

САНКТ-ПЕТЕРБУРГСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
КАФЕДРА ГЕНЕТИКИ И БИОТЕХНОЛОГИИ

Васильев Артем Викторович
Выпускная квалификационная работа

“Эволюционные особенности структуры гена
Nxf1 (nuclear export factor) у животных“

Научный руководитель:
к.б.н., доцент, кафедра генетики и биотехнологии,
Голубкова Елена Валерьевна

Рецензент:
заведующая лабораторией, ведущий научный сотрудник,
лаборатория эволюционной геномики и палеогеномики, ЗИН,
к.б.н., с.н.с.,
Абрамсон Наталья Иосифовна

Санкт-Петербург
2025

Оглавление

Введение

Для большинства генов высших эукариот характерна мозаичная структура, в составе которой выделяют кодирующие участки экзоны и некодирующие - интроны. В процессе созревания транскрипта интроны, как правило, вырезаются сплайсингом, и из ядра выходят мРНК, лишенные интронных последовательностей. Однако альтернативный сплайсинг позволяет получать несколько различных зрелых мРНК из одной пре-мРНК, что значительно расширяет протеом без увеличения числа генов.

Особый интерес представляют транскрипты, сохраняющие интрон (intron retention (IR)): в таких первичных транскриптах интрон, обычно несущий преждевременный стоп-кодон, остается невырезанным, образуя устойчивую вторичную структуру, которая препятствует распознаванию факторами нонсенс-опосредованного распада (NMD) и впоследствии обеспечивает синтез укороченного, но функционально значимого белка [1].

Однако, несмотря на наличие специфического механизма, среди различных групп, эволюционно далеких друг от друга, описаны случаи существования транскриптов с сохраненным интроном. Отдельно можно выделить модельный объект *Drosophila melanogaster* и человека, для которых известно семейство генов *Nxf* (nuclear export factor), в котором нас заинтересовал ген *Nxf1*. Данный ген кодирует белок, являющийся основным транспортером мРНК из ядра в цитоплазму.

У гена *Nxf1* (nuclear export factor 1), кодирующего основной транспортер мРНК из ядра в цитоплазму, существует так называемая “консервативная кассета”, которая включает два коротких экзона (110 и 37 нуклеотидов в каноническом варианте) и “кассетный” интрон между ними. Названия сформулированы нашей научной группой. Эта структура сохраняется также и у представителей других филогенетических групп: благодаря образованию специфической вторичной структуры или наличию в последовательности интрона специфических последовательностей, например конститутивного транспортного элемента (СТЕ), транскрипт, содержащий преждевременный стоп-кодон, избегает NMD и кодирует укороченную форму белка.

Анализ подобных транскриптов показал, что консервативные элементы “кассеты” *Nxf1* специфичны для разных клад организмов, а интрон-содержащие транскрипты формируют уникальные вторичные структуры, что подчеркивает эволюционную и функциональную значимость интронов.

Научная новизна работы заключается в сравнительном анализе структуры гена *Nxf1* у представителей различных филогенетических групп, данных по которым ранее не было, с целью выявления закономерностей эволюции нуклеотидной и белковой последовательности гена *Nxf1*. В бакалаврской работе было показано, что “консервативная кассета” сохраняет свойства внутри артропод, особенно внутри семейства *Drosophilidae*, однако вопрос о степени консервативности и специфике структурных элементов у более широкого круга организмов остается открытым. Помимо сравнительного анализа последовательностей, важной частью исследования является по-

строение вторичных структур интрон-содержащих транскриптов и выявление консервативных мотивов внутри интрона, способствующих его сохранению и избеганию нонсенс-опосредованного распада.

Цель работы

Изучить структуру гена *Nxf1* у представителей разных филогенетических групп животных для выявления эволюционных закономерностей и особенностей “кассетной” структуры, а также проанализировать вторичные структуры интрон-содержащих транскриптов.

Задачи

1. Найти нуклеотидные и аминокислотные последовательности гена *Nxf1* у различных групп животных.
2. Произвести поиск “консервативной кассеты” в нуклеотидной последовательности гена у найденных организмов.
3. Выполнить анализ структуры, сравнить полученные последовательности между собой.
4. Выявить и охарактеризовать консервативные участки “кассетного” интрона и прилегающих экзонов у видов из исследуемых таксонов.
5. Провести анализ вторичной структуры интрон-содержащих транскриптов и оценить консервативные мотивы внутри интрона, потенциально способствующие его сохранению.

Обзор литературы

Механизмы усложнения организации генома

Увеличение разнообразия транскриптома и протеома у эукариот во многом достигается не только за счет классического эксцизионного сплайсинга, но и за счет ряда альтернативных механизмов обработки пре-мРНК. В частности, альтернативный сплайсинг позволяет из одного транскрипта формировать несколько зрелых мРНК, отличающихся включением или исключением отдельных экзонов и участков [1, 2].

Одним из ключевых вариантов такого процесса является удержание интронов (intron retention, IR), когда интрон не удаляется и остается в составе зрелой мРНК. Часто подобное сохранение интрона приводит к появлению в получившемся транскрипте преждевременных стоп-кодонов (РТС), что запускает нонсенс-опосредованный распад (NMD). Тем не менее в ряде случаев внутри интрона могут находиться определенные последовательности (например, СТЕ) или может формироваться устойчивая вторичная структура, препятствующая связыванию факторов NMD и позволяющая таким транскриптам не подвергаться деградации, а кодировать укороченные, но функционально активные белки [3–5].

Кроме IR, альтернативный сплайсинг включает пропуск экзонов, использование альтернативных сайтов на 5'- и 3'-концах и кассетное включение/исключение блоков экзонов. В совокупности эти механизмы значительно расширяют репертуар возможных транскриптов без необходимости увеличения числа генов. Например, у многих многоклеточных организмов до 95% генов подвергаются хотя бы одному типу альтернативного сплайсинга [1]. Для разных организмов продемонстрирована консервативность наличия транскрипта с сохраненным интроном, что подчеркивает эволюционную значимость интронов [3].

Таким образом, именно через комбинирование альтернативных способов сплайсинга, особенно удержания интронов, эукариоты получают мощный инструмент транскрипционной и белковой вариативности, что способствует адаптации и усложнению биологических процессов.

Значимость интронов

Традиционно интроны воспринимались лишь как “ненужные” вставки, но современные исследования убедительно показывают, что их функции выходят далеко за рамки простой “пустоты”. Во-первых, наличие интронных последовательностей может значительно усиливать уровень экспрессии генов. Эксперименты на клеточных системах SV40, дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* и млекопитающих демонстрируют, что удаление ключевых интронов приводит к резкому снижению эффективности транскрипции и трансляции [2, 6].

Во-вторых, интроны влияют на чувствительность мРНК к нонсенс-опосредованному распаду. Если интрон попадает в 5'- или 3'-UTR, его присутствие может менять архитектуру сплайсосомного комплекса, корректируя доступность РТС и, соответ-

ственно, баланс между сохранением транскрипта и его деградацией через NMD [4, 5].

Третья важная роль интронов заключается в транспорте мРНК из ядра в цитоплазму. Долгое время считалось, что только полностью сплайсированные транскрипты эффективно экспортируются, однако при помощи FISH было показано, что РНК с сохраненными интронами также могут накапливаться в цитоплазме и функционировать там [4, 7]. Это потребовало пересмотра классических представлений об экспорте мРНК.

Кроме регуляции экспрессии и транспорта, интроны участвуют в организации хроматиновой структуры. Концевые последовательности интронов образуют участки с пониженной плотностью нуклеосом, что способствует более четкому разделению экзонов и облегчает процесс транскрипции [8].

Наконец, интроны могут выполнять таксон- и тканеспецифические функции. Так, первый интрон гена *oskar* у *Drosophila* участвует в локализации мРНК в ооците, а длинные интронные вставки могут снижать “интерференцию Хилла–Робертсона”, улучшая кроссинговер в определенных регионах генома [9]. Результаты GWAS показывают, что однонуклеотидные варианты (SNV) в интронных областях часто связаны с предрасположенностью к различным заболеваниям человека [10].

Таким образом, интроны выполняют сложные регуляторные функции — от контроля уровня экспрессии до обеспечения оптимальной архитектуры хроматина и тканеспецифической регуляции транскриптов.

Семейство генов *Nxf*

Гены *Nxf* (nuclear export factor) названы по функции их наиболее известного представителя — *Nxf1*, который обеспечивает экспорт большинства мРНК из ядра в цитоплазму. Распространение этих генов наблюдается у всех эукариот группы Opisthokonta, однако их число и структурные особенности заметно различаются между таксонами. У грибов обычно присутствует единственная копия *Nxf*, тогда как в геномах растений и некоторых протистов такие гены могут отсутствовать полностью. У животных же часто встречается от двух до пяти паралогов, что свидетельствует об активных дупликационных процессах в эволюции этого семейства [3].

Важнейшим элементом всех генов *Nxf* является “кассетный” интрон, расположенный между двумя небольшими экзонами (110 и 37 нуклеотидов в каноническом варианте). При альтернативном сплайсинге этот интрон может сохраняться в зрелой мРНК, неся внутри себя преждевременный стоп-кодон, возникающий за счет особенностей размеров упомянутых ранее экзонов. Однако за счет формирования в интроне устойчивой вторичной структуры или наличия определенных транспортных последовательностей, как у млекопитающих, транскрипты избегают NMD и кодируют укороченные, но функционально активные белки [3, 11].

Эволюционные вариации семейства *Nxf* можно разделить на 3 основные группы:

- **Позвоночные.** У генов *Nxf1* интрон располагается между 10-м и 11-м экзонами. Вставка содержит несколько консервативных мотивов, включая фрагмент, похожий на СТЕ (constitutive transport element), необходимый для экспорта частично сплайсированных РНК.
- **Дрозофилиды.** У представителей данного семейства кассетный интрон локализуется между 5-м и 6-м экзонами. В нем отсутствуют длинные гомологичные вставки, но присутствуют два тракта, обогащенные аденином (А) и формирующие прочную вторичную структуру, которая защищает транскрипт от деградации в ядре [3, 12].
- **Нематоды.** У нематод интрон тоже располагается между 5-м и 6-м экзонами, но он гораздо короче и богат тиминном (Т). Консервативные гомологи в таком интроне практически отсутствуют.

Эти различия отражают долгую эволюцию семейства *Nxf*: от сравнительно простой короткой вставки у нематод до сложных СТЕ-подобных мотивов у позвоночных, подчеркивая ключевую роль кассетного интрона в посттранскрипционной регуляции [3, 11].

Структура и функции Nxf1 (гена и белка)

Первоначально ген *Nxf1* (известный как ТАР у человека) был охарактеризован как ко-фактор белка Тір герпеса saimiri, отвечающий за экспорт несплайсированных и частично сплайсированных ретровирусных мРНК путем распознавания СТЕ-структуры в их последовательностях [13]. У дрозофил этот ген также называют *sbr*. Белок Nxf1 включает несколько функциональных доменов: RBD (домен связывания РНК), четыре лейцин-обогащенных повтора (LRR), NTF2-подобный домен, UBA-подобный домен и сигналы ядерной локализации (NLS) в нетранслируемой области до экзонов. В совокупности эти домены обеспечивают узнавание мРНК и взаимодействие с компонентами ядерного порового комплекса, делая *Nxf1* основным экспортером мРНК [3, 14].

Кассетный интрон, встроенный между сегментами RBD+LRR и NTF2L+UBA, выступает в роли “переключателя”. При его сохранении происходит синтез укороченных вариаций белка, обладающих специфической активностью [3, 14].

Кроме классического транспорта мРНК, у *Drosophila melanogaster* *sbr* выполняет органо- и тканеспецифические функции. В сперматогенных клетках ген продуцирует укороченную форму *sbr*, необходимую для нормального сперматогенеза: без нее наблюдается резкое снижение фертильности [15]. В центральной нервной системе *sbr* участвует в формировании границ между областями мозгового вещества зрительной системы, локализуясь в специфических нейронах и глиальных клетках и регулируя их ядерно-цитоплазматические комплексы [16].

Аналогичные эволюционно значимые особенности кассетного интрона отмечены у Chiroptera (Летучие мыши). Сравнительный анализ показал, что во многих видах этих млекопитающих в интроне *Nxf1* появлялись новые вторичные структуры, связанные с тканеспецифической регуляцией экспрессии, что свидетельствует об адаптивной роли этой вставки [17].

Также в моей бакалаврской работе было показано, что структура “консервативной кассеты” является специфической для таксонов более низкого ранга у всех взятых в анализ артропод (89 видов), а интрон-содержащие транскрипты проанализированных дрозофилид (37 видов) формируют специфические вторичные структуры, имеющие А-обогащенные участки.

Таким образом, Nxf1 представляет собой пример многофункционального белка, чья доменная организация и альтернативные формы позволяют выполнять как основную задачу — экспорт мРНК, так и специализированные функции в разных тканях у разных таксонов.

Материалы и методы

В качестве отправной точки был произведен поиск гена *Nxf1* внутри веб-сервиса NCBI [18]. Полученные данные были сохранены в текстовом формате и загружены в виде tsv-таблицы с помощью пакета pandas v2.2.3 [19] для языка программирования Python v3.12.6 [20]. Всего был найден 651 организм, содержащий анализируемый ген, большинство из которых относятся к Deuterostomia (Вторичноротые) - 436 видов. Таким образом, в качестве материалов выступали нуклеотидные и белковые последовательности гена *Nxf1* из открытых баз данных NCBI [18].

Большинство этапов последующего анализа реализовано в виде отдельных скриптов, разработанных в рамках данной работы, если не указано другое. Для логического разделения на блоки был использован Jupyter Notebook v1.1.1 [21].

По данным из полученной таблицы в разведывательных целях было построено филогенетическое дерево по найденным видам для оценки количества видов в таксонах более низкого ранга. Для глубокого анализа было принято решение сфокусироваться на организмах, относящихся к группе Protostomia (Первичноротые), Cnidaria (Стрекающие), а также на всех группах из Deuterostomia за исключением Mammalia (Млекопитающие).

Для найденных организмов с помощью пакета NCBI E-utilities из BioPython v1.85 [22] и NCBI Datasets Command-Line Interface (CLI) v18.0.2 [23] были загружены нуклеотидные последовательности гена, кодирующих участков и мРНК, а также аминокислотные последовательности белка в формате FASTA и аннотации для гена в GenBank-формате, необходимые для получения нуклеотидных последовательностей экзонов и поиска “консервативной кассеты”. Затем были получены и проанализированы интересующие нас участки экзон-интрон-экзонной структуры и созданы файлы со всеми экзонами и “кассетным” интроном для всех организмов, у которых получилось найти “кассету”. Данные файлы будут необходимы для последующего анализа.

Учитывая очень маленькие выборки во многих анализируемых группах (например, Cnidaria - 4 вида, Spiralia - 9 видов), было принято решение по увеличению их количества. Для этой цели, учитывая разнообразия полученных генов даже внутри одной таксономической группы, самым эффективным вариантом оказалось использование PSI-BLAST [24]. В качестве запроса (Query), или референса, использовались белковые последовательности тех организмов, у которых была найдена “кассета”. Для проведения PSI-BLAST были выбраны настройки по-умолчанию за исключением параметра Organism: поиск проводился внутри таксономической группы, к которой принадлежал референс, также референс был исключен из поиска.

Парсинг результатов BLAST также осуществлялся с помощью пакета BioPython [22] и специально разработанных скриптов. Он включал в себя фильтрацию данных по параметрам процента покрытия (Query Coverage, QC), длине и сходству (Per. Ident) найденных последовательностей (Subject), а также загрузку нуклеотидных и белковых последовательностей, однако реализация отличалась из-за особенностей баз

данных NCBI [18]. Получение “кассеты” было произведено по тому же принципу, но, опять же, с отличиями. Благодаря данному шагу удалось увеличить выборки суммарно на 117 видов. К сожалению, для некоторых таксономических групп увеличение выборки оказалось невозможным в связи с отсутствием у некоторых организмов интересующего нас участка.

Множественные выравнивания осуществлялись с помощью алгоритма MAFFT [25], 10 итераций, остальные настройки по-умолчанию, в программе Unipro UGENE v52.0 [26].

Анализ видов из *Deuterostomia* изначально шел более благоприятно за счет большого сходства последовательностей, в том числе интронных, и большего количества видов в группах. Для них также были загружены все необходимые файлы и произведен поиск и анализ “консервативной кассеты”. Мы решили сосредоточить свое внимание на организмах из *Actinopterygii* (Лучеперые рыбы), 72 вида, так как данных по ним ранее получено не было. Учитывая большую степень сходства интронных последовательностей, с помощью пакета инструментов MEME Suite v5.5.8 [27] локально был произведен поиск консервативных мотивов внутри “кассетного” интрона. Найденные мотивы, у которых E-value < 0.05 также локально были проанализированы с помощью Tomtom [28] из того же пакета. Для описанного шага была взята база данных JASPAR2024 CORE (NON-REDUNDANT) DNA.

С помощью инструмента RNAfold v2.7.0 из пакета ViennaRNA [29] были построены вторичные структуры РНК для нуклеотидных последовательностей в двух вариантах (MFE и Centroid), содержащих экзоны и “кассетный” интрон, т.к. мы предполагаем, что избегание интроном сплайсинга может быть опосредовано образованной им специфической вторичной структурой. Учитывая данное предположение, разумным шагом также являлся анализ “силы сайтов сплайсинга”, проведенный с помощью MaxEntScan [30]. Также с помощью скриптов цветом были выделены интронные последовательности внутри вторичной структуры и найденный мотив у *Actinopterygii*, который предположительно является CTE (Constitutive Transport Element).

Для *Actinopterygii* также был проведен филогенетический анализ, включающий построение и визуализацию деревьев. Для данной цели использовались самые популярные и проверенные временем инструменты. Построение деревьев осуществлялось с помощью IQ-TREE v2.4.0 [31], визуализация - с помощью Figtree v1.4.4 [32].

Работа проводилась в виртуальном окружении Mamba v1.5.5 [33], использованные пакеты и примеры анализа в Jupyter Notebooks можно найти в GitHub [34] репозитории автора: <https://github.com/ArtemVaska/Diploma>.

Для написания ВКР была использована система верстки LaTeX v4.76 [35], таблицы генерировались в веб-сервисе TablesGenerator [36]. Большинство картинок создано с помощью веб-сервиса draw.io [37]. Все шаги анализа проводились на базе операционной системы Linux Ubuntu 22.04 [38].

Результаты

Анализ всех найденных видов

Были проанализированы 413 нуклеотидных и белковых последовательностей гена *Nxf1* у представителей различных филогенетических групп из клад Cnidaria (Стрекающие) и Bilateria (Двусторонне-симметричные). Организмы, относящиеся к Mammalia, в анализ не были взяты в связи с уже имеющимися для них данными.

Для таксономических групп более низкого ранга с небольшим количеством видов в них с помощью PSI-BLAST были увеличены выборки, где это оказалось возможным, результат продемонстрирован на таблице ??.

Таблица 1: Результат увеличения выборки с помощью PSI-BLAST.

Филогенетическая группа	Таксон высокого ранга	Видов до PSI-BLAST	Видов добавлено	Итого видов
Bilateria→Protostomia	Ecdysozoa	56	42	98
	Spiralia	6	63	69
Cnidaria	Anthozoa	2	12	14

В итоге для 353 видов удалось найти “консервативную кассету” и продолжить дальнейший анализ.

На рисунке ?? отображено распределение исследованных видов по таксонам высокого ранга.

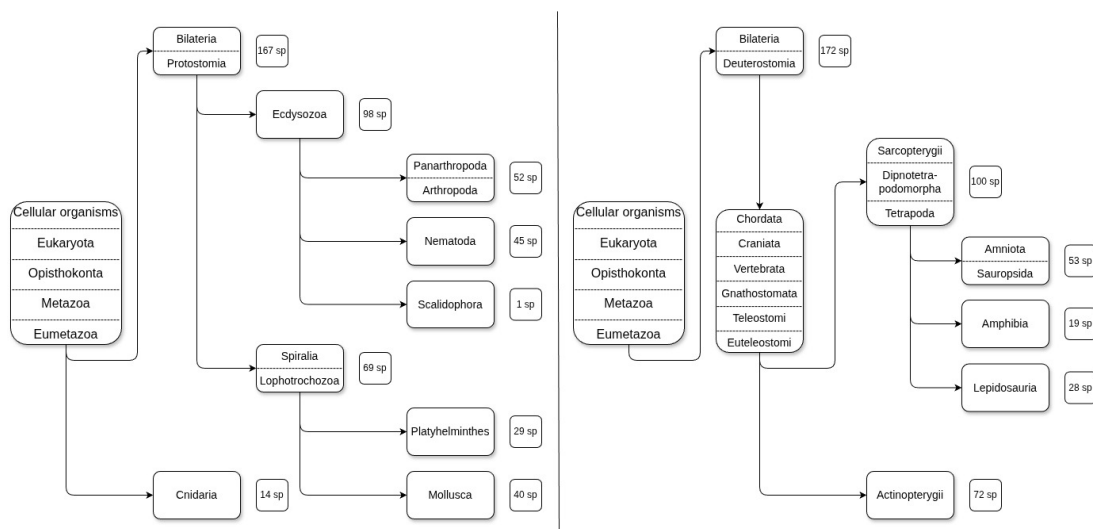


Рис. 1: Количество видов, взятых в анализ, для разных таксономических групп.

Для всех видов, имеющих “консервативную кассету”, были построены вторичные структуры для интрон-содержащего транскрипта с выделением цветом “кассетного” интрона (предоставляется по запросу).

Подробный анализ Actinopterygii

Для таксономической группы Actinopterygii проводился более углубленный анализ, так как на текущий момент данных по гену *Nxf1* для них не было. Были взяты все найденные нуклеотидные последовательности гена у представителя данной филогенетической группы - 72 вида.

На таблице ?? показана характеристика “консервативной кассеты” исследуемой группы. Результаты по другим группам можно найти в приложении, таблицы ??-??.

Таблица 2: Сводная таблица с характеристикой кассетного интрона для таксономической группы Actinopterygii. Сортировка по возрастанию количества нуклеотидов до стоп-кодона в “кассетном” интроне.

Название организма	Кол-во нуклеотидов до стоп-кодона в интроне	Длина 1-го экзона в кассете	Длина кассетного интрона	Длина 2-го экзона в кассете
<i>Chanos chanos</i>	1	110	3568	37
<i>Danio rerio</i>	1	110	3580	37
<i>Denticeps clupeioides</i>	7	110	2629	37
<i>Labrus bergylta</i>	10	110	2684	37
<i>Cottoperca gobio</i>	16	110	2388	37
<i>Xiphophorus couchianus</i>	22	110	2227	37
<i>Larimichthys crocea</i>	22	110	2340	37
<i>Lates calcarifer</i>	22	110	2434	37
<i>Notothenia coriiceps</i>	22	110	2886	37
<i>Betta splendens</i>	22	110	2274	37
<i>Poecilia reticulata</i>	22	110	2262	37
<i>Takifugu rubripes</i>	22	110	2114	37
<i>Salarias fasciatus</i>	22	110	3855	37
<i>Poecilia mexicana</i>	22	110	2247	37
<i>Stegastes partitus</i>	22	110	2900	37
<i>Clupea harengus</i>	22	110	3219	37
<i>Archocentrus centrarchus</i>	22	110	2644	37
<i>Esox lucius</i>	22	110	2848	37
<i>Monopterus albus</i>	22	110	2353	37
<i>Echeneis naucrates</i>	22	110	2314	37
<i>Paralichthys olivaceus</i>	22	110	3148	37
<i>Maylandia zebra</i>	22	110	2565	37
<i>Parambassis ranga</i>	22	110	2484	37
<i>Sander lucioperca</i>	22	110	2494	37
<i>Xiphophorus maculatus</i>	22	110	2231	37
<i>Nothobranchius furzeri</i>	22	110	2290	37
<i>Anabas testudineus</i>	22	110	2352	37
<i>Acanthochromis polyacanthus</i>	22	110	2797	37
<i>Anarrhichthys ocellatus</i>	22	110	2355	37
<i>Boleophthalmus pectinirostris</i>	22	110	1702	37
<i>Sparus aurata</i>	22	110	2361	37
<i>Oryzias melastigma</i>	22	110	2212	37
<i>Seriola dumerili</i>	22	110	2494	37
<i>Poecilia formosa</i>	22	110	2259	37
<i>Oreochromis niloticus</i>	22	110	2580	37
<i>Kryptolebias marmoratus</i>	22	110	2556	37
<i>Xiphophorus hellerii</i>	22	110	2240	37
<i>Poecilia latipinna</i>	22	110	2261	37
<i>Pundamilia nyererei</i>	22	110	2527	37

<i>Hippocampus comes</i>	22	110	2622	37
<i>Oreochromis aureus</i>	22	110	2579	37
<i>Amphiprion ocellaris</i>	22	110	2752	37
<i>Seriola lalandi dorsalis</i>	22	110	2481	37
<i>Austrofundulus limnaeus</i>	22	110	2541	37
<i>Puntigrus tetrazona</i>	25	110	2440	37
<i>Fundulus heteroclitus</i>	25	110	2476	37
<i>Cyprinodon variegatus</i>	28	110	2533	37
<i>Haplochromis burtoni</i>	31	110	2535	37
<i>Astatotilapia calliptera</i>	31	110	2571	37
<i>Gouania willdenowi</i>	37	110	2616	37
<i>Oryzias latipes</i>	40	110	2331	37
<i>Sphaeramia orbicularis</i>	43	110	2376	37
<i>Pygocentrus nattereri</i>	46	110	2649	37
<i>Astyanax mexicanus</i>	46	110	2791	37
<i>Colossoma macropomum</i>	46	110	2644	37
<i>Ictalurus punctatus</i>	46	110	3166	37
<i>Tachysurus fulvidraco</i>	46	110	3493	37
<i>Pangasianodon hypophthalmus</i>	46	110	3348	37
<i>Erpetoichthys calabaricus</i>	55	110	3662	37
<i>Perca flavescens</i>	58	110	2378	37
<i>Mastacembelus armatus</i>	64	110	2371	37
<i>Salmo salar</i>	67	110	3553	37
<i>Gadus morhua</i>	67	110	3151	37
<i>Etheostoma spectabile</i>	97	110	2457	37
<i>Scleropages formosus</i>	112	110	3412	37
<i>Myripristis murdjan</i>	112	110	2492	37
<i>Paramormyrops kingsleyae</i>	121	110	2929	37
<i>Carassius auratus</i>	148	110	3854	37
<i>Sinocyclocheilus grahami</i>	148	110	3330	37
<i>Sinocyclocheilus rhinoceros</i>	154	110	3449	37
<i>Sinocyclocheilus anshuiensis</i>	154	110	4202	37
<i>Electrophorus electricus</i>	283	110	2874	37

На рисунках ?? и ?? показано распределение длин части “кассетного” интрона до стоп-кодона и длин “кассетного” интрона, соответственно.

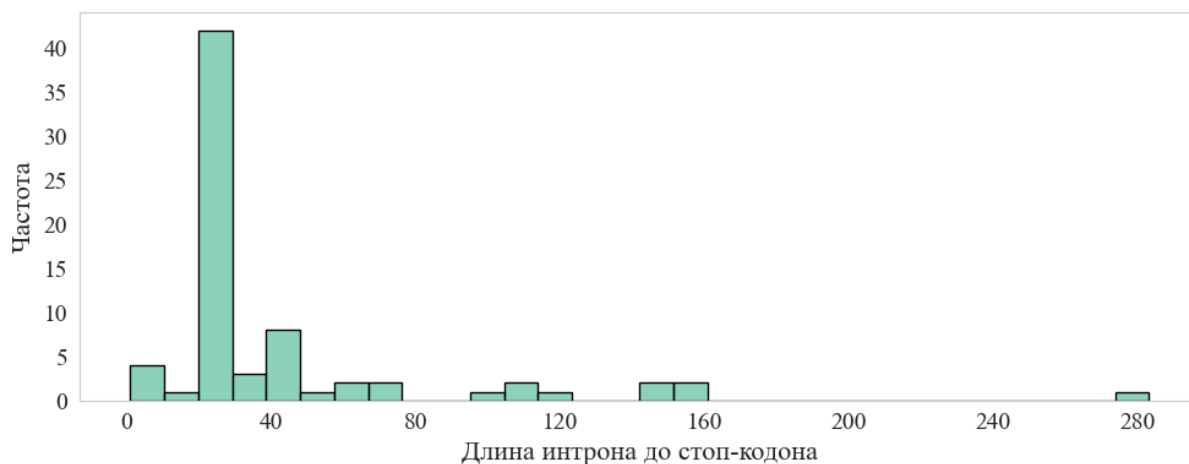


Рис. 2: Распределение длин части кассетного интрона до стоп-кодона у таксономической группы Actinopterygii

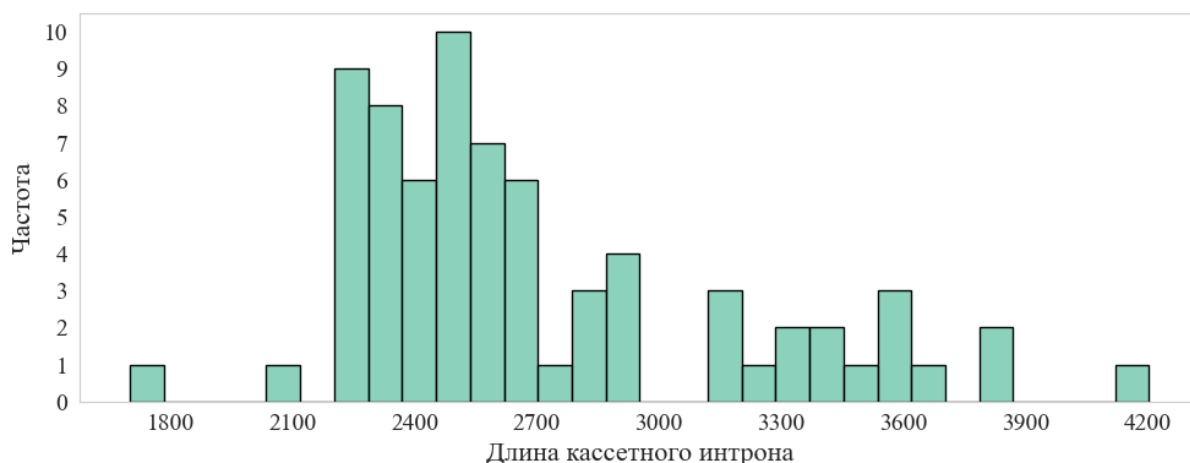


Рис. 3: Распределение длин кассетного интрона у таксономической группы Actinopterygii

На картинке ?? представлены результаты оценки “силы сайтов сплайсинга” - “ящички с усами”, отображающие распределение MaxEntScan score для таксонов более низкого ранга внутри группы Actinopterygii. Разбиение на подгруппы основано на их удаленности друг от друга. Порядок групп на графике не несет смысловой нагрузки.

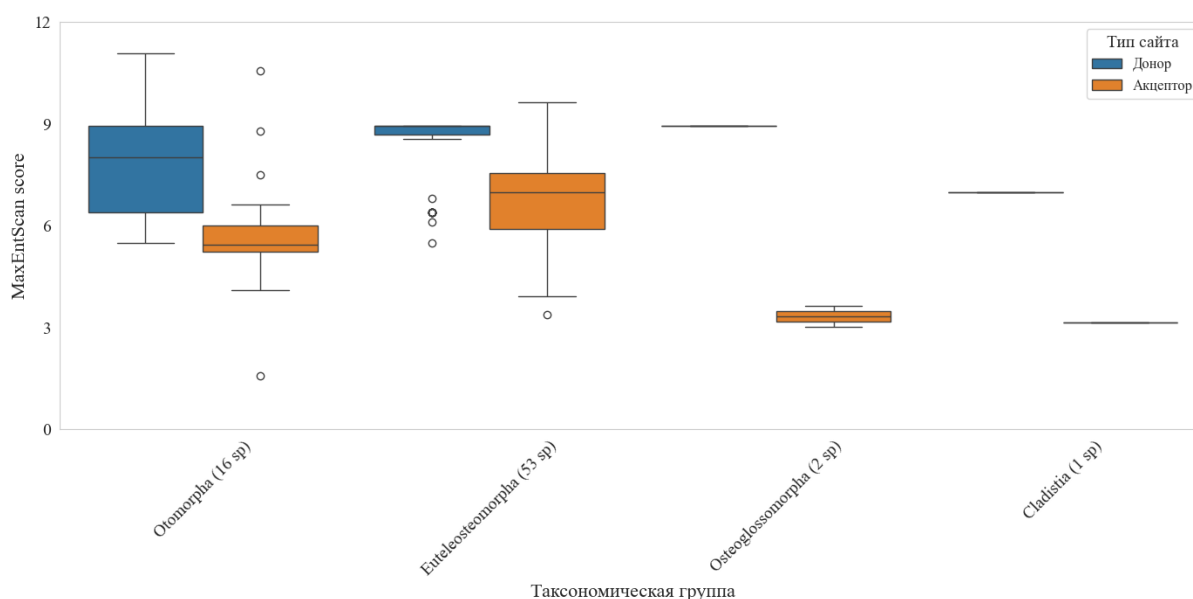


Рис. 4: Результаты проведения MaxEntScan для Actinopterygii.

Рисунок ?? демонстрирует результаты, полученные с помощью MEME Suite.

Найденные мотивы присутствуют не у всех видов, взятых в анализ изначально, их количество отображено в столбце Sites. Нас заинтересовал 2-й найденный мотив, так как его начало очень похоже на предложенную авторами статьи 2001 года [39] консенсусную последовательность для СТЕ из рисунка ??.

К сожалению, использование Tomtom для поиска найденных консервативных мотивов из “кассетного” интрона в базе данных мотивов не дало статистически значимых результатов.

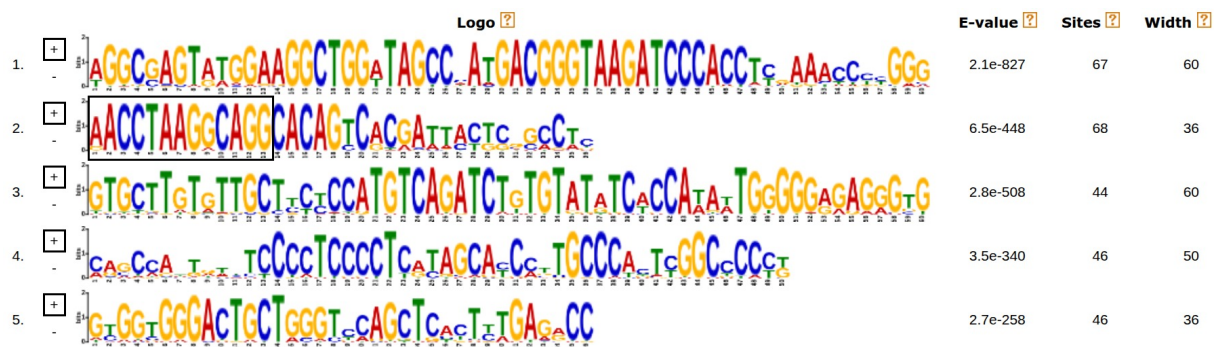


Рис. 5: Результат поиска мотивов внутри кассетного интрона с помощью MEME Suite для таксономической группы Actinopterygii.

Черным прямоугольником выделен участок, похожий на консенсусную последовательность СТЕ (рис. ??) из статьи 2001 года [39].

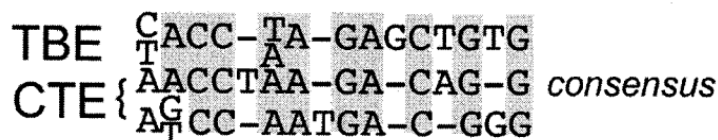


Рис. 6: Консенсусный конститутивный транспортный элемент [39].

Репрезентация вторичной структуры интрон-содержащего транскрипта с выделенным кассетным интроном и найденным мотивом показана на рисунке ???. Вид для демонстрации был выбран случайно.

Учитывая тот факт, что мотив с интересующим нас участком, был найден у 68 видов, именно для них был проведен последующий анализ.

Рисунок ?? отображает результаты множественного выравнивания, а на рисунке ?? представлено филогенетическое дерево, построенное по результатам этого выравнивания.

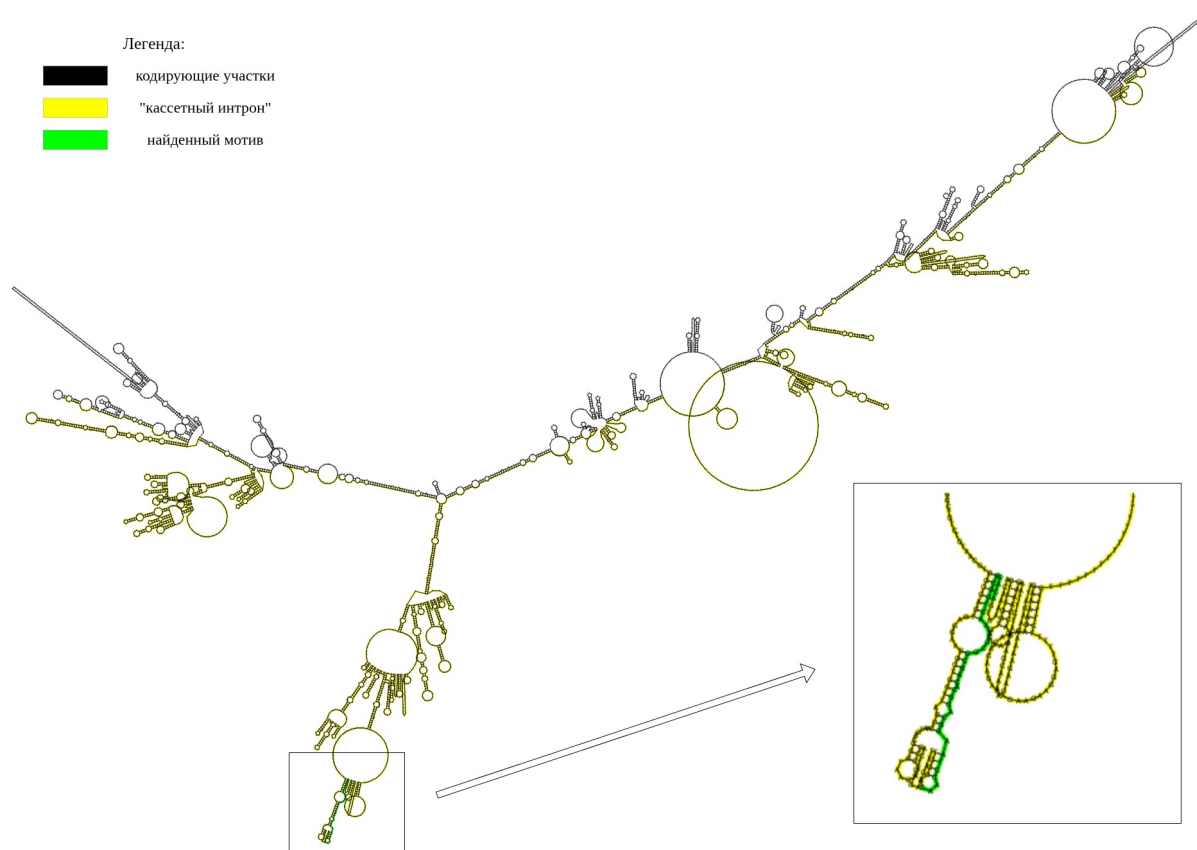


Рис. 7: Вторичная структура РНК-транскрипта для *Chanos chanos* из Otomorpha, содержащая кассетный интрон.



Рис. 8: Результаты множественного выравнивания для Actinopterygii.

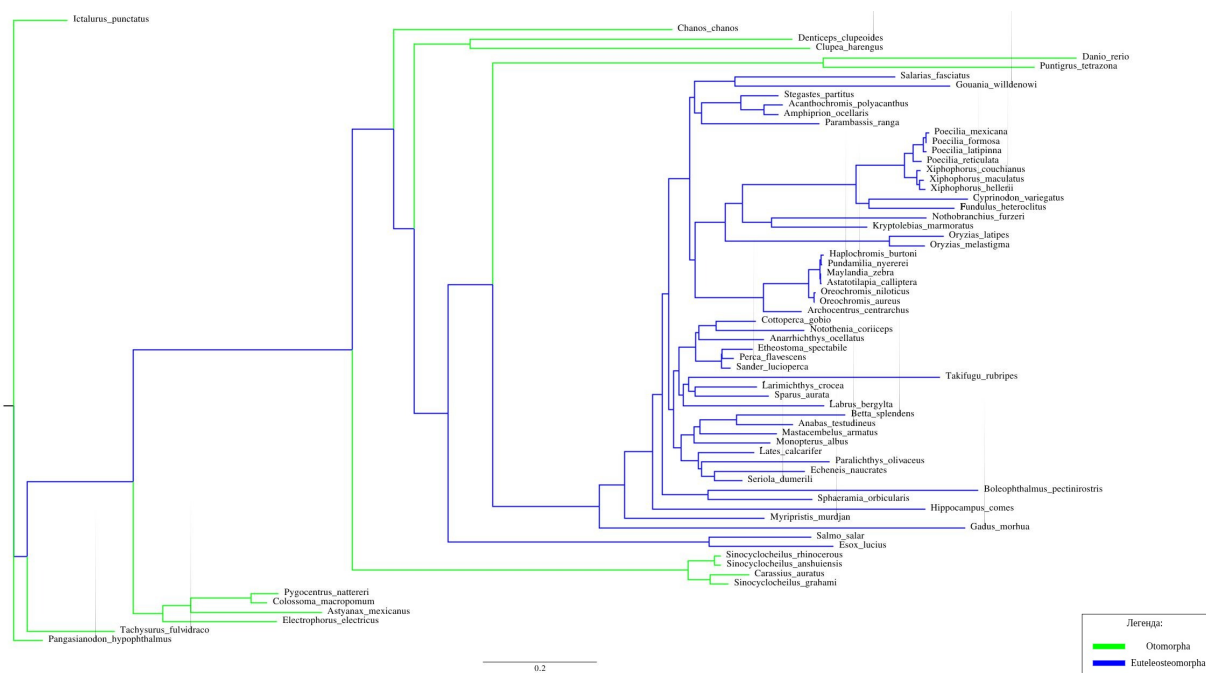


Рис. 9: Филогенетическое дерево для таксономической группы Actinopterygii.

Обсуждение

Анализ всех найденных видов

У всех проанализированных видов размер второго экзона из “консервативной кассеты” равен 37 нуклеотидам, в то время как размер первого экзона варьирует в различных группах. На рисунке ?? показано распределение длины первого экзона из “кассеты” для Protostomia.

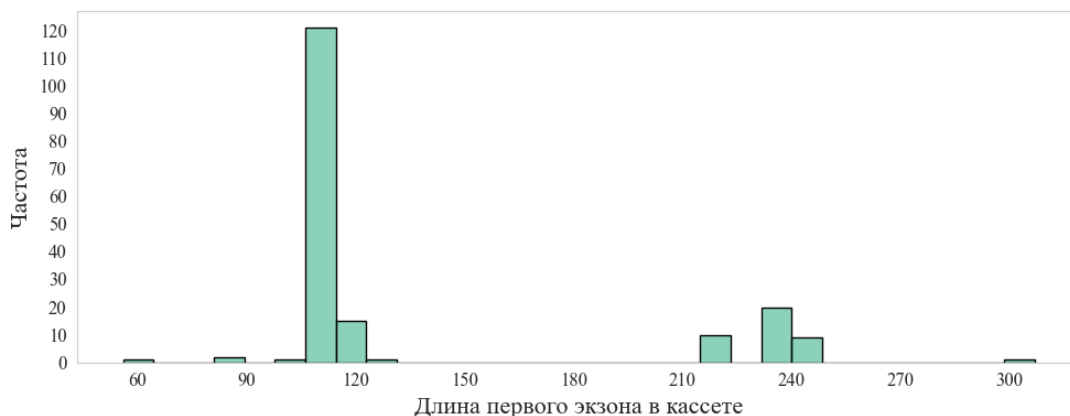


Рис. 10: Распределение длины первого экзона из “консервативной кассеты” для Protostomia.

Для Ecdysozoa и Cnidaria первый экзон как правило размером 110 нуклеотидов, но встречаются и исключения. У Spiralia размер этого экзона гораздо больше и чаще всего составляет 239 нуклеотидов. По данному отличию и встречающимся уникальным вариантам размера экзона требуется углубленное исследование.

У Deuterostomia размер первого экзона в абсолютном большинстве случаев (171 из 172 исследованных видов) составляет 110 нуклеотидов, что также характерно и для млекопитающих.

Длина участка внутри интрона до стоп-кодона, как и длина самого интрона, варьирует в более широких пределах в разных группах. Тем не менее внутри отдельных групп, например Lepidosauria (таблица ?? в приложении), наблюдается высокая степень консервативности обоих параметров.

Также встречаются виды, у которых происходит частичная или даже полная трансляция “кассетного” интрона, потому что в нем не встречается преждевременный стоп-кодон. Например, таким видом является давно известный *Caenorhabditis elegans*, у которого преждевременный стоп-кодон встречается в одном из экзонов после “кассетного” интрона. В данном исследовании были найдены еще 2 вида, у которых интрон полностью считывается: Aves - *Vidua chalybeata*, Paraneoptera - *Rhopalosiphum maidis*. Упомянутые виды также требуют тщательного изучения.

Подробный анализ *Actinopterygii*

Данная группа организмов была исследована более подробно по перечисленным ранее причинам. Внутри группы размеры первого и второго экзона из “консервативной кассеты” для всех исследованных видов составляют 110 и 37 нуклеотидов, соответственно. Длина участка внутри интрона до стоп-кодона у большинства видов составляет 22 нуклеотида (39 из 72 исследованных в работе). Размер “кассетного” интрона варьирует от 1702 до 4202 нуклеотидов (в среднем 2705).

Анализ “сайтов силы сплайсинга” ?? говорит о том, что практически у всех видов данный интрон успешно вырезается сплайсосомой. Учитывая большую выборку видов, взятую для анализа, было принято решение ориентироваться на эмпирическую интерпретацию результатов, которая выглядит следующим образом:

- 0–3: слабый сайт сплайсинга
- 3–6: умеренный сайт сплайсинга
- >6: сильный сайт сплайсинга

Так как у большинства видов значение MaxEntScan score больше или около 6, был сделан вывод, высказанный выше. Соответственно, невырезание сплайсосомой как минимум у данной группы не является причиной альтернативного сплайсинга с сохранением “кассетного” интрона.

В связи с этим и было принято решение о поиске консервативных мотивов внутри “кассетного” интрона. Несмотря на то, что на рисунке ?? представлено 5 найденных мотивов, их количество может быть больше, потому что данное значение мотивов было ограничением запуска MEME Suite. Учитывая высокую степень сходства начала 2-го найденного мотива с консенсусной последовательностью СТЕ из рисунка ??, можно предположить сохранение интрона благодаря этой и возможно другим структурам внутри интрон-содержащего транскрипта (рисунок ??).

Проведенное множественное выравнивание на рисунке ?? говорит о высокой степени консервативности как кодирующих участков (левый и правый крайние части диаграммы под выравниванием), так и некоторых участков внутри интрона (центр диаграммы под выравниванием). Филогенетическое древо (рисунок ??), построенное по результатам выравнивания, несмотря на наличие “кассетного” интрона в последовательности, использованной для его построения, успешно разделяет виды на таксоны более высокого ранга - Otomorpha и Euteleosteomorpha.

Остальные группы, не включенные в подробный анализ, требуют его проведения.

Выводы

По результатам проведенной работы были сформулированы следующие выводы:

1. Внутри одной таксономической группы существуют преобладающие значения для характеристик “консервативной кассеты”:
 - длина первого и второго экзона;
 - длина “кассетного” интрона;
 - длина участка внутри “кассетного” интрона до стоп-кодона.
2. Внутри “кассетного” интрона существуют участки, которые образуют особые структуры при формировании вторичной структуры интрон-содержащего транскрипта, и за счет их наличия возможно сохранение такого транскрипта и последующая трансляция укороченной формы белка.

Приложение

Таблица 3: Сводная таблица с характеристикой кассетного интрона для таксономической группы Ecdysozoa. Сортировка по возрастанию количества нуклеотидов до стоп-кодона в кассетной интроне.

Название организма	Кол-во нуклеотидов до стоп-кодона в интроне	Длина 1-го экзона в кассете	Длина кассетного интрона	Длина 2-го экзона в кассете	
<i>Trichinella spiralis</i>		1	83	417	37
<i>Priapulius caudatus</i>		1	110	2114	37
<i>Galendromus occidentalis</i>		1	110	1491	37
<i>Ixodes scapularis</i>		1	110	3567	37
<i>Limulus polyphemus</i>		1	110	915	37
<i>Parasteatoda tepidariorum</i>		1	110	1725	37
<i>Cryptotermes secundus</i>		1	110	4335	37
<i>Maniola hyperantus</i>		1	110	920	37
<i>Cimex lectularius</i>		1	110	4437	37
<i>Vespa mandarinia</i>		1	113	379	37
<i>Zerene cesonia</i>		1	110	1162	37
<i>Pararge aegeria</i>		1	110	2657	37
<i>Myzus persicae</i>		1	107	772	37
<i>Halyomorpha halys</i>		1	110	7270	37
<i>Diuraphis noxia</i>		1	107	742	37
<i>Sipha flava</i>		1	107	58	37
<i>Manduca sexta</i>		1	110	1796	37
<i>Apis laboriosa</i>		1	113	1254	37
<i>Orussus abietinus</i>		1	113	74	37
<i>Danarus plexippus</i>		1	110	1009	37
<i>Colletes gigas</i>		1	113	379	37
<i>Ostrinia furnacalis</i>		1	110	1946	37
<i>Vespa crabro</i>		1	113	381	37
<i>Venturia canescens</i>		1	113	621	37
<i>Papilio polytes</i>		1	110	1674	37
<i>Vespa velutina</i>		1	113	377	37
<i>Cephus cinctus</i>		1	113	75	37
<i>Bombus pyrosoma</i>		1	113	244	37
<i>Papilio xuthus</i>		1	110	999	37
<i>Vanessa tameamea</i>		1	110	2352	37
<i>Megalopta genalis</i>		1	113	373	37
<i>Vespula pennsylvanica</i>		1	113	363	37
<i>Leptopilina heterotoma</i>		1	113	921	37
<i>Acromyrmex echinator</i>		1	113	438	37
<i>Aphidius gifuensis</i>		1	113	240	37
<i>Polistes fuscatus</i>		1	113	400	37
<i>Dirofilaria immitis</i>		7	98	248	37
<i>Odontomachus brunneus</i>		10	113	498	37
<i>Diploscapter pachys</i>		10	110	662	37
<i>Bactrocera dorsalis</i>		13	110	1808	37
<i>Drosophila melanogaster</i>		13	110	1602	37
<i>Ceratitis capitata</i>		19	110	2023	37
<i>Pediculus humanus corporis</i>		19	110	631	37
<i>Aphelenchoides avenae</i>		19	110	441	37
<i>Litomosoides sigmodontis</i>		19	110	242	37
<i>Acanthocheilonema viteae</i>		19	110	225	37
<i>Aethina tumida</i>		19	110	1729	37

<i>Lepeophtheirus salmonis</i>	22	110	1555	37
<i>Anoplophora glabripennis</i>	22	110	3664	37
<i>Varroa jacobsoni</i>	22	110	3077	37
<i>Varroa destructor</i>	22	110	3077	37
<i>Thelazia callipaeda</i>	25	110	209	37
<i>Bursaphelenchus xylophilus</i>	25	110	638	37
<i>Acyrtosiphon pisum</i>	28	107	68	37
<i>Anisakis simplex</i>	30	219	665	37
<i>Tetranychus urticae</i>	31	122	648	37
<i>Homarus americanus</i>	31	110	9821	37
<i>Bursaphelenchus okinawaensis</i>	37	110	593	37
<i>Globodera pallida</i>	43	113	47	37
<i>Amphibalanus amphitrite</i>	73	110	369	37
<i>Cotesia glomerata</i>	73	116	236	37
<i>Caenorhabditis angaria</i>	79	110	96	37
<i>Onchocerca ochengi</i>	88	110	243	37
<i>Brugia pahangi</i>	91	110	232	37
<i>Ditylenchus destructor</i>	97	307	1167	37
<i>Mesorhabditis belari</i>	97	110	147	37
<i>Melanaphis sacchari</i>	97	107	71	37
<i>Enterobius vermicularis</i>	100	110	195	37
<i>Pristionchus mayeri</i>	103	110	131	37
<i>Cercopithifilaria johnstoni</i>	103	110	238	37
<i>Steinernema carpocapsae</i>	106	110	131	37
<i>Wuchereria bancrofti</i>	106	125	242	37
<i>Parelaphostrongylus tenuis</i>	112	110	228	37
<i>Toxocara canis</i>	115	110	1062	37
<i>Necator americanus</i>	136	110	243	37
<i>Brugia malayi</i>	139	110	243	37
<i>Caenorhabditis auriculariae</i>	145	110	156	37
<i>Auanema sp. JU1783</i>	145	110	80	37
<i>Pristionchus entomophagus</i>	151	110	154	37
<i>Steinernema hermaphroditum</i>	157	110	131	37
<i>Caenorhabditis brenneri</i>	175	110	130	37
<i>Angiostrongylus cantonensis</i>	181	110	213	37
<i>Dictyocaulus viviparus</i>	190	110	832	37
<i>Caenorhabditis elegans</i>	193	110	106	37
<i>Cooperia oncophora</i>	205	110	215	37
<i>Caenorhabditis sp. 36 PRJEB53466</i>	205	110	133	37
<i>Caenorhabditis nigoni</i>	214	110	142	37
<i>Pristionchus pacificus</i>	214	110	251	37
<i>Trichostrongylus colubriformis</i>	214	110	224	37
<i>Caenorhabditis briggsae</i>	217	110	145	37
<i>Cylicocyclus nassatus</i>	229	110	239	37
<i>Haemonchus contortus</i>	304	110	220	37
<i>Caenorhabditis bovis</i>	316	110	235	37
<i>Nippostrongylus brasiliensis</i>	316	110	235	37
<i>Dracunculus medinensis</i>	334	110	122	37
<i>Mesorhabditis spiculigera</i>	376	110	173	37
<i>Pollicipes pollicipes</i>	436	110	367	37
<i>Rhopalosiphum maidis</i>	1345	107	69	37

Таблица 4: Сводная таблица с характеристикой кассетного интрона для таксономической группы Spiralia. Сортировка по возрастанию количества нуклеотидов до стоп-кодона в “кассетном” интроне.

Название организма	Кол-во нуклеотидов до стоп-кодона в интроне	Длина 1-го экзона в кассете	Длина кассетного интрона	Длина 2-го экзона в кассете
<i>Schistosoma haematobium</i>	1	239	652	37
<i>Magallana gigas</i>	1	110	1537	37
<i>Mya arenaria</i>	1	110	1727	37
<i>Crassostrea virginica</i>	1	110	1613	37
<i>Aplysia californica</i>	1	221	4146	37
<i>Gigantopelta aegis</i>	1	110	1869	37
<i>Mercenaria mercenaria</i>	1	110	1690	37
<i>Dreissena polymorpha</i>	1	110	2207	37
<i>Ruditapes philippinarum</i>	1	110	1646	37
<i>Mactra antiquata</i>	1	110	2319	37
<i>Mytilus coruscus</i>	1	110	1234	37
<i>Potamilus streckersoni</i>	1	110	4567	37
<i>Saccostrea echinata</i>	1	110	1556	37
<i>Mytilus edulis</i>	1	110	1360	37
<i>Mytilus trossulus</i>	1	110	1357	37
<i>Pecten maximus</i>	1	110	5000	37
<i>Ostrea edulis</i>	1	110	1643	37
<i>Mizuhopecten yessoensis</i>	1	110	4836	37
<i>Saccostrea cucullata</i>	1	110	1706	37
<i>Ylistrum balloti</i>	1	110	4649	37
<i>Argopecten irradians</i>	1	110	5057	37
<i>Magallana angulata</i>	1	110	1534	37
<i>Mytilus californianus</i>	1	110	1248	37
<i>Pinctada imbricata</i>	1	110	4144	37
<i>Haliotis asinina</i>	1	110	2375	37
<i>Sinanodonta woodiana</i>	1	110	4580	37
<i>Haliotis cracherodii</i>	1	110	2506	37
<i>Haliotis rufescens</i>	1	110	2505	37
<i>Patella caerulea</i>	1	110	1362	37
<i>Patella vulgata</i>	1	110	1384	37
<i>Lymnaea stagnalis</i>	1	221	2705	37
<i>Batillaria attramentaria</i>	1	110	8614	37
<i>Schistosoma turkestanicum</i>	1	239	905	37
<i>Paragonimus westermani</i>	1	239	13971	37
<i>Pomacea canaliculata</i>	1	56	255	37
<i>Bradybaena similaris</i>	1	221	3811	37
<i>Elysia crispata</i>	1	221	8063	37
<i>Elysia chlorotica</i>	1	221	7182	37
<i>Bulinus truncatus</i>	1	221	1873	37
<i>Biomphalaria pfeifferi</i>	1	221	1885	37
<i>Biomphalaria glabrata</i>	1	221	1889	37
<i>Schistosoma guineensis</i>	1	239	652	37
<i>Schistosoma curassoni</i>	1	239	652	37
<i>Schistosoma bovis</i>	1	239	652	37
<i>Schistosoma margrebowiei</i>	1	239	650	37
<i>Schistosoma intercalatum</i>	1	239	652	37
<i>Schistosoma rodhaini</i>	1	239	671	37
<i>Schistosoma japonicum</i>	1	239	847	37
<i>Clonorchis sinensis</i>	1	242	6006	37
<i>Hydatigera taeniaeformis</i>	1	242	375	37

<i>Taenia crassiceps</i>	1	242	278	37
<i>Taenia asiatica</i>	1	242	480	37
<i>Heterobilharzia americana</i>	1	239	2163	37
<i>Trichobilharzia szidati</i>	1	239	1336	37
<i>Trichobilharzia regenti</i>	1	239	996	37
<i>Opisthorchis felineus</i>	1	242	14603	37
<i>Rodentolepis nana</i>	1	242	222	37
<i>Calicophoron daubneyi</i>	1	239	4214	37
<i>Taenia solium</i>	1	242	480	37
<i>Echinococcus granulosus</i>	1	242	521	37
<i>Fasciola hepatica</i>	1	239	2631	37
<i>Fasciola gigantica</i>	1	239	2581	37
<i>Schistosoma mattheei</i>	1	239	649	37
<i>Fasciolopsis buskii</i>	1	239	1303	37
<i>Dicrocoelium dendriticum</i>	1	239	2612	37
<i>Paragonimus heterotremus</i>	1	239	18219	37
<i>Hymenolepis diminuta</i>	1	242	224	37
<i>Solemya velum</i>	4	110	2071	37
<i>Littorina saxatilis</i>	19	218	6746	37

Таблица 5: Сводная таблица с характеристикой кассетного интрона для таксономической группы Cnidaria. Сортировка по возрастанию количества нуклеотидов до стоп-кодона в “кассетном” интроне.

Название организма	Кол-во нуклеотидов до стоп-кодона в интроне	Длина 1-го экзона в кассете	Длина кассетного интрона	Длина 2-го экзона в кассете
<i>Actinia tenebrosa</i>	10	116	173	37
<i>Dendronephthya gigantea</i>	10	116	328	37
<i>Nematostella vectensis</i>	25	116	991	37
<i>Montipora foliosa</i>	31	116	907	37
<i>Pocillopora verrucosa</i>	34	116	390	37
<i>Acropora digitifera</i>	40	116	670	37
<i>Acropora millepora</i>	40	116	682	37
<i>Acropora muricata</i>	40	116	679	37
<i>Pocillopora damicornis</i>	46	116	392	37
<i>Pocillopora meandrina</i>	46	116	392	37
<i>Porites lutea</i>	61	116	711	37
<i>Porites evermanni</i>	61	116	711	37
<i>Exaiptasia diaphana</i>	76	86	227	37
<i>Xenia sp. Carnegie-2017</i>	103	116	116	37

Таблица 6: Сводная таблица с характеристикой кассетного интрона для таксономической группы Sauropsida. Сортировка по возрастанию количества нуклеотидов до стоп-кодона в “кассетном” интроне.

Название организма	Кол-во нуклеотидов до стоп-кодона в интроне	Длина 1-го экзона в кассете	Длина кассетного интрона	Длина 2-го экзона в кассете
<i>Molothrus aeneus</i>	1	110	745	37
<i>Taeniopygia guttata</i>	1	110	443	37
<i>Lonchura striata</i>	1	110	629	37
<i>Gallus gallus</i>	7	110	1616	37

<i>Cygnus atratus</i>	25	110	1257	37
<i>Haliaeetus leucocephalus</i>	25	110	1375	37
<i>Phalacrocorax carbo</i>	25	110	1345	37
<i>Grus americana</i>	25	110	1659	37
<i>Haliaeetus albicilla</i>	25	110	1378	37
<i>Oxyura jamaicensis</i>	25	110	1246	37
<i>Anser cygnoides</i>	25	110	1279	37
<i>Ciconia boyciana</i>	25	107	1459	37
<i>Anas acuta</i>	25	110	1346	37
<i>Astur gentilis</i>	25	110	1393	37
<i>Aquila chrysaetos chrysaetos</i>	25	110	1375	37
<i>Aythya fuligula</i>	25	110	1227	37
<i>Struthio camelus</i>	64	110	1405	37
<i>Chelonia mydas</i>	79	110	1674	37
<i>Dermochelys coriacea</i>	79	110	1661	37
<i>Caretta caretta</i>	79	110	1656	37
<i>Ammospiza caudacuta</i>	82	110	3942	37
<i>Aphelocoma coerulescens</i>	85	110	3626	37
<i>Gopherus flavomarginatus</i>	142	110	1655	37
<i>Chelonoidis abingdonii</i>	142	110	1645	37
<i>Malaclemys terrapin pileata</i>	142	110	1652	37
<i>Mauremys mutica</i>	142	110	1662	37
<i>Mauremys reevesii</i>	142	110	1661	37
<i>Trachemys scripta elegans</i>	142	110	1661	37
<i>Chrysemys picta bellii</i>	142	110	1662	37
<i>Emys orbicularis</i>	142	110	1650	37
<i>Alligator sinensis</i>	148	110	1497	37
<i>Alligator mississippiensis</i>	148	110	1618	37
<i>Caloenas nicobarica</i>	184	110	1245	37
<i>Rissa tridactyla</i>	205	110	1388	37
<i>Terrapene triunguis</i>	211	110	1662	37
<i>Emydura macquarii macquarii</i>	223	110	1647	37
<i>Catharus ustulatus</i>	241	110	3252	37
<i>Gopherus evgoodei</i>	301	110	1639	37
<i>Strigops habroptila</i>	457	110	1317	37
<i>Neopsephotus bourkii</i>	502	110	1245	37
<i>Melopsittacus undulatus</i>	517	110	1257	37
<i>Apteryx rowi</i>	541	110	1359	37
<i>Apteryx mantelli</i>	541	110	1359	37
<i>Dromaius novaehollandiae</i>	553	110	1365	37
<i>Chroicocephalus ridibundus</i>	562	110	1373	37
<i>Pezoporus wallicus</i>	568	110	1328	37
<i>Pezoporus flaviventris</i>	568	110	1328	37
<i>Rhea pennata</i>	568	110	1348	37
<i>Pezoporus occidentalis</i>	568	110	1319	37
<i>Pelodiscus sinensis</i>	640	110	1643	37
<i>Phaenicophaeus curvirostris</i>	892	110	2155	37
<i>Camarhynchus parvulus</i>	1360	110	2456	37
<i>Vidua chalybeata</i>	1519	110	678	37

Таблица 7: Сводная таблица с характеристикой кассетного интрона для таксономической группы Amphibia. Сортировка по возрастанию количества нуклеотидов до стоп-кодона в “кассетном” интроне.

Название организма	Кол-во нуклеотидов до стоп-кодона в интроне	Длина 1-го экзона в кассете	Длина кассетного интрона	Длина 2-го экзона в кассете
Ambystoma mexicanum	1	110	10340	37
Pelobates fuscus	1	110	2424	37
Bufo bufo	7	110	3002	37
Bufo gargarizans	7	110	2879	37
Hyperolius riggenbachi	10	110	3902	37
Rana temporaria	10	110	3036	37
Pseudophryne corroboree	19	110	3561	37
Spea bombifrons	25	110	2840	37
Engystomops pustulosus	25	110	2004	37
Nanorana parkeri	25	110	3038	37
Hyla sarda	25	110	3029	37
Pyxicephalus adspersus	25	110	2917	37
Ranitomeya imitator	37	110	2650	37
Xenopus tropicalis	46	110	2596	37
Xenopus laevis	52	110	3791	37
Geotrypetes seraphini	55	110	3065	37
Rhinatrema bivittatum	103	110	4053	37
Pleurodeles waltl	151	110	3245	37
Microcaecilia unicolor	187	110	2784	37

Таблица 8: Сводная таблица с характеристикой кассетного интрона для таксономической группы Lepidosauria. Сортировка по возрастанию количества нуклеотидов до стоп-кодона в “кассетном” интроне.

Название организма	Кол-во нуклеотидов до стоп-кодона в интроне	Длина 1-го экзона в кассете	Длина кассетного интрона	Длина 2-го экзона в кассете
<i>Python bivittatus</i>	1	110	2374	37
<i>Notechis scutatus</i>	1	110	2507	37
<i>Pseudonaja textilis</i>	1	110	2519	37
<i>Anolis sagrei</i>	1	110	4667	37
<i>Pituophis catenifer annectens</i>	1	110	2420	37
<i>Lacerta agilis</i>	1	110	2499	37
<i>Candoia aspera</i>	1	110	2293	37
<i>Sphaerodactylus townsendi</i>	1	110	2825	37
<i>Thamnophis elegans</i>	1	110	2426	37
<i>Ahaetulla prasina</i>	1	110	2432	37
<i>Gekko japonicus</i>	1	110	2924	37
<i>Crotalus tigris</i>	1	110	3091	37
<i>Pogona vitticeps</i>	1	110	2746	37
<i>Podarcis raffonei</i>	1	110	2495	37
<i>Protobothrops mucrosquamatus</i>	1	110	3264	37
<i>Varanus komodoensis</i>	1	110	2658	37
<i>Pantherophis guttatus</i>	1	110	2411	37
<i>Elgaria multicarinata webbiai</i>	1	110	2800	37
<i>Rhineura floridana</i>	1	110	2581	37
<i>Podarcis muralis</i>	1	110	2506	37
<i>Heteronotia binoei</i>	1	110	3002	37

<i>Anolis carolinensis</i>	1	110	4026	37
<i>Erythrolamprus reginae</i>	1	110	2638	37
<i>Sceloporus undulatus</i>	1	110	2380	37
<i>Eublepharis macularius</i>	1	110	2577	37
<i>Euleptes europaea</i>	1	110	2901	37
<i>Hemicordylus capensis</i>	1	110	2830	37
<i>Zootoca vivipara</i>	1	110	2516	37

Список литературы

1. Organ-specific transcripts as a source of gene multifunctionality: lessons learned from the *Drosophila melanogaster* *sbr* (*Dm nxf1*) gene / L. Mamon [и др.] // *Biol. Commun.* — 2019. — Т. 64, № 2. — С. 146–157.
2. *Juneau K., Nislow C., Davis R. W.* Introns regulate RNA and protein abundance in yeast // *Genetics.* — 2006. — Vol. 174, no. 1. — P. 511–518. — DOI: [10.1534/genetics.106.058560](https://doi.org/10.1534/genetics.106.058560). — URL: <https://doi.org/10.1534/genetics.106.058560>.
3. *Mamon L. A., Kliver S. F., Golubkova E. V.* Evolutionarily conserved features of the retained intron in alternative transcripts of the *nxf1* (nuclear export factor) genes in different organisms // *Open J. Genet.* — 2013. — Т. 03, № 03. — С. 159–170.
4. *Jo B.-S., Choi S. S.* Introns: The Functional Benefits of Introns in Genomes // *Genomics & Informatics.* — 2015. — Vol. 13, no. 4. — P. 112. — DOI: [10.5808/gi.2015.13.4.112](https://doi.org/10.5808/gi.2015.13.4.112). — URL: <https://doi.org/10.5808/gi.2015.13.4.112>.
5. Alternative splicing and nonsense-mediated decay modulate expression of important regulatory genes in *Arabidopsis* / M. Kalyna [et al.] // *Nucleic Acids Research.* — 2012. — Vol. 40, no. 6. — P. 2454–2469. — DOI: [10.1093/nar/gkr932](https://doi.org/10.1093/nar/gkr932). — URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkr932>.
6. Splicing as a requirement for biogenesis of functional 16S mRNA of simian virus 40 / P. Gruss [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 1979. — Vol. 76, no. 9. — P. 4317–4321. — DOI: [10.1073/pnas.76.9.4317](https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4317). — URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.76.9.4317>.
7. *Valencia P., Dias A. P., Reed R.* Splicing promotes rapid and efficient mRNA export in mammalian cells // *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* — 2008. — Vol. 105, no. 9. — P. 3386–3391. — DOI: [10.1073/pnas.0800250105](https://doi.org/10.1073/pnas.0800250105). — URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.0800250105>.
8. *Schwartz S., Meshorer E., Ast G.* Chromatin organization marks exon-intron structure // *Nature Structural and Molecular Biology.* — 2009. — Vol. 16, no. 9. — P. 990–995. — DOI: [10.1038/nsmb.1659](https://doi.org/10.1038/nsmb.1659). — URL: <https://doi.org/10.1038/nsmb.1659>.
9. *Comeron J. M., Williford A., Kliman R. M.* The Hill-Robertson effect: Evolutionary consequences of weak selection and linkage in finite populations // *Heredity.* — 2008. — Vol. 100, no. 1. — P. 19–31. — DOI: [10.1038/sj.hdy.6801059](https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801059). — URL: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6801059>.
10. The NHGRI GWAS Catalog, a curated resource of SNP-trait associations / D. Welter [et al.] // *Nucleic Acids Research.* — 2014. — Vol. 42, no. D1. — P. 1001–1006. — DOI: [10.1093/nar/gkt1229](https://doi.org/10.1093/nar/gkt1229).

11. *Golubkova E., Shidlovskii Y., Schedl P.* The evolutionarily conserved family of nuclear export factor (NXF) in *Drosophila melanogaster* // *Drosophila Melanogaster: Life Cycle, Genetics and Development*. — 2012. — P. 63–82. — Published December 2015.
12. *Roy S. W., Gilbert W.* The evolution of spliceosomal introns: Patterns, puzzles and progress // *Nature Reviews Genetics*. — 2006. — Vol. 7, no. 3. — P. 211–221. — DOI: [10.1038/nrg1807](https://doi.org/10.1038/nrg1807). — URL: <https://doi.org/10.1038/nrg1807>.
13. Retroviral Constitutive Transport Element Evolved from Cellular TAP(NXF1)-Binding Sequences / A. S. Zolotukhin [et al.] // *Journal of Virology*. — 2001. — Vol. 75, no. 12. — P. 5567–5575. — DOI: [10.1128/jvi.75.12.5567-5575.2001](https://doi.org/10.1128/jvi.75.12.5567-5575.2001).
14. *Herold A., Klymenko T., Izaurralde E.* TAP (NXF1) Belongs to a Multigene Family of Putative RNA Export Factors with a Conserved Modular Architecture // *Molecular and Cellular Biology*. — 2000. — Vol. 20, no. 23. — P. 8996–9008. — DOI: [10.1128/mcb.20.23.8996-9008.2000](https://doi.org/10.1128/mcb.20.23.8996-9008.2000).
15. Testis-specific products of the *Drosophila melanogaster* *sbr* gene, encoding nuclear export factor 1, are necessary for male fertility / V. Ginanova [и др.] // *Gene*. — 2016. — Февр. — Т. 577, № 2. — С. 153–160.
16. The RNA-binding protein SBR (dm NXF1) is required for the constitution of medulla boundaries in *Drosophila melanogaster* optic lobes / L. Mamon [и др.] // *Cells*. — 2021. — Май. — Т. 10, № 5. — С. 1144.
17. *Bondaruk D. D., Golubkova E. V., Mamon L. A.* Contribution of the intron retained in the *Nxf1* gene transcript to the phylogeny of the order *Chiroptera* // *Ekol. Genet.* — 2022. — Сент. — Т. 20, № 2. — С. 73–88.
18. Database resources of the National Center for Biotechnology Information / E. W. Sayers, E. E. Bolton, J. R. Brister, [et al.] // *Nucleic Acids Research*. — 2022. — Vol. 50, no. D1. — P. D20–D26. — DOI: [10.1093/nar/gkab1112](https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112). — URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>.
19. *McKinney W.* Data Structures for Statistical Computing in Python. — 2010.
20. *Python Software Foundation.* Python, Version 3.12. — 2023. — <https://www.python.org/downloads/release/python-3120/>.
21. Jupyter Notebooks – a publishing format for reproducible computational workflows / T. Kluyver [et al.]. — 2016. — DOI: [10.3233/978-1-61499-649-1-87](https://doi.org/10.3233/978-1-61499-649-1-87). — URL: <https://doi.org/10.3233/978-1-61499-649-1-87>.
22. Biopython: Freely available Python tools for computational molecular biology and bioinformatics / P. J. A. Cock [et al.] // *Bioinformatics*. — 2009. — Vol. 25, no. 11. — P. 1422–1423. — DOI: [10.1093/bioinformatics/btp163](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163). — URL: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp163>.

23. Exploring and retrieving sequence and metadata for species across the tree of life with NCBI Datasets / N. A. O’Leary [et al.] // Scientific Data. — 2024. — Vol. 11, no. 1. — P. 732. — DOI: [10.1038/s41597-024-03571-y](https://doi.org/10.1038/s41597-024-03571-y). — URL: <https://doi.org/10.1038/s41597-024-03571-y>.
24. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs / S. F. Altschul [et al.] // Nucleic Acids Research. — 1997. — Vol. 25, no. 17. — P. 3389–3402. — DOI: [10.1093/nar/25.17.3389](https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389). — URL: <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
25. *Katoh K., Standley D. M.* MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability // Molecular Biology and Evolution. — 2013. — Vol. 30, no. 4. — P. 772–780. — DOI: [10.1093/molbev/mst010](https://doi.org/10.1093/molbev/mst010). — URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
26. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit / K. Okonechnikov [et al.] // Bioinformatics. — 2012. — Vol. 28, no. 8. — P. 1166–1167. — DOI: [10.1093/bioinformatics/bts091](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091). — URL: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091>.
27. The MEME Suite / T. L. Bailey [et al.] // Nucleic Acids Research. — 2015. — Vol. 43, W1. — W39–W49. — DOI: [10.1093/nar/gkv416](https://doi.org/10.1093/nar/gkv416). — URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkv416>.
28. Quantifying similarity between motifs / S. Gupta [et al.] // Genome Biology. — 2007. — Vol. 8, no. 2. — R24. — DOI: [10.1186/gb-2007-8-2-r24](https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r24). — URL: <https://doi.org/10.1186/gb-2007-8-2-r24>.
29. ViennaRNA Package 2.0 / R. Lorenz [et al.] // Algorithms for Molecular Biology. — 2011. — Vol. 6, no. 1. — P. 26. — DOI: [10.1186/1748-7188-6-26](https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26). — URL: <https://doi.org/10.1186/1748-7188-6-26>.
30. *Yeo G., Burge C. B.* Maximum entropy modeling of short sequence motifs with applications to RNA splicing signals // Bioinformatics. — 2004. — Vol. 20, no. 3. — P. 327–335. — DOI: [10.1093/bioinformatics/btg005](https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg005). — URL: <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btg005>.
31. IQ-TREE 2: New Models and Efficient Methods for Phylogenetic Inference in the Genomic Era / B. Q. Minh [et al.] // Molecular Biology and Evolution. — 2020. — Vol. 37, no. 5. — P. 1530–1534. — DOI: [10.1093/molbev/msaa015](https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015). — URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msaa015>.
32. *Rambaut A.* FigTree v1.4.4. — 2018. — Institute of Evolutionary Biology, University of Edinburgh. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>.
33. *QuantStack, contributors mamba.* Mamba: The Fast Cross-Platform Package Manager. — 2024. — <https://github.com/mamba-org/mamba>.
34. *GitHub, Inc.* GitHub. — 2008. — URL: <https://github.com>.

35. *Lamport L.* LaTeX: A Document Preparation System. — 2nd ed. — Reading, Massachusetts : Addison-Wesley, 1994.
36. *TablesGenerator.com.* Tables Generator – LaTeX Tables Editor. — 2025. — URL: <https://www.tablesgenerator.com>.
37. *diagrams.net.* draw.io - Online Diagram Software. — 2025. — URL: <https://www.diagrams.net/>.
38. *Canonical Ltd.* Ubuntu 22.04 LTS (Jammy Jellyfish). — 2022. — <https://releases.ubuntu.com/22.04/>.
39. Replication of Human Herpesvirus 6A and 6B Is Associated with Distinct Nuclear Domains / F. Tajima [et al.] // Journal of Virology. — 2001. — Vol. 75, no. 12. — P. 5567–5575. — DOI: [10.1128/JVI.75.12.5567-5575.2001](https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5567-5575.2001). — URL: <https://doi.org/10.1128/JVI.75.12.5567-5575.2001>.

Благодарности

Я хотел бы поблагодарить моего научного руководителя, Голубкову Елену Валерьевну, и моего куратора, Бондарука Дмитрия Денисовича, за постоянную поддержку и помощь в обсуждении результатов работы.

Отдельно я хотел бы поблагодарить Абрамсон Наталью Иосифовну за повторное рецензирование работы моего авторства.

Также хочу выразить благодарность преподавателям программы “Биоинформатика” и кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, и коллективу преподавателей и ассистентов Института Биоинформатики за полученные знания в процессе обучения, с помощью которых стало возможным осуществление данной работы.