dasen, Matthew T. Maurano,

- Sang Y. Kim, Jef D. Boeke, Itai Yanai. The genetic basis of tail-loss evolution in humans and apes // 2021. DOI: 10.1101/2021.09.14.460388.
9. Ahmed M. Alzohairy, Gábor Gyulai, Mohamed F. Ramadan, Sherif Edris Jamal S. M. Sabir, Robert K. Jansen, Hala F. Eissa and Ahmed Bahieldin Retrotransposon-based molecular markers for assessment genomic diversity Functional Plant Biology, 2014, 41, 781–789 Review <http://dx.doi.org/10.1071/FP13351>.
 10. Ruslan Kalendar, Alexander Muterko, and Svetlana Boronnikova. Retrotransposable Elements: DNA Fingerprinting and the Assessment of Genetic Diversity. Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology, 2021. vol. 2222, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_15.
 11. Capra J.A., Paeschke K., Singh M., Zakian V.A. G-Quadruplex DNA Sequences Are Evolutionarily Conserved and Associated with Distinct Genomic Features in *Saccharomyces cerevisiae* // PLoS Comput Biol. 2010. No. 6(7). P. 1–13. e1000861 doi: 10.1371/journal.pcbi.1000861.
 12. Bohálová, N., Cantara, A., Bartas, M., Kaura, P., Št'astný, J., Pečinka, P., Fojta, M., Brázda, V. Tracing dsDNA Virus–Host Coevolution through Correlation of Their G-Quadruplex-Forming Sequences. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 3433. <https://doi.org/10.3390/ijms22073433>.
 13. Ruggiero, E.; Zanin, I., Terreri, M., Richter, S.N. G-Quadruplex Targeting in the Fight against Viruses: An Update. Int. J. Mol. Sci. 2021, 22, 10984. <https://doi.org/10.3390/ijms222010984>.
 14. Ali A, Han K, Liang P. Role of Transposable Elements in Gene Regulation in the Human Genome. Life (Basel). 2021 Feb 4;11(2):118. doi: 10.3390/life11020118.
 15. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_014441545.1/
 16. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_009819535.1/
 17. <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>.
 18. <https://biopython.org/>.
 19. <https://www.girinst.org/censor/index.php>.
 20. <https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>.
 21. <https://www.mirbase.org/search.shtml>
 22. Marsico G, Chambers VS, Sahakyan AB, McCauley P, Boutell JM, Antonio MD, Balasubramanian S. Whole genome experimental maps of DNA G-quadruplexes in multiple species. Nucleic Acids Res. 2019 May 7;47(8):3862-3874. doi: 10.1093/nar/gkz179.
 23. Chan K.L., Peng B., Umar M.I., Chan C.Y., Sahakyan A.B., Kwok C.K. Structural analysis reveals the formation and role of RNA G-quadruplex structures in human mature microRNAs. Chem Commun (Camb). 2018 Sep 25;54(77):10878-10881. doi: 10.1039/c8cc04635b.
 24. Postepska-Igielska A, Blank-Giwojna A, Grummt I. Analysis of RNA-DNA Triplex Structures In Vitro and In Vivo. Methods Mol Biol. 2020; 2161:229-246. doi: 10.1007/978-1-0716-0680-3_16.
 25. Sahakyan AB, Murat P, Mayer C, Balasubramanian S. G-quadruplex structures within the 3' UTR of LINE-1 elements stimulate retrotransposition. Nat Struct Mol Biol. 2017 Mar;24(3):243-247. doi: 10.1038/nsmb.3367.
 26. Pavlova, A.V.; Kubareva, E.A.; Monakhova, M.V.; Zvereva, M.I.; Dolinnaya, N.G. Impact of G-Quadruplexes on the Regulation of Genome Integrity, DNA Damage and Repair. Biomolecules 2021, 11, 1284. <https://doi.org/10.3390/biom11091284>.
 27. Zybaïlov BL, Sherpa MD, Glazko GV, Raney KD, Glazko VI. [G4-quadruplexes and genome instability]. Mol Biol (Mosk). 2013 Mar-Apr;47(2):224-31. Russian. doi: 10.7868/s0026898413020183.
 28. Glazko, V.I., Kosovsky, G.Y. Structure of genes coding the envelope proteins of the avian influenza a virus and bovine leucosis virus. Russ. Agricult. Sci. 2013. 39, 511–515. <https://doi.org/10.3103/S1068367413060074>.

Информация об авторах:

Блохин Иван Геннадьевич – ассистент кафедры зоологии факультета зоотехнии и биологии РГАУ-МСХА имени К.А. Тимирязева, SPIN-код: 5492-1050, ORCID: 0000-0002-0548-6201, ScopusID: 57223899420, e-mail: blokhin.ivan96@gmail.com.

Глазко Татьяна Теодоровна – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, главный научный сотрудник ФГБНУ НИИПЗК, ORCID – 0000-0002-3879-6935, Author ID – 186988, e-mail: tglazko@rambler.ru

Апашкин Павел Сергеевич – бакалавр 4 курса факультета информационных технологий Московского финансового промышленного университета «Синергия», ORCID: 0000 0002 7351 8279, e-mail: pavel.ap.97@gmail.com.

Глазко Валерий Иванович – доктор сельскохозяйственных наук, профессор, академик РАН (иностраный член), главный научный сотрудник ФГБНУ НИИПЗК, ORCID – 0000-0002-8566-8717, Author ID – 297850, e-mail: vigvalery@gmail.com.

ISSR AND IRAP MARKER POLYMORPHISM ASSOCIATION TO ITS LOCALIZATION FEATURES IN REFERENCE GENOMES OF MAMMALS AND REPTILES

Association of ISSR and IRAP marker polymorphisms with genomic localization features

I.G. Blokhin^{1*}, T.T. Glazko³, P.S. Apashkin², V.I. Glazko³

¹Federal State Budgetary Establishment of Higher Education «Russian State Agrarian University – Moscow Agricultural Academy named after K.A. Timiryazev»

Russia, 127550, Moscow, Timiryazevskaya str., 52,

*e-mail:blokhin.ivan96@gmail.com

²Moscow Financial and Industrial University «Synergy»

Russia, 105318, Moscow, Izmailovsky Val str., ³Federal State Budget Scientific Institute «Scientific Research Institute of Fur-Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding named after V.A. Afanas'ev»,

Russia, 140143, Moscow region, Ramensky district, Rodniki village, Trudovaya str., 6

One of the problems of using DNA markers in population genetic studies is the need to select the most polymorphic systems each time a new group of organisms is studied. In this study, a comparative analysis of the polymorphism of amplification product spectra in different taxa, such as the domestic dog *Canis familiaris* (n=53) and the sand lizard *Lacerta agilis* (n=55) was performed. Microsatellites ((ACC)₆T, (TGC)₆C, (GAG)₆C) and long terminal repeats of endogenous retroviruses (SIRE 1, Sabrina) were used as primers for polymerase chain reaction. Co-localization of primers near nucleotide sequences associated with increased variability (transposons, G4-quadruplexes, microRNAs) was assessed in the corresponding reference genomes using bioinformatic methods. The highest is the frequency of microsatellite (GAG)₆C (37088 in lizard, 16204 in dog), the lowest is the frequency of homology sites to long terminal repeats of two retroviruses – SIRE 1 (17 homology sites in lizard genome, 6 – in dog genome) and Sabrina (21 in lizard, 5 in dog). The highest number of amplicons in lizards was obtained using the Sabrina primer (19); the lowest number was obtained using the (TGC)₆C primer (8). In dogs, the highest number of amplicons was detected in the spectra of primer SIRE 1 (21); the lowest number was obtained using (TGC)₆C (6). In the sand lizard, the maximum number of G4-quadruplexes without overlaps (17) was detected in the DNA flanked by the microsatellite (TGC)₆C with a polymorphism of 87,5%; the largest number of G4-quadruplexes with overlaps (1756) was found in the DNA flanked by the primer (GAG)₆C with the lowest polymorphism (36,4%). In the reference genome of the domestic dog, the highest number of quadruplexes was found in the microsatellite (GAG)₆C spectrum sites (13 with overlaps and 3789 without overlaps) with a polymorphism of 83,0%. Thus, there is an association between the density of G4-quadruplexes and decreased polymorphism of DNA markers.

Keywords: mobile genetic elements, microsatellites, G4 quadruplexes, microRNA, polymorphism.

References

1. Blokhin I.G., Glazko V.I. Genetic and phenotypic characteristics in assessing population differentiation of the sand lizard. South of Russia: Ecology, Development. 2021;16(3):47-58. <https://doi.org/10.18470/1992-1098-2021-3-47-58>.
2. Calendar R.V., Glazko V.I. Types of molecular genetic markers and their application // Physiology and biochemistry of cultivated plants. 2002. T. 34. N 4. C. 279-295.
3. Glazko V.I., Kosovsky G.Y., Blokhina T.V., Esin A.G., Glazko T.T. Genomic “portrait” of some species of canine species obtained by ISSR-PCR and IRAP-PCR markers Rabbit and fur farming. 2020. № 1. C. 28-39.
4. Atma M. Ivancevic, R. Daniel Kortschak, Terry Bertozzi, and David L. Adelson. Horizontal transfer of BovB and L1 retrotransposons in eukaryotes. Genome Biology, 2018. – doi:10.1186/s13059-018-1456-7.
5. Eri Nishiyama and Kazuhiko Ohshima. Cross-Kingdom Commonality of a Novel Insertion Signature of RTE-Related Short Retroposons. Genome Biol. Evol. 10(6):1471–1483. doi:10.1093/gbe/evy098.
6. Hua-Hao Zhang, Cedric Feschotte, Min-Jin Han, and Ze Zhang. Recurrent Horizontal Transfers of Chapaev Transposons in Diverse Invertebrate and Vertebrate Animals. Genome Biol. Evol. 6(6):1375–1386. doi:10.1093/gbe/evu112.
7. Ferrari, R.; Grandi, N.; Tramontano, E.; Dieci, G. Retrotransposons as Drivers of Mammalian Brain Evolution. Life 2021, 11, 376. <https://doi.org/10.3390/life11050376>.
8. Bo Xia, Weimin Zhang, Aleksandra Wudzinska, Emily Huang, Ran Brosh, Maayan Pour, Alexander Miller, Jeremy S. Dasen, Matthew T. Maurano, Sang Y. Kim, Jef D. Boeke, Itai Yanai. The genetic basis of tail-loss evolution in humans and apes // 2021. DOI: 10.1101/2021.09.14.460388.
9. Ahmed M. Alzohairy, Gábor Gyulai, Mohamed F. Ramadan, Sherif Edris Jamal S. M. Sabir, Robert K. Jansen, Hala F. Eissa and Ahmed Bahieldin Retrotransposon-based

- molecular markers for assessment genomic diversity *Functional Plant Biology*, 2014, 41, 781–789 Review <http://dx.doi.org/10.1071/FP13351>.
10. Ruslan Kalendar, Alexander Muterko, and Svetlana Boronnikova. Retrotransposable Elements: DNA Fingerprinting and the Assessment of Genetic Diversity. *Molecular Plant Taxonomy: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, vol. 2222, https://doi.org/10.1007/978-1-0716-0997-2_15, © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021.
 11. Capra J.A., Paeschke K., Singh M., Zakian V.A. G-Quadruplex DNA Sequences Are Evolutionarily Conserved and Associated with Distinct Genomic Features in *Saccharomyces cerevisiae* // *PLoS Comput Biol*. 2010. No. 6(7). P. 1–13. e1000861 doi: 10.1371/journal.pcbi.1000861.
 12. Bohálová, N., Cantara, A., Bartas, M., Kaura, P., Št'astný, J., Pečinka, P., Fojta, M., Brázda, V. Tracing dsDNA Virus–Host Coevolution through Correlation of Their G-Quadruplex-Forming Sequences. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 3433. <https://doi.org/10.3390/ijms22073433>.
 13. Ruggiero, E.; Zanin, I., Terreri, M., Richter, S.N. G-Quadruplex Targeting in the Fight against Viruses: An Update. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 10984. <https://doi.org/10.3390/ijms222010984>.
 14. Ali A, Han K, Liang P. Role of Transposable Elements in Gene Regulation in the Human Genome. *Life (Basel)*. 2021 Feb 4;11(2):118. doi: 10.3390/life11020118.
 15. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_014441545.1/
 16. https://www.ncbi.nlm.nih.gov/data-hub/genome/GCF_009819535.1/
 17. <https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/executables/blast+/LATEST/>.
 18. <https://biopython.org/>.
 19. <https://www.girinst.org/censor/index.php>.
 20. <https://bioinformatics.ramapo.edu/QGRS/analyze.php>.
 21. <https://www.mirbase.org/search.shtml>
 22. Marsico G, Chambers VS, Sahakyan AB, McCauley P, Boutell JM, Antonio MD, Balasubramanian S. Whole genome experimental maps of DNA G-quadruplexes in multiple species. *Nucleic Acids Res.* 2019 May 7;47(8):3862-3874. doi: 10.1093/nar/gkz179.
 23. Chan K.L., Peng B., Umar M.I., Chan C.Y., Sahakyan A.B., Kwok C.K. Structural analysis reveals the formation and role of RNA G-quadruplex structures in human mature microRNAs. *Chem Commun (Camb)*. 2018 Sep 25;54(77):10878-10881. doi: 10.1039/c8cc04635b.
 24. Postepska-Igielska A, Blank-Giwojna A, Grummt I. Analysis of RNA-DNA Triplex Structures In Vitro and In Vivo. *Methods Mol Biol.* 2020;2161:229-246. doi: 10.1007/978-1-0716-0680-3_16.
 25. Sahakyan AB, Murat P, Mayer C, Balasubramanian S. G-quadruplex structures within the 3' UTR of LINE-1 elements stimulate retrotransposition. *Nat Struct Mol Biol.* 2017 Mar;24(3):243-247. doi: 10.1038/nsmb.3367.
 26. Pavlova, A.V.; Kubareva, E.A.; Monakhova, M.V.; Zvereva, M.I.; Dolinnaya, N.G. Impact of G-Quadruplexes on the Regulation of Genome Integrity, DNA Damage and Repair. *Biomolecules* 2021, 11, 1284. <https://doi.org/10.3390/biom11091284>.
 27. Zybaïlov BL, Sherpa MD, Glazko GV, Raney KD, Glazko VI. [G4-quadruplexes and genome instability]. *Mol Biol (Mosk)*. 2013 Mar-Apr;47(2):224-31. Russian. doi: 10.7868/s0026898413020183.
 28. Glazko, V.I., Kosovsky, G.Y. Structure of genes coding the envelope proteins of the avian influenza A virus and bovine leucosis virus. *Russ. Agricult. Sci.* 2013. 39, 511–515. <https://doi.org/10.3103/S1068367413060074>.

Information about the authors:

Blokhin Ivan Gennadevich – Assistant of the Department of Zoology, Faculty of Zootechnics and Biology, Russian State Agricultural University – Moscow Timiryazev Agricultural Academy (RSAU-MTAA), SPIN: 5492-1050, ORCID: 0000-0002-0548-6201,

e-mail: blokhin.ivan96@gmail.com

Glazko Tatiana Theodorovna – Doctor of Agricultural Sciences, professor, chief researcher of Afanas'ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, ORCID – 0000-0002-3879-6935, Author ID – 186988, e-mail: tglazko@rambler.ru

Apashkin Pavel Sergeevich – Bachelor's degree of the 4th year of Informational Technologies Department, Moscow Financial-Industrial University “Synergy”, ORCID: 0000 0002 7351 8279, e-mail: pavel.ap.97@gmail.com

Glazko Valeriy Ivanovich – Doctor of Agricultural Sciences, professor, RAS academician (foreign member), Chief Researcher of Afanas'ev Research Institute of Fur – Bearing Animal Breeding and Rabbit Breeding, ORCID – 0000-0002-8566-8717, Author ID – 297850, e-mail: vigvalery@gmail.com