

ПОРЯДОК ГЕНОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ВЛИЯЕТ НА ПРЕДСТАВЛЕННОСТЬ ИХ ТРАНСКРИПТОВ (ПРИМЕР МОРСКИХ НЕМАТОД)

© 2025 О.В. Николаева¹, А.С. Овчаренко^{1,2}, П.В. Хорхордина^{1,2},
Т.С. Миролюбова^{1,3}, Н.С. Садовская¹, В.А. Скобеева^{1,2}, Н.П. Санамян⁴,
Е.Г. Панина⁵, К.В. Михайлов^{1,6}, Л.Ю. Русин⁶, А.В. Чесунов^{1,2}, В.В. Алешин^{1,2,6*}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
119234 Москва, Россия; электронная почта: Aleshin@genebee.msu.su

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119234 Москва, Россия

³ Институт проблем экологии и эволюции им. А.Н. Северцова РАН, 119071 Москва, Россия

⁴ Камчатский филиал Тихоокеанского института географии ДВО РАН,
683000 Петропавловск-Камчатский, Россия

⁵ Зоологический институт РАН, 199034 Санкт-Петербург, Россия

⁶ Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН,
127051 Москва, Россия

Поступила в редакцию 10.07.2025

После доработки 13.11.2025

Принята к публикации 14.11.2025

Митохондриальные геномы большинства видов животных содержат одинаковые наборы генов, причем все или многие митохондриальные белок-кодирующие гены (мтБКГ) располагаются в одинаковом порядке, формируя консервативные блоки – синтении. Некоторые синтении сохраняются на протяжении сотен миллионов лет и обнаруживаются как у позвоночных, так и беспозвоночных животных. Подобная эволюционная консервативность указывает на функциональную роль взаиморасположения мтБКГ, однако биохимический и/или физиологический механизм влияния порядка генов в мтДНК на жизнеспособность не известен. Среди животных, однако, встречаются и таксоны, полностью утратившие консервативные синтении в мтДНК. К последним до недавнего времени причисляли и круглых червей (нематод), пока некоторые канонические синтении животных не были обнаружены у ранее не исследованных нематод, в том числе у семейства морских нематод Thoracostomopsidae (Nematoda, Enoplida). Мы секвенировали полные митохондриальные геномы трех видов Thoracostomopsidae, определили порядок генов и уровни их экспрессии, согласно данным RNA-seq, у всех доступных представителей семейства. Обнаружено, что у шести видов Thoracostomopsidae реализовано три варианта расположения мтБКГ, а относительные уровни их мРНК коррелируют с порядком генов, а не филогенией видов. Мы предполагаем, что влияние транслокаций мтБКГ на уровень их экспрессии является причиной длительного сохранения митохондриальных синтений среди животных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: мтДНК, митогеном, транскриптом, геномное секвенирование, RNA-seq, молекулярная эволюция, филогения, нематоды, Enoplia, Thoracostomopsidae, *Enoplolaimus*, *Marimermis*, *Thoracostomopsis*, *Trileptium*.

DOI: 10.7868/S3034529425110195

ВВЕДЕНИЕ

Митохондриальный геном (митогеном) большинства многоклеточных животных представлен одной кольцевой молекулой ДНК длиной около

15 т.п.н. [1] и содержит 37 генов, кодирующих семь субъединиц комплекса I дыхательной цепи, одну субъединицу комплекса III, три субъединицы комплекса IV, две субъединицы АТР-синтазы (всего 13 митохондриальных белок-кодирующих генов (мтБКГ)), две рибосомные РНК (рРНК) и 22 транспортные РНК (тРНК). Обычно между ге-

* Адресат для корреспонденции.

нами практически нет промежутков, за исключением одного протяженного (1–1,5 т.п.н.) некодирующего участка.

Обе цепи митохондриальной ДНК (мтДНК) у животных могут кодировать гены, но цепи часто отличаются количеством генов и соотношением пуриновых и пиrimидиновых оснований. В соответствии с различием в нуклеотидном составе цепи принято обозначать как тяжелую (heavy) и легкую (light). Как правило, регуляторные элементы, управляющие репликацией и транскрипцией мтДНК, расположены в некодирующем участке. У человека и других млекопитающих этот участок содержит три цепь-специфичных промотора транскрипции: два для легкой цепи и один – для тяжелой [2–4]. У других позвоночных, например, у *Xenopus laevis* и курицы, в некодирующем регионе присутствует всего один двунаправленный промотор [5]. У ланцетников протяженный некодирующий регион отсутствует, а регуляторные элементы, по-видимому, рассредоточены по всей мтДНК [6]. У беспозвоночных животных наблюдаются и иные варианты организации промоторов транскрипции мтДНК: у нематоды *Caenorhabditis elegans* имеется один сайт инициации транскрипции на тяжелой цепи и ни одного – на легкой [7], поскольку все гены находятся на тяжелой цепи [8]; у *Drosophila melanogaster* обнаружено более пяти сайтов инициации транскрипции на всем протяжении мтДНК [5]. В любом случае промоторов в мтДНК меньше, чем генов, и транскрипты оказываются полицистронными.

В ходе созревания полицистронных транскриптов каждая тРНК высвобождается за счет гидролиза по 5'- и 3'-концу РНКазой Р и РНКазой Z соответственно [9], что также приводит к высвобождению моноцистронных мРНК и рРНК [10, 11]. Происхождение зрелых мРНК из немногих или даже одного полицистронного транскрипта, казалось бы, должно приводить к эквимолярному соотношению всех мРНК. Однако на самом деле пул мРНК для белков комплекса I обычно ниже, чем для комплекса IV, а уровни мРНК для белков, входящих в комплексы в эквимолярном соотношении, количественно сильно различаются [12]. Можно предположить, что отклонение от ожидаемого эквимолярного соотношения объясняется случайностью, например, вследствие разной стабильности мРНК. Но случайность не в состоянии объяснить сходного дисбаланса у разных видов. Сходное соотношение мРНК между одними и теми же митохондриальными генами характер-

но как для позвоночных, так и беспозвоночных животных [13, 14], хотя небольшие вариации наблюдаются даже в пределах одного вида в зависимости от пола, возраста и физиологического состояния [12, 15, 16]. У некоторых видов резко изменяется соотношение транскриптов по сравнению с типичным для животных, также у этих видов наблюдаются более или менее значительные отличия в порядке расположения генов в мтДНК [15, 17].

Ввиду процессинга длинного полицистронного предшественника до моноцистронных мРНК перед трансляцией порядок генов на первый взгляд представляется малозначимым фактором. Однако, против ожидания, в митогеномах многих таксонов животных, например, у позвоночных, порядок взаиморасположения генов очень консервативен [18]. В других таксонах он более изменчив, как у моллюсков [19], мшанок [20], клещей [21], оболочников [22], трипсов [17, 23] и др. Однако в составе и стабильных, и вариабельных митогеномов обычно выявляются консервативные блоки генов (синтении). В мтДНК Bilateria было определено четыре консервативных блока генов, внутри каждого из которых сохраняется постоянство состава и расположения входящих в него генов [24]. Самые древние синтении [24] сохраняются у позвоночных и беспозвоночных, т.е. с кембрийского периода (на протяжении более 550 млн лет). Такая консервативность указывает на функциональную важность порядка генов. Можно предположить, что определенный порядок генов согласован с регуляцией их транскрипции и в конечном счете с соотношением митохондриальных белков. Однако, например, семь мтБКГ, кодирующие субъединицы комплекса I, куда те входят в эквимолярном отношении, не сгруппированы в один консервативный блок, а разбиты по четырем разным блокам [24]. Три гена *cox1–cox3*, кодирующие белки комплекса IV, располагаются в двух блоках. Консервативность порядка мтБКГ в мтДНК выглядит настоящим парадоксом на фоне вариабельности положения генов тРНК. Гены тРНК располагаются между мтБКГ и генами рРНК, где они необходимы в качестве меток для процессинга [10], но большинство из них не приписаны к консервативным блокам и изменяют свое расположение в митохондриальном геноме значительно чаще, чем мтБКГ и гены рРНК [25]. Таким образом, отбор оказывает существенно большее давление на расположение мтБКГ, чем генов тРНК.

Принятые сокращения: митогеном – митохондриальный геном; мтБКГ – митохондриальные белок-кодирующие гены; мтДНК – митохондриальная ДНК; пре-мРНК – полицистронный предшественник зрелых РНК; ТРМ – покрытие, измеряемое отношением числа чтений к длине транскрипта в т.п.н., нормированное на суммарное значение отношений для всех транскриптов в расчете на миллион чтений.

Довершает загадку сохранения порядка генов в мтДНК существование видов, полностью утративших консервативные блоки генов, причем без видимых последствий – функциональные ограничения, действовавшие сотни миллионов лет, по-видимому, оказались ослаблены у этих видов. Парадоксальным образом отдельные таксоны, «отказавшиеся» от кембрийского наследия в виде консервативных блоков, приобрели специфический для них порядок генов и фиксировали его на протяжении долгого эволюционного времени [26–28]. Единственным известным на сегодня фактором, с которым ассоциировано изменение генетической карты мтДНК животных, является повышенная скорость молекулярной эволюции [1, 24]. Одним из таких таксонов до последнего времени можно было считать круглых червей (нематод). Известно более 200 полных митогеномов почвенных и паразитических нематод; почти все они похожи между собой по порядку генов, не сохраняя при этом ни одной синтении с другими животными [8, 29]. Почти все они принадлежат к гигантской, самой большой в типе Nematoda, но обособленной эволюционной ветви наземного происхождения – Rhabditia.

Таксономическая представленность мтДНК нематод начала меняться в последние несколько лет в связи с развитием геномного секвенирования микроскопических объектов и публикацией первых митогеномов некультивируемых свободноживущих морских нематод [30]. В этих митогеномах обнаруживаются некоторые из традиционных для Bilateria блоки генов, а для двух видов из семейства Thoracostomopsidae показаны сходные, но немного отличающиеся генетические карты [30], что делает эти виды перспективной моделью для поиска биохимических и физиологических последствий изменения порядка генов в мтДНК. Свободноживущие Thoracostomopsidae обитают на каменистых и песчаных грунтах в приливно-отливной зоне, сублиторали и батиали по всему Мировому океану [31, 32]. На текущий момент в семействе выделяют 3 подсемейства (Thoracostomopsinae, Trileptiinae и Enoplolaiminae), 16 родов и 193 вида [33]. По строению буккальной полости торакостомопсид относят к хищникам: они питаются другими нематодами, цианобактериями, диатомеями, коловратками, олигохетами, турбелляриями и копеподами [31]. По последним молекулярным данным, в семейство Thoracostomopsidae включены паразиты морских беспозвоночных из рода *Marimermis* [32, 34, 35].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Материалы. В исследование вошла выборка из шести видов нематод из всех трех подсемейств семейства Thoracostomopsidae. Особи *Enoplolaimus vulgaris* de Man, 1893 (около 100 особей) и *Thoracostomopsis* (Th.) *barbata* Ditlevsen, 1918 (около 10 особей) собраны на литорали и сублиторали Кандалакшского залива Белого моря в августе 2023 года. Особь *Marimermis maritima* Rubtzov & Platonova, 1974 извлечена из целомической полости морского ежа *Strongylocentrotus polyacanthus*, пойманного вблизи о. Матуя (Курильские о-ва, Тихий океан) в августе 2016 года. До выделения ДНК и РНК особь *M. maritima* хранилась в 95%-ном этаноле. Данные по видам *Enoplolaimus lenunculus* Wieser, 1959 (SRR24201686), *Trileptium* (T.) *ribeirensis* Vilas-Boas, Silva, Alves, Castro & Pinheiro-Junior, 2016 (SRR24201700) [30] и неидентифицируемому изоляту Thoracostomopsidae Gen. sp. KK-2019 (SRR8943408) [36] извлечены из базы NCBI SRA.

Секвенирование, сборка и аннотация митохондриальных геномов. Библиотеки геномной ДНК получены с использованием набора Accel-NGS WGA («Swift Biosciences, Inc.», США). Выделение РНК *E. vulgaris* выполнено с набором RNAqueous-Micro Total RNA Isolation Kit («Thermo Fisher Scientific», США), *Th. barbata* – с набором Arcturus PicoPure isolation Kit («Thermo Fisher Scientific»), *M. maritima* – с набором innuPREP DNA/RNA Mini Kit («Analytik Jena», Германия). Приготовление библиотек кДНК выполнено с использованием затравки олиго-dT и набора SMART-Seq v4 Ultra Low Input RNA Kit («Takara Bio», Япония) с 12 (*E. vulgaris* и *M. maritima*) или 15 (*Th. barbata*) циклами ПЦР. Секвенирование трех видов торакостомопсид проведено на платформе Illumina NovaSeq 6000 (*E. vulgaris*, *M. maritima*) или Illumina NextSeq (*Th. barbata*). Для *E. vulgaris* получено 47,3 млн (ДНК) и 42,2 млн (кДНК) парно-концевых чтений; для *Th. barbata* – 34,4 млн (ДНК) и 25,4 млн (кДНК) парно-концевых чтений; для *M. maritima* – 29,6 млн (ДНК) и 36,3 млн (кДНК) парно-концевых чтений. Качество полученных чтений, а также чтений из NCBI SRA оценено программой FastQC [37]. Адаптеры и некорректные концевые нуклеотиды удалены программой Trimmomatic [38]. Сборка проведена программой SPAdes [39] с длиной k-меров 55, 77, 99 и 123. Поиск целевых контигов проведен локально пакетом BLAST [40]. Митохондриальные геномы собраны программой NOVOPlasty [41]. Аннотация митогеномов проведена программой MITOS [42]; белки предсказаны согласно митохондриальному генетическому коду беспозвоночных. Картирование чтений на митогеномы проведено программой Bowtie2 [43]. Визуализация картирования и поиск посттранскрипционных модификаций выполнены программой Tablet [44].

Сравнительный анализ экспрессии митохондриальных геномов. Оценка покрытия

митогеномов чтениями проведена программой BEDtools [45] на основе картирования чтений в Bowtie2. После получения данных о покрытии по каждому нуклеотиду в программе MS Excel построены графики покрытия. Для изучения дифференциальной экспрессии мы применили учет общего покрытия каждого гена чтениями с нормировкой на длину (TPM; transcripts per million), рассчитанный в программе RSEM [46] для триммированных чтений. Гены *atp8* и *rRNA* не использовали из-за очень низкого и очень высокого покрытия соответственно. По данным TPM проведен факторный анализ методом главных компонент в программе STATISTICA10 («TIBCO Software Inc.», США) и анализ ранговой корреляции Спирмена и Кендалла в программной среде R.

Филогенетический анализ. Для выяснения направления эволюции порядка генов были установлены филогенетические отношения шести исследуемых видов. Для этого в геномных сборках, включая *E. lenunculus*, *T. ribeirensis* и изолят КК-2019, были найдены ядерные гены 18S и 28S рРНК, поскольку лишь для этих маркеров имеется представительная выборка Thoracostomopsidae в базе NCBI GenBank. Выравнивания проведены программой MAFFT [47] с ручной корректировкой в BioEdit [48] и последующим конкатенированием. Для анализа митохондриальных белков использованы конкатенированные предсказанные последовательности 12 белков шести представителей Thoracostomopsidae и *Enoplus communis* – в качестве внешней группы. Филогенетические деревья построены в программах IQ-Tree 3.0.1 [49] и MrBayes 3.2.6 [50]. Модель эволюции нуклеотидов выбрана по байесовскому информационному критерию (BIC) [51] в программе IQ-Tree: для 18S рРНК – модель GTR + F + R3; для 28S рРНК – модель TVMe + I + G4; для митохондриальных белков – Mtrev + G4. При построении байесовского дерева использованы параметры: nst = 6, ngammacat = 6, ngen = 3 000 000, burnin = 50% (для нуклеотидных последовательностей) и aamodelpr = fixed(mtrev), ngammacat = 4, ngen = 200 000, burnin = 50% (для аминокислотных последовательностей). Деревья визуализированы в программе MEGA 7 [52].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Структура митохондриальных геномов торакостомопсид. Митохондриальный геном *E. vulgaris* организован в одну кольцевую молекулу ДНК длиной 13 843 т.п.н., содержащую 37 генов (13 мтБКГ, 2 гена рРНК и 22 гена тРНК). Все гены расположены на одной цепи. Предсказано четыре типа старт-кодонов для мтБКГ: ATA (10 генов),

ATG (1 ген), ATC (1 ген) и TTA (1 ген). 11 мтБКГ терминирует стоп-кодон TAA и 2 – стоп-кодон TAG.

Митохондриальный геном *Th. barbata* организован в одну кольцевую молекулу ДНК длиной 14 399 т.п.н., содержащую типичный для животных набор из 37 генов. 35 генов расположены на одной цепи, гены *trnY* и *trnD* расположены на другой цепи. На основании выравнивания транслированных мтБКГ предсказано четыре типа старт-кодонов: ATA (6 генов), ATG (3 гена), ATT (3 гена) и GTT (1 ген). 12 мтБКГ терминирует стоп-кодон TAA, 1 ген – стоп-кодон TAG.

Митохондриальный геном *M. maritima* организован в одну кольцевую молекулу ДНК длиной 14 284 т.п.н., содержащую 37 генов. Все гены расположены на одной цепи. Предсказано три типа старт-кодонов для мтБКГ: ATA (6 генов), ATG (4 гена) и ATT (3 гена). 8 мтБКГ терминирует стоп-кодон TAA, 5 генов – стоп-кодон TAG.

Митохондриальный геном изолята КК-2019 собран в незамкнутый контиг длиной 15 589 т.п.н., содержащий 29 генов, из них 13 – мтБКГ. Не найдены гены восьми тРНК. Все найденные гены расположены на одной цепи. Предсказано пять типов старт-кодонов для мтБКГ: ATA (8 генов), GTA (1 ген), TTA (1 ген), ATT (1 ген) и TGG (1 ген). Начало гена *nad5* не найдено. 12 мтБКГ терминируют стоп-кодон TAA и 1 – стоп-кодон TAG.

Нуклеотидный состав (GC), а также АТ- и GC-смещение в мтДНК шести видов торакостомопсид представлены в табл. 1.

Нуклеотидный состав мтДНК *Th. barbata* по содержанию GC (17%) приближается к самым низким значениям для животных. Содержание GC у *M. maritima* – 35%. Двухкратная разница в содержании GC у видов одного семейства довольно необычна. У всех видов в кодирующей цепи мтДНК тимидин превалирует над аденоzinом, а цитидин и гуанозин содержатся практически в одинаковом количестве.

Порядок митохондриальных генов. У шести видов торакостомопсид наблюдается три варианта порядка мтБКГ и генов рРНК (рис. 1). Различия между *E. vulgaris*, *Th. barbata* и *T. ribeirensis* затрагивают только гены тРНК. То же относится к *E. lenunculus* и изоляту КК-2019, представляющим другой вариант расположения мтБКГ. Порядок генов у *M. maritima* – уникальный.

В митохондриальных геномах торакостомопсид до некоторой степени сохраняются консервативные блоки генов, типичные для Bilateria [24], но необычные для нематод. У четырех видов целиком сохранился блок 2 (*nad4l-nad4-nad5*), а у *E. lenunculus* и изоляту КК-2019 соседствуют два из трех генов из этого блока. Хотя блок 1 фрагментирован, у всех шести видов сохраняется каноническая пара *atp6-cox3* из его состава.

Таблица 1. Нуклеотидный состав митохондриальных ДНК торакостомопсид

Вид	GC, %	A, %	T, %	G, %	C, %	AT-смещение	GC-смещение
<i>Enoplolaimus vulgaris</i>	28	30	42	14	14	-0,17	0
<i>Thoracostomopsis barbata</i>	17	35	48	9	8	-0,15	0,06
<i>Trileptium ribeirensis</i>	20	34	46	10	10	-0,15	0
<i>Enoplolaimus lenunculus</i>	21	33	46	10	11	-0,16	-0,05
Изолят KK-2019*	20	38	42	11	9	-0,05	0,1
<i>Marimermis maritima</i>	35	30	35	17	18	-0,08	-0,03

Примечание. * Неполный геном.

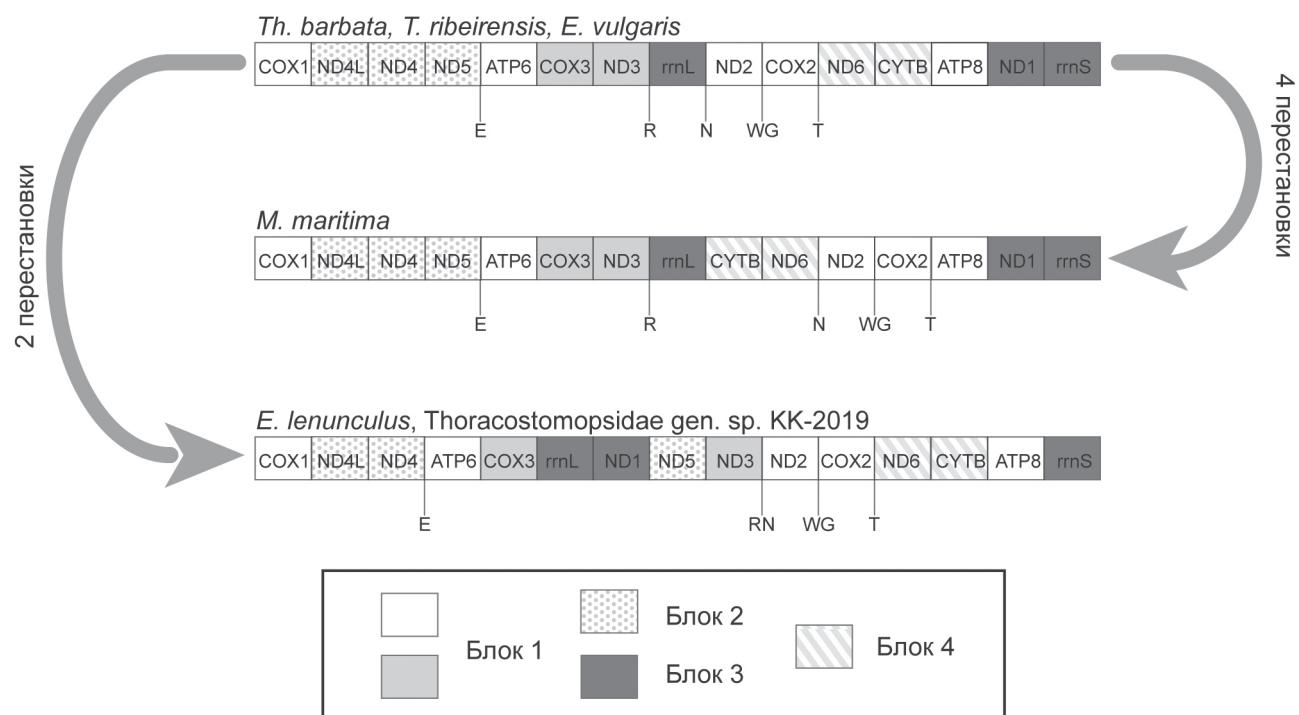


Рис. 1. Эволюция порядка митохондриальных генов у нематод семейства Thoracostomopsidae. Гены размечены в соответствии с консервативными блоками, типичными для Bilateria [24]. Гены тРНК, сохраняющие соседское положение относительно хотя бы одного из мтБКГ у разных видов, показаны однобуквенным кодом

Блок 3 фрагментирован у всех видов, но сохраняется соседство двух его генов из трех (*rrnL-nad1* у *E. lenunculus* и изолята KK-2019, *nd1-rrnS* – у остальных). Блок 4 (*nad6-cytb*) сохраняется у пяти видов; у *M. maritima* порядок генов изменен на *cytb-nad6*.

У всех шести видов 2 гена тРНК, *trnW* и *trnG*, расположены между *nad3* и *cox2*; еще 4 гена тРНК сохраняют соседа с 5'- или 3'-конца (рис. 1). Положение остальных генов тРНК более вариабельное и индивидуально для каждого вида.

У всех шести видов некодирующий участок находится вблизи от начала гена *nad1*, хотя отличается по расположению относительно близлежащих генов тРНК и гена *atp8*. У *E. lenunculus* и

изолята KK-2019 некодирующий участок вместе с геном *nad1* переместился в совсем другое место генетической карты.

Поляризация эволюции порядка генов. Чтобы понять, как изменение порядка генов мтДНК влияет на их экспрессию, желательно знать направление этих изменений, т.е. знать какой из трех вариантов, наблюдаемых у современных Thoracostomopsidae, был исходным (предковым). Было бы опрометчиво принимать *a priori* наиболее распространенный вариант за исходный, поскольку он мог возникнуть в одной из эволюционных линий, лучше представленной в базе данных.

Мы реконструировали филогению семейства Thoracostomopsidae на основе ядерных генов 18S

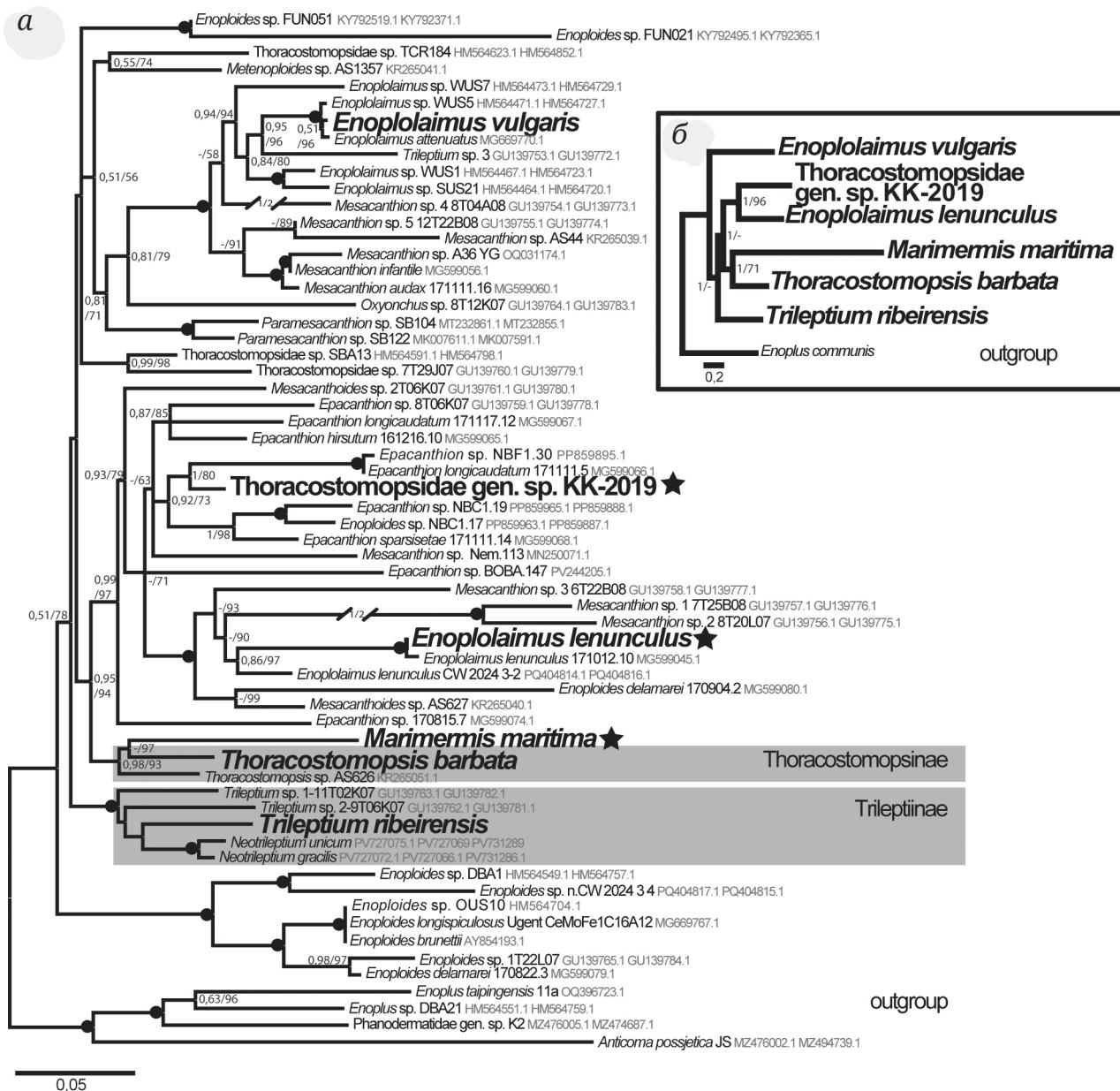


Рис. 2. Филогенетическое дерево семейства Thoracostomopsidae по конкатенированным генам 18S и 28S rPHK (а) и митохондриальным белкам (б). Цифры в узлах соответствуют значениям байесовской апостериорной вероятности (первое число) и бутстреп-поддержки (параметрический бутстреп) для максимального правдоподобного дерева (второе число). Значения 1/100 заменены на ●. Поддержки ниже 0,50 или 50 обозначены дефисом, значения -- пропущены. Крупным шрифтом выделены виды, для которых секвенирован митогеном; ★ – виды с отличающимся порядком мтБКГ; серым фоном выделены представители подсемейств Thoracostomopsinae и Trileptiinae

и 28S rPHK, по которым имеется больше всего данных. Два метода реконструкции, байесовский и максимального правдоподобия, привели к похожим топологиям с одинаковым расположением шести интересующих нас видов (рис. 2).

Виды с одинаковой генетической картой (*E. vulgaris*, *Th. barbata* и *T. ribeirensis*) не образуют монофилетической группы по отношению к видам с отличающейся картой (рис. 2). Один из них, *T. ribeirensis*, вместе с видами *Enoploides* представ-

ляет раннюю ветвь Thoracostomopsidae, что согласуется с предыдущими исследованими филогении данного семейства [32, 35, 53, 54]. Самый простой сценарий эволюции (минимальное число перестановок генов) получается, если принять порядок генов *T. ribeirensis*, *E. vulgaris* и *Th. barbata* унаследованным от общего предка семейства. Назовем этот порядок плезиоморфным. Порядок мтБКГ *M. maritima* и *E. lenunculus* отличается от плезиоморфного и приобретен ими независимо (рис. 1).

Назовем эти карты апоморфными. Порядок мтБКГ у изолята КК-2019 и *E. lenunculus* совпадает, что согласуется с родством этих видов (рис. 2). Таким образом, стрелки на рис. 1 показывают не только способ формального преобразования карты, но реальное направление эволюции порядка генов.

Картирование чтений ДНК и РНК на митохондриальные геномы. Покрытие митохондриальных геномов чтениями DNA-seq колеблется в некотором диапазоне без четкой привязки к границам генов (рис. 3). Однако у *Th. barbata* и *M. maritima* на некодирующем участке наблюдается сначала снижение, а после резкое увеличение покрытия. Для некодирующего участка *Th. barbata* увеличение покрытия может быть связано с короткими tandemными повторами в этой области. У остальных видов на некодирующем участке наблюдается снижение покрытия.

Доля чтений RNA-seq, картируемых на митохондриальный геном, составляет 0,13% для *Th. barbata*, 22,9% – для *M. maritima* и 32% – для *E. vulgaris*. Покрытие митохондриальных геномов чтениями RNA-seq, в отличие от DNA-seq, сильно неоднородно как внутри одного гена, так и на уровне разных генов (рис. 4). Наибольшим покрытием у всех видов обладает ген *rrnL*, при этом покрытие гена *rrnS* существенно ниже и сопоставимо с покрытием мтБКГ. Ожидается, что рРНК в большей степени должны выделяться из зрелых рибосом и поэтому должны присутствовать в клетке в эквимолярном соотношении. Однако «нехватку» 12S рРНК уже выявляли ранее у разных видов, в том числе при секвенировании кДНК без обогащения поли-А-транскриптами при секвенировании длинных фрагментов и применении случайных праймеров [55, 56], поэтому вряд ли в случае торакостомопсид она объясняется артефактами пробоподготовки. Наименьшее покрытие наблюдается на участках с генами тРНК, что согласуется с моделью тРНК-пунктуации [10]. Из мтБКГ наиболее высокий уровень покрытия у *cox1*, *cox2* и *cox3*, наиболее низкий – у *atp8*. Исключение представляет изолят КК-2019 с относительно низким уровнем мРНК *cox1* и высоким уровнем *nad4*. Покрытие заметно снижается к началу каждого гена. Это объясняется более активной деградацией мРНК со стороны 5'-конца, а также обогащением библиотек последовательностями у 3'-конца ввиду способа приготовления кДНК с использованием затравки олиго-dT. Наибольшей деградации подверглись РНК *Th. barbata* и *M. maritima*, выделенные из экземпляров, длительно (несколько лет) хранившихся в этаноле.

Картирование чтений кДНК выявило от 4 – у *Th. barbata* до 13 – у *T. ribeirensis* сайтов полиденилирования, всего 51 сайт (табл. 2). Поли-

аденилируется каждая мРНК, за исключением *atp8* (модификации которой могли быть не обнаружены из-за низкого покрытия) как минимум у двух видов торакостомопсид. Таким образом, двухцистронных зрелых мРНК, характерных для митохондриальных транскриптомов животных, у торакостомопсид, по-видимому, не встречается. У *E. lenunculus*, помимо полиденилирования 3'-концов мРНК, обнаружен дополнительный сайт полиденилирования в кодирующей рамке гена *nad3*. В отдельных библиотеках присутствуют полиденилированные рРНК и тРНК. Всего найдено шесть полиденилированных тРНК: *trnD*, *trnL2*, *trnR*, *trnS1*, *trnV* и *trnY*. У *T. ribeirensis* найден один модифицированный двухцистронный транскрипт *rrnL-trnS1*: некоторые чтения кДНК захватывают поли-А на 3'-конце *trnS1*, а обратные им чтения картируются на 3'-конец соседнего гена *rrnL*. Короткие прочтения на платформе Illumina не являются адекватной методикой для выявления недопроцессированных полицистронных предшественников зрелых РНК (пре-мРНК) [55], тем не менее у другого вида, волосатика *Parachordodes pustulosus*, аналогичные методы выявили три двухцистронных продукта при наличии 23 сайтов полиденилирования [57]. По-видимому, созревание пре-мРНК имеет отличия у разных видов.

Сайты полиденилирования у видов с одинаковым порядком мтБКГ не совпадают. Эта разница вряд ли зависит от того, что модификации не замечены из-за малого числа чтений: 11 сайтов полиденилирования у *M. maritima* подтверждаются суммарно 8 млн чтений, картированных на мтДНК, тогда как 13 сайтов у *T. ribeirensis* найдены с помощью ~1 млн картированных чтений. Для вида *Th. barbata* вероятна недопредсказанность сайтов полиденилирования из-за низкой глубины чтения библиотеки кДНК (0,03 млн картированных на мтДНК чтений).

Доля модифицированных сайтов от общего покрытия соответствующего нуклеотида кДНК мала для любого гена *M. maritima*. У других видов эта доля варьирует от менее чем 1% до более чем 40% в пределах одной библиотеки (табл. 2). Притом нет прямого соответствия между количеством транскриптов конкретного гена и степенью полиденилирования их концов. Два последних обстоятельства мы рассматриваем как важное косвенное свидетельство пригодности полученных библиотек для сравнения транскриптомов. В библиотеках кДНК, сконструированных с использованием олиго-dT-затравки, можно ожидать обогащения полиденилированными транскриптами. В полученных библиотеках соотношение разных кДНК не согласуется со степенью их полиденилирования, следовательно, это соотношение отражает вклад как факторов, связанных с мето-

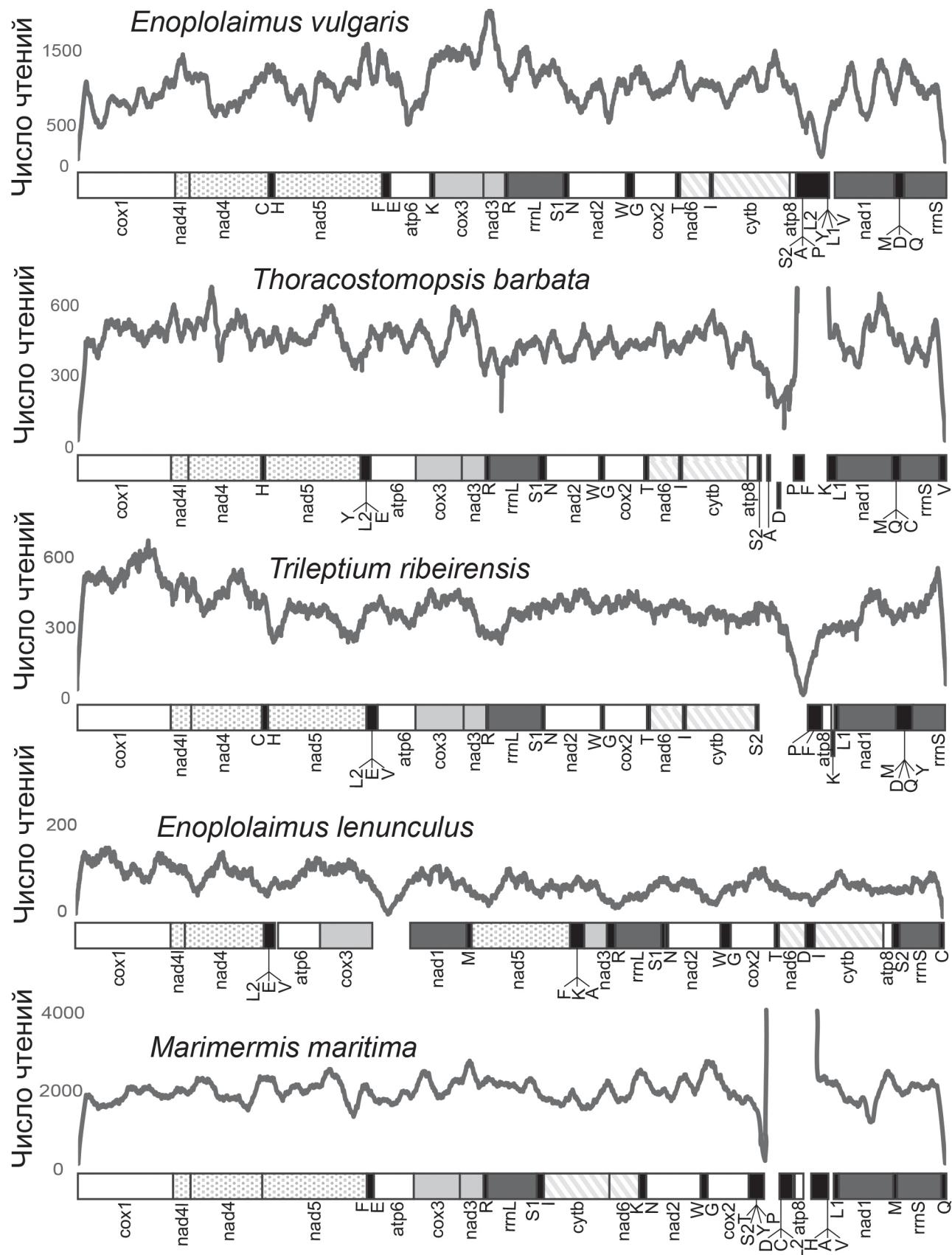


Рис. 3. Покрытие митохондриальных геномов Thoracostomopsidae чтениями DNA-seq. Гены тРНК показаны в однобуквенной кодировке

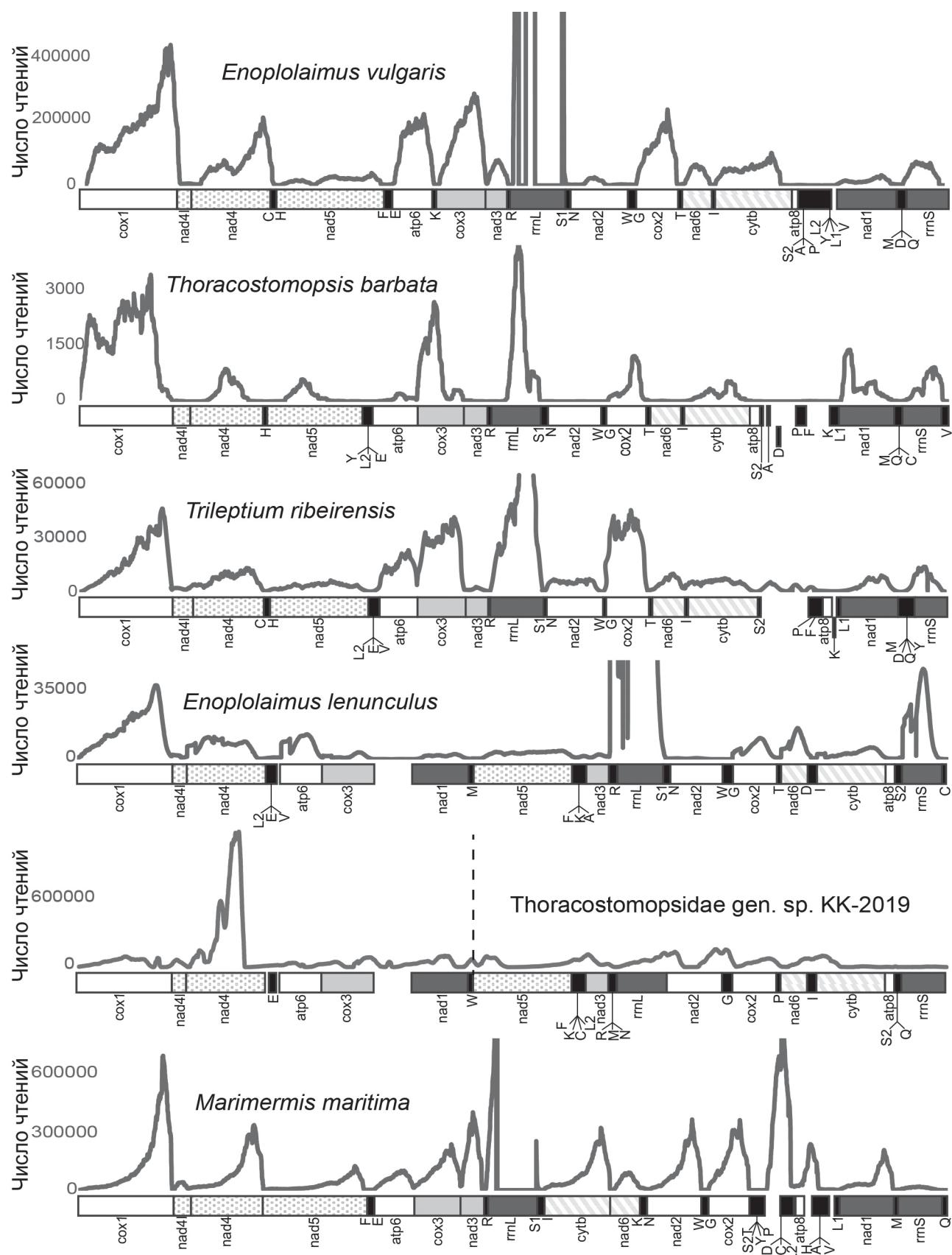


Рис. 4. Покрытие митохондриальных геномов Thoracostomopsidae чтениями RNA-seq. Пунктирной линией показано место обрыва контига изолята KK-2019

Таблица 2. Доля полиаденилированных митохондриальных транскриптов (в % от покрытия модифицируемого нуклеотида) у шести видов Thoracostomopsidae

Ген	<i>E. vulgaris</i>	<i>Th. barbata</i>	<i>T. ribeirensis</i>	<i>E. lenunculus</i>	КК-2019	<i>M. maritima</i>
<i>atp6</i>	15,8	5,9	1,7	2,7		
<i>cox1</i>	26,9	33,0	0,5	7,4		0,2
<i>cox2</i>	2,7	45,8			1,8	1,3
<i>cox3</i>	10,7		33,5	44,7		0,2
<i>cytb</i>			39,0	19,5		0,2
<i>nd1</i>			49,2	6,7		0,1
<i>nd2</i>			40,1			1,4
<i>nd3</i> , сайт 1				4,0		
<i>nd3</i> , сайт 2			19,4	4,0		
<i>nd4</i>	28,2		23,9	2,4		1,2
<i>nd4l</i>			1,6	0,1		0,2
<i>nd5</i>	3,0		41,7	6,4	6,8	1,7
<i>nd6</i>	1,2		5,4		0,5	
<i>rrnS</i>					4,8	
<i>rrnL</i>		27,3				
<i>trnD</i>				5,7		
<i>trnL2</i>						0,3
<i>trnR</i>					2,5	
<i>trnS1</i>			1,0			
<i>trnV</i>						1,1
<i>trnY</i>			0,3			

дикой конструирования, так и вклад от реального отношения транскриптов *in vivo*.

Других модификаций, таких как нематричное присоединение ССА к акцепторному стеблю тРНК, характерное для митохондрий многих животных, у торакостомопсид не выявлено.

Дифференциальная экспрессия митохондриальных генов. Принятой мерой оценки дифференциальной экспрессии являются значения TPM. Мы получили значения TPM для мтБКГ (табл. 3) и провели факторный анализ методом главных компонент (рис. 5).

Виды с плезиоморфной генетической картой – *E. vulgaris*, *Th. barbata* и *T. ribeirensis* – вносят наибольший вклад в первую главную компоненту и образуют отчетливый кластер в проекции на пло-

скость первых двух главных компонент. Первая главная компонента объясняет 39% всей изменчивости экспрессии митохондриальных генов для взятых в анализ видов, т.е. мы можем говорить о сходном паттерне мРНК мтБКГ у видов с плезиоморфной генетической картой. Напомним, что виды с плезиоморфной генетической картой не являются ближайшими родственниками (рис. 2). Вид *E. lenunculus* и изолят КК-2019, имеющие другой вариант генетической карты, также образуют свой кластер на плоскости двух главных компонент. Вид *M. maritima* с уникальным порядком генов обладает отличным от всех, в том числе ближайшего родственника *Th. barbata*, паттерном экспрессии. Таким образом, мы можем говорить о сходстве паттернов экспрессии митохондриаль-

Таблица 3. Значения TPM для mtБКГ шести видов Thoracostomopsidae (округлены до целых)

Ген	<i>Th. barbata</i>	<i>E. lenunculus</i>	<i>T. ribeirensis</i>	<i>E. vulgaris</i>	КК-2019	<i>M. maritima</i>
<i>cox1</i>	370 422	209 913	120 679	181 041	52 565	68 263
<i>cox2</i>	120 095	50 387	281 626	153 501	48 014	111 296
<i>cox3</i>	251 191	14 364	233 143	178 235	78 702	72 122
<i>cytb</i>	41 575	39 715	41 248	44 589	75 505	52 037
<i>atp6</i>	20 383	132 559	113 650	165 097	186 906	40 601
<i>nad1</i>	111 753	20 458	30 490	12 505	105 815	35 397
<i>nad2</i>	106	2478	35 902	6270	28 354	70 957
<i>nad3</i>	3147	48 833	17 181	100 595	81 445	306 290
<i>nad4</i>	51 011	82 396	43 730	66 985	104 962	53 063
<i>nad4l</i>	4120	113 462	16 825	15 171	47 107	128 139
<i>nad5</i>	24 456	35 682	20 528	13 527	68 424	14 362
<i>nad6</i>	1741	249 753	44 998	62 484	122 201	47 473
сумма	1 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000	1 000 000

ных генов у видов со сходными генетическими картами, независимо от степени их родства.

В качестве альтернативного способа сравнения транскриптомов мы применили ранговый анализ, для чего в каждом из транскриптомов ранжировали mtБКГ по TPM, а затем вычислили попарные (по видам) коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r_s) и Кендалла (τ) (табл. 4).

В обоих видах анализа, по Спирмену и по Кендаллу, корреляции в рангах достоверно значимы на уровне $p < 0,05$ у одной пары видов из трех с плезиоморфным порядком расположения mtБКГ. При расчете значимости мы сочли излишним применение поправки на множественность сравнений (Бонферрони или аналогичных) для 15 попарных сравнений. При таком объеме выборки значительная доля результатов может быть ложноотрицательной, поэтому мы ориентировались не на значимость корреляции, а на значение ее коэффициента, выражавшего силу связи между величинами. Между любыми видами с плезиоморфным порядком генов корреляция выше или по меньшей мере не ниже, чем у видов с альтернативным порядком генов. Учитывая повторяемость результатов, полученных разными методами, мы можем с осторожностью говорить о корреляции экспрессии mtБКГ у видов с одинаковым порядком генов, независимо от степени их родства.

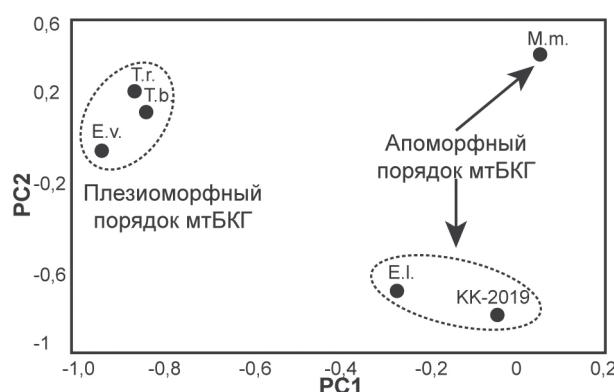


Рис. 5. Анализ методом главных компонент нормированного количества кДНК (TPM) 12 mtБКГ шести видов нематод Thoracostomopsidae (три варианта генетической карты). Обозначения: E.v. – *Enoplolaimus vulgaris*; T.r. – *Trileptium ribeirensis*; T.b. – *Thoracostomopsis barbata*; E.l. – *Enoplolaimus lenunculus*; KK-2019 – Thoracostomopsidae Gen. sp., изолят KK-2019; M.m. – *Marimermis maritima*

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Имеется несколько причин, способных исказить природное соотношение различных РНК в сконструированной и секвенированной библиотеке кДНК, из них главные – избирательная деградация РНК, избирательный синтез кДНК, контекст-зависимые эффекты секвенирования.

Таблица 4. Коэффициенты ранговой корреляции Спирмена (r_s) и коэффициенты ранговой корреляции Кендалла (τ) по ТРМ для мтБКГ

Вид	<i>E. vulgaris</i>	<i>Th. barbata</i>	<i>T. ribeirensis</i>	<i>E. lenunculus</i>	КК-2019	<i>M. maritima</i>
<i>E. vulgaris</i>	1	0,545	0,706*	0,462	0,224	0,294
<i>Th. barbata</i>	0,424	1	0,573	-0,028	-0,021	-0,042
<i>T. ribeirensis</i>	0,485*	0,394	1	0,217	0,133	-0,007
<i>E. lenunculus</i>	0,394	-0,061	0,121	1	0,301	-0,014
КК-2019	0,152	0	0,121	0,212	1	-0,497
<i>M. maritima</i>	0,182	-0,03	0,091	0	-0,364	1

Примечание. Выше диагонали с выделенными полужирным шрифтом значениями приведены значения r_s , ниже диагонали – значения τ . Серым выделены ячейки, относящиеся к видам с плезиоморфным расположением мтБКГ. * Достоверно значимая корреляция на уровне $p < 0,05$.

Они в основном обусловлены свойствами самих РНК, такими как особенности вторичной структуры, наличие специфических мотивов-мишеней нуклеаз или сложных для прохождения ревертазой или секвенирующей полимеразой мотивов, наличием и длиной полиаденилированного участка. Результаты факторного и рангового анализа, представленные в работе, свидетельствуют в пользу зависимости относительного уровня прочтений кДНК от взаиморасположения генов в мтДНК. Трудно представить, как избирательная деградация РНК, избирательный синтез кДНК и контекст-зависимые эффекты секвенирования могли бы привести к указанной зависимости числа прочтений от места гена в мтДНК. Такой результат получен в системе довольно близких видов, что делает эту и подобные системы перспективными для детального изучения изменчивости митогенома и его выражения через дифференциальную представленность различных РНК в митохондрии. Среди вопросов фундаментального и прикладного значения – понимание механизмов селективной регуляции генов, считываемых совместно за один раунд транскрипции с образованием общей полицистронной пре-мРНК. Ассоциации порядка генов (структуры генетической карты) с уровнями их экспрессии выявляют непрямую форму такой зависимости (когда перемещение одного гена влияет на экспрессию другого), что предполагает сложную, многокомпонентную природу регуляции, возможной как на уровне транскрипции, так и посттранскрипционных модификаций (созревания, или процессинга) полицистрона.

Транскрипционная регуляция. Жизненный цикл митохондриальных РНК протекает в гигантских, выявляемых микроскопией, комплексах – митохондриальных гранулах РНК [4, 58, 59], где происходят согласованные процессы транскрипции, созревания РНК и сборки митохондриаль-

ных рибосом. По некоторым оценкам, в обеспечении цикла участвует до 300 ядерно-кодируемых митохондриальных белков [2], а транскрипция митогенома сложным образом регулируется несколькими факторами транскрипции с хроматин-модулирующей активностью, имеющими множественные сайты связывания по длине мтДНК и меняющими активность связывания в ходе онтогенеза [5, 60–62]. Места посадки некоторых факторов и хеликаз ассоциированы с особыми неканоническими трехмерными структурами, G-квадруплексами, которые формируются преимущественно на тяжелой цепи мтДНК и имеют неслучайное, консервативное распределение в геноме [63]. Было показано вовлечение этих структур в регуляцию транскрипции и репликации мтДНК, ремодуляцию хроматина, создание горячих мутационных и делеционных зон [64–66], что свидетельствует об их вкладе в регуляцию генов на уровне трехмерной организации мтДНК [67]. Активность митохондриальной РНК-полимеразы регулируется компонентами этой общей системы, влияя на старт, скорость и терминацию транскрипции. Обоснованно ожидать, что изменение порядка генов, содержащих консервативные регуляторные участки, может приводить к смене регуляторного контекста митохондриальной хромосомы и, как следствие, к замедлению транскрипции части полицистрона или к его неполной транскрипции с выпадением генов ниже по цепи. При этом повышенная экспрессия ожидается в начале полицистрона: его первый ген ожидается менее зависимым от результатов процессинга.

Посттранскрипционная регуляция. В ходе созревания из полицистронной пре-мРНК специфическими эндонуклеазами вырезаются гены тРНК с образованием дочерних фрагментов со свободными 3'-концами, которые в норме поли-

аденилируются митохондриальной поли(A)-полимеразой МТРАР [68], что делает полиаденилирование и положение тРНК на генетической карте связанными и потенциально важными факторами регуляции генов митохондрии. Известно, что полиаденилирование вносит вклад в стабилизацию транскриптов на разных уровнях: напрямую через защиту смысловой части 3'-конца от деградации экзонуклеазами [68] и опосредованно через участие поли(A)-концов в комплексных процессах регуляции трансляции (разрушение аварийных мРНК-миторибосомальных комплексов [69]; подача мРНК в рибосому для инициации трансляции [70]), маршрутизации процессированных мРНК [71] и общей стабилизации транскриптома митохондрии с участием РНК-связывающих белков-шаперонов [72]. Смена сайтов полиаденилирования при перестановке генов может давать плейотропные эффекты, включая деградацию генов на 3'-конце общего транскрипта в доле молекул. При этом функционал поли(A)-концов может быть видо-, ткане- и транскрипт-специфичен в зависимости от своего наличия или длины в разных биологических контекстах, что предполагает их вовлеченность в разнообразные, главным образом неописанные, механизмы регуляции. Например, нокдаун МТРАР в культуре человеческих клеток снижает стабильность мРНК генов *cox1*, *cox2*, *cox3* и *atp6*, но не затрагивает *nad3* и даже увеличивает уровень *nad1* [73, 74]. Полиденилирование может встречаться в нормальных митохондриях для некоторых тРНК и рРНК [73]. Так, у дрозофилы 12S рРНК несет короткий поли(A)-конец [68], предполагая его участие в регуляции этого транскрипта, но его основная функция достоверно неясна и может отличаться от таковой у белок-кодирующих генов.

Следует отметить, что в представленной работе оценки уровней экспрессии в большей степени отражают именно процессированные гены с функциональными сайтами полиденилирования в силу построения библиотек с обогащением поли(A)-фракции. Уровни генов выше в общей цепи транскрипта (т.е. без свободных 3'-концов) могут быть недопредставлены и тем значительней, чем больше расстояние от гена до 3'-конца; при этом состав таких генов зависит от их порядка в полицистроне и от его длины.

Ориентация генов-разметок тРНК также играет ключевую роль в успехе созревания общего транскрипта и, как результат, достижения функционального полиденилирования: цепь транскрипции должна быть смысловой для тРНК и для фланкирующих генов. Если при перестройке генетической карты сменилась ориентация тРНК, их последовательность не образует шпильки для узнавания и вырезания эндонуклеазами [73, 74],

гены выше в составе транскрипта не образуют свободный 3'-конец и не полиденилируются, что изменит фактор их регуляции (и также повлияет на их представленность в поли(A)-библиотеке).

Также важно отметить, что состав транскриптов (выявляемый данными RNA-seq) не полностью отражает конечный состав кодируемых белков, т.к. эффективность трансляции также может зависеть от порядка генов: свободный 3'-конец с полиденилированием после процесинга иногда требуется для достройки функционального стоп-кодона при наличии в митогеноме неполного стоп-кодона Т или TA [74] (у торакостомопсид все стоп-кодоны полные); эффективность посадки рибосом на 5'-нетранслируемые области соседних генов в полицистронном транскрипте зависит от нуклеотидного состава пересечения с геном выше по цепи [75, 76], которое может измениться при смене порядка генов.

Учитывая сложность механизмов, связывающих порядок генов в митогеноме и их экспрессию, мы полагаем, что хромосомные перестройки сопряжены с высокими рисками летальности и требуют одномоментных компенсаторных изменений в вовлеченных молекулярных системах. Это делает их редкими событиями, при которых дискретные изменения фиксируются в эволюции митохондрий на протяжении миллионов лет, т.е. на уровне крупных таксонов [26–28]. Наблюдения начальных перестроек митогенома представляют особый интерес для изучения факторов стабильности митохондриальной системы; первые результаты такого анализа для видов животных на сравнительно небольшом эволюционном расстоянии изложены в настоящей работе.

Таксономические и морфологические выводы. Полученная кладограмма (рис. 2) позволяет сделать некоторые выводы и о морфологической эволюции и таксономии Thoracostomopsidae.

На кладограмме два вида, отнесенные к одному роду *Enoplolaimus*, *E. vulgaris* и *E. lenunculus*, оказались на разных ветвях дерева торакостомопсид. Типовой вид рода *E. vulgaris* группируется с ближайшим родственником *Enoplolaimus attenuatus*, несколькими не идентифицированными видами *Enoplolaimus* и *Mesacanthion*, а также с *Trileptium* sp. 3 (последнее выглядит как ошибочное определение). *E. lenunculus* (изоляты из двух работ [30, 35] и неопубликованный MG599045) и неидентифицированная торакостомопсиха КК-2019 [36] объединяются в обширную группу с большим числом видов *Epacanthion*; в эту же группу включается также несколько видов *Mesacanthion*, *Mesacanthoides* и *Enoploides*. Возможных объяснений группировок видов разных родов между собой может быть два: (1) морфологические признаки рода *Enoplolaimus* не явля-

ются голапоморфиями, а сам род *Enoplolaimus* не является монофилетическим; (2) таксономические идентификации видов торакостомопсид в базе данных GenBank являются частично ошибочными. Рассмотрим оба возможных варианта.

(1). Согласно последнему обзору семейства Thoracostomopsidae [33], *Enoplolaimus* характеризуется положением передних десяти щетинок на уровне заднего края головной капсулы. У *Mesacanthion* и также у *Epacanthion* передние щетинки находятся на уровне переднего края или середины головной капсулы. *Enoploides* отличается от *Enoplolaimus* и *Mesacanthion* формой мандибул. У *Epacanthion* мандибулы промежуточного строения. Связь незначительного смещения сенсилл или изменения формы мандибул, хотя и четкие с точки зрения морфологической таксономии, не проверена на способность отражать филогению.

(2). Вероятность ошибочного таксономического определения существует всегда, и она может существенно повышаться в случае, если вид идентифицируется по особям из района, отдаленного от типового местонахождения. В нашем случае это *Enoplolaimus lenunculus*, описанный из Пьюджет-Саунда (штат Вашингтон, США) и затем собранный для молекулярно-генетического исследования в Китае, на противоположном берегу Тихого океана. Для особей, не идентифицированных до вида, а таких среди торакостомопсид в базе данных GenBank большинство, можно поставить под сомнение и точность определения рода.

Судя по опубликованным иллюстрациям (рис. 6–8 в статье Meng et al. [35]), расположение щетинок китайского изолята *E. lenunculus* соответствует диагнозу рода *Enoplolaimus*. Возникает конфликт с его удаленностью на филогнетическом дереве от типового вида рода, *E. vulgaris*. Либо *E. lenunculus* должен быть перенесен из рода *Enoplolaimus* для сохранения монофилии последнего, но тогда должен быть пересмотрен морфологический диагноз рода, либо объем рода *Enoplolaimus* придется расширять почти на всех торакостомопсид, но тогда тоже требуется пересмотр значения морфологических признаков. Независимо от проблем таксономии, *E. lenunculus* и изолят KK-2019 имеют синапоморфии в расположении генов в mtДНК и входят в одну кладу (рис. 2), что не помешало изоляту KK-2019 приобрести уникальные отличия в паттерне экспрессии mtБКГ (низкий уровень *coxl* и высокий уровень *nad4*). При отсутствии молекулярных данных о типовом виде рода *Trileptium* мы склонны рассматривать род *Neotileptium* [32] как синоним *Trileptium*. Согласно последнему обзору [33], род *Metenoploides* признан невалидным, но, вероятно, это мнение потребуется пере-

смотреть, поскольку изолят AS1357, отнесенный к роду *Metenoploides* [53], располагается на филогенетическом дереве отдельно от большинства видов рода *Enoploides* (рис. 2, а).

Согласно филогенетической реконструкции, не прослеживается разделение Thoracostomopsidae на три подсемейства. Два из них, Thoracostomopsinae и Trileptiinae, оказываются ветвями внутри Enoplolaiminae. Два первых подсемейства характеризуются четкими морфологическими признаками (слиянием мандибул в копье и резким уменьшением стомы соответственно), которые вполне могли возникнуть как эволюционная специализация в двух филогенетических ветвях Enoplolaiminae. Для Enoplolaiminae не было предложено никаких голапоморфий на уровне морфологии, что согласуется с их парафилией, выявленной на генетическом уровне.

Филогенетическая реконструкция по 12 митохондриальным белкам (рис. 2, б), как и по генам рРНК [32, 34, 35], подтверждает принадлежность к семейству Thoracostomopsidae вида *M. maritima*, ранее относимого к отряду Marimermithida.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У нематод семейства Thoracostomopsidae в генетических картах частично сохраняются синтезии mtДНК с другими типами животных, в отличие от нематод подкласса Rhabditia. У шести видов найдено три варианта генетической карты, если учитывать только белок-кодирующие гены и гены рРНК. Один из вариантов признан плезиоморфным, его обладатели парафилетичны относительно видов с альтернативным порядком генов. Два другие варианта возникли в эволюции независимо от плезиоморфного варианта. Факторный анализ и ранговый анализ на основе нормированного покрытия генов чтениями кДНК (TPM) выявили положительные корреляции между уровнем экспрессии митохондриальных белок-кодирующих генов у видов с одинаковым расположением генов, безотносительно к их родству. Это указывает на неизвестный механизм влияния порядка генов в mtДНК на транскрипцию или созревание мРНК, а через это – на дарвиновскую приспособленность. Филогенетический анализ подтверждает принадлежность маримермитиды *M. maritima* к Thoracostomopsidae и не поддерживает выделение традиционных подсемейств в рамках Thoracostomopsidae.

Вклад авторов. О.В. Николаева, А.С. Овчаренко, Н.С. Садовская, К.В. Михайлов, В.В. Алексин – проведение вычислительных экспериментов; Т.С. Миролюбова – проведение лабораторных

работ; Н.С. Садовская, В.А. Скобеева, А.С. Овчаренко – проведение статистического анализа; Н.П. Сацамян, Е.Г. Панина, Л.Ю. Русин, А.В. Чесунов – проведение полевых работ; П.В. Хорхордина, Л.Ю. Русин, А.В. Чесунов, В.В. Алешин – проведение филогенетического анализа; все авторы – подготовка текста и иллюстраций.

Финансирование. Анализ структуры митохондриальных геномов и транскриптов выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-74-20147-П). Филогенетический анализ выполнен при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 25-74-20009).

Благодарности. Авторы благодарны Ии-Чен Ли (Yi-Chien Lee) за предоставленные сборки

мтДНК *E. lenunculus* и *T. ribeirensis*; В.Ю. Штратниковой, М.А. Кульбачной, Д.А. Кнореем и анонимному рецензенту за конструктивную критику рукописи; С.Н. Лысенкову за помощь в статистическом анализе. Для компьютерных вычислений использовано оборудование, приобретенное в рамках финансирования государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова; сбор животных проводился в рамках государственного задания № 122031100275-4.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей, а работа с нематодами не регламентируется этической комиссией.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lavrov, D. V., and Pett, W. (2016) Animal mitochondrial DNA as we do not know it: mt-genome organization and evolution in nonbilaterian lineages, *Genome Biol. Evol.*, **8**, 2896-2913, <https://doi.org/10.1093/gbe/evw195>.
2. Pearce, S. F., Rebelo-Guiomar, P., and D'Souza, A. R. (2017) Regulation of mammalian mitochondrial gene expression: recent advances, *Trends Biochem. Sci.*, **42**, 625-639, <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.02.003>.
3. Tan, B. G., Mutti, C. D., Shi, Y., Xie, X., Zhu, X., Silva-Pinheiro, P., Menger, K. E., Díaz-Maldonado, H., Wei, W., Nicholls, T. J., Chinnery, P.F., Minczuk, M., Falkenberg, M., and Gustafsson, C. M. (2022) The human mitochondrial genome contains a second light strand promoter, *Mol. Cell*, **82**, 3646-3660.e9, <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2022.08.011>.
4. Falkenberg, M., Larsson, N. G., and Gustafsson, C. M. (2024) Replication and transcription of human mitochondrial DNA, *Annu. Rev. Biochem.*, **93**, 47-77, <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-052621-092014>.
5. Barshad, G., Marom, S., Cohen, T., and Mishmar, D. (2018) Mitochondrial DNA transcription and its regulation: an evolutionary perspective, *Trends Genet.*, **34**, 682-692, <https://doi.org/10.1016/j.tig.2018.05.009>.
6. Boore, J. L., Daehler, L. L., and Brown, W. M. (1999) Complete sequence, gene arrangement, and genetic code of mitochondrial DNA of the cephalochordate *Branchiostoma floridae* (Amphioxus), *Mol. Biol. Evol.*, **16**, 410-418, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a026122>.
7. Blumberg, A., Rice, E. J., Kundaje, A., Danko, C. G., and Mishmar, D. (2017) Initiation of mtDNA transcription is followed by pausing, and diverges across human cell types and during evolution, *Genome Res.*, **27**, 362-373, <https://doi.org/10.1101/gr.209924.116>.
8. Okimoto, R., Macfarlane, J. L., Clary, D. O., and Wolstenholme, D. R. (1992) The mitochondrial genomes of two nematodes, *Caenorhabditis elegans* and *Ascaris suum*, *Genetics*, **130**, 471-498, <https://doi.org/10.1093/genetics/130.3.471>.
9. Rossmannith, W. (2012) Of P and Z: mitochondrial tRNA processing enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 1017-1026, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.11.003>.
10. Ojala, D., Montoya, J., and Attardi, G. (1981) tRNA punctuation model of RNA processing in human mitochondria, *Nature*, **290**, 470-474, <https://doi.org/10.1038/290470a0>.
11. Montoya, J., Ojala, D., and Attardi, G. (1981) Distinctive features of the 5'-terminal sequences of the human mitochondrial mRNAs, *Nature*, **290**, 465-470, <https://doi.org/10.1038/290465a0>.
12. Torres, T. T., Dolezal, M., Schlotterer, C., and Ottenwalder, B. (2009) Expression profiling of *Drosophila* mitochondrial genes via deep mRNA sequencing, *Nucleic Acids Res.*, **37**, 7509-7518, <https://doi.org/10.1093/nar/gkp856>.
13. Nabholz, B., Ellegren, H., and Wolf, J. B. W. (2012) High levels of gene expression explain the strong evolutionary constraint of mitochondrial protein-coding genes, *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 272-284, <https://doi.org/10.1093/molbev/mss238>.
14. Held, J. P., and Patel, M. R. (2020) Functional conservation of mitochondrial RNA levels despite divergent mtDNA organization, *BMC Res. Notes*, **13**, 334, <https://doi.org/10.1186/s13104-020-05177-0>.
15. Neira-Oviedo, M., Tsyganov-Bodounov, A. G., Lycett, J., Kokoza, V., Raikhel, A. S., and Krzywinski, J. (2011) The RNA-Seq approach to studying the expression of mosquito mitochondrial genes, *Insect Mol. Biol.*, **20**, 141-152, <https://doi.org/10.1111/j.1365-2583.2010.01053.x>.

16. Wu, X., Zhan, L., Storey, K. B., Zhang, J., and Yu, D. (2025) Differential mitochondrial genome expression of four skink species under high-temperature stress and selection pressure analyses in Scincidae, *Animals (Basel)*, **15**, 999, <https://doi.org/10.3390/ani15070999>.
17. Liu, Q., Xu, S., He, J., Cai, W., Wang, X., and Song, F. (2024) Full-length transcriptome profiling of the complete mitochondrial genome of *Sericothrips houjii* (Thysanoptera: Thripidae: Sericothripinae) featuring extensive gene rearrangement and duplicated control regions, *Insects*, **15**, 700, <https://doi.org/10.3390/insects15090700>.
18. Singh, T. R., Shneor, O., and Huchon, D. (2008) Bird mitochondrial gene order: insight from 3 warbler mitochondrial genomes, *Mol. Biol. Evol.*, **25**, 475-477, <https://doi.org/10.1093/molbev/msn003>.
19. Sun, S., Li, Q., Kong, L., and Yu, H. (2020) Evolution of mitochondrial gene arrangements in Arcidae (Bivalvia: Arcida) and their phylogenetic implications, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **150**, 106879, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2020.106879>.
20. Kutyumov, V. A., Predeus, A. V., Starunov, V. V., Maltseva, A. L., and Ostrovsky, A. N. (2021) Mitochondrial gene order of the freshwater bryozoan *Cristatella mucedo* retains ancestral lophotrochozoan features, *Mitochondrion*, **59**, 96-104, <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.02.003>.
21. Wang, T., Zhang, S., Pei, T., Yu, Z., and Liu, J. (2019) Tick mitochondrial genomes: structural characteristics and phylogenetic implications, *Parasit. Vectors*, **12**, 451, <https://doi.org/10.1186/s13071-019-3705-3>.
22. Griggio, F., Voskoboinik, A., Iannelli, F., Justy, F., Tilak, M. K., Turon, X., Pesole, G., Douzery, E.J., Mastrototaro, F., and Gissi, C. (2014) Ascidian mitogenomics: comparison of evolutionary rates in closely related taxa provides evidence of ongoing speciation events, *Genome Biol. Evol.*, **6**, 591-605, <https://doi.org/10.1093/gbe/evu041>.
23. Liu, Q., Cai, Y. D., Ma, L., Liu, H., Linghu, T., Guo, S., Wei, S., Song, F., Tian, L., Cai, W., and Li, H. (2023) Relaxed purifying selection pressure drives accelerated and dynamic gene rearrangements in thrips (Insecta: Thysanoptera) mitochondrial genomes, *Int. J. Biol. Macromol.*, **253**, 126742, <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2023.126742>.
24. Bernt, M., Bleidorn, C., Braband, A., Dambach, J., Donath A., Fritzsch, G., Golombek, A., Hadrys, H., Jühlung, F., Meusemann, K., Middendorf, M., Misof, B., Perseke, M., Podsiadlowski, L., von Reumont, B., Schierwater, B., Schlegel, M., Schrödl, M., Simon, S., Stadler, P. F., Stöger, I., and Struck, T. H. (2013) A comprehensive analysis of bilaterian mitochondrial genomes and phylogeny, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **69**, 352-364, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2013.05.002>.
25. Dowton, M., Cameron, S. L., Dowavic, J. I., Austin, A. D., and Whiting, M. F. (2009) Characterization of 67 mitochondrial tRNA gene rearrangements in the Hymenoptera suggests that mitochondrial tRNA gene position is selectively neutral, *Mol. Biol. Evol.*, **26**, 1607-1617, <https://doi.org/10.1093/molbev/msp072>.
26. Popova, O. V., Mikhailov, K. V., Nikitin, M. A., Logacheva, M. D., Penin, A. A., Muntyan, M. S., Kedrova, O. S., Petrov, N. B., Panchin, Y. V., and Aleoshin, V. V. (2016) Mitochondrial genomes of Kinorhyncha: *trnM* duplication and new gene orders within animals, *PLoS One*, **11**, e0165072, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165072>.
27. Weigert, A., Golombek, A., Gerth, M., Schwarz, F., Struck, T. H., and Bleidorn, C. (2016) Evolution of mitochondrial gene order in Annelida, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **94**, 196-206, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.08.008>.
28. Kang, H., Li, B., Ma, X., and Xu, Y. (2018) Evolutionary progression of mitochondrial gene rearrangements and phylogenetic relationships in Strigidae (Strigiformes), *Gene*, **674**, 8-14, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.06.066>.
29. Kern, E. M. A., Kim, T., and Park, J.-K. (2020) The mitochondrial genome in nematode phylogenetics, *Front. Ecol. Evol.*, **8**, 250, <https://doi.org/10.3389/fevo.2020.00250>.
30. Lee, Y. C., Ke, H. M., Liu, Y. C., Lee, H. H., Wang, M. C., Tseng, Y. C., Kikuchi, T., and Tsai, I. J. (2023) Single-worm long-read sequencing reveals genome diversity in free-living nematodes, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 8035-8047, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad647>.
31. Greenslade, P., and Nicholas, W. L. (1991) Some Thoracostomopsidae (Nematoda: Enoplida) from Australia, including descriptions of two new genera and diagnostic keys, *Invertebr. Syst.*, **4**, 1031-1052, <https://doi.org/10.1071/IT9901031>.
32. Zograf, J. K., Efimova, K. V., and Mordukhovich, V. (2025) Integrative descriptions of two new Thoracostomopsidae species (Nematoda, Enoplida) with the brief discussion on nematode spicules origin, *Zool. Anz.*, **319**, 50-69, <https://doi.org/10.1016/j.jcz.2025.08.012>.
33. Souza, J. V., and Maria, T. F. (2023) Taxonomic review of Thoracostomopsidae (Nematoda, Enoplida): state of the art, list of valid species and dichotomous keys, *Zootaxa*, **5361**, 463-496, <https://doi.org/10.11646/zootaxa.5361.4.2>.
34. Tchesunov, A. V., Nikolaeva, O. V., Rusin, L. Y., Sanamyan, N. P., Panina, E. G., Miljutin, D. M., Gorelysheva, D. I., Pegova, A. N., Khromova, M. R., Mardashova, M. V., Mikhailov, K. V., Yushin, V. V., Petrov, N. B., Lyubetsky, V. A., Nikitin, M. A., and Aleoshin, V. V. (2023) Paraphyly of Marimermithida refines primary routes of transition to parasitism in roundworms, *Zool. J. Linn. Soc.*, **197**, 909-923, <https://doi.org/10.1093/zoolinnean/zlac070>.
35. Meng, Z., Liang, H., and Wang, C. (2025) Phylogenetic analysis within Monhysteridae and Thoracostomopsidae based on rDNA sequences and two new species from the Yellow Sea, China, *Zoosyst. Evol.*, **101**, 1339-1358, doi: 10.3897/zse.101.154881.

36. Smythe, A. B., Holovachov, O., and Kocot, K. M. (2019) Improved phylogenomic sampling of free-living nematodes enhances resolution of higher-level nematode phylogeny, *BMC Evol. Biol.*, **19**, 121, <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1444-x>.
37. Andrews, S. (2010) FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data, Available online at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
38. Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014) Trimmomatic: a flexible trimmer for illumina sequence data, *Bioinformatics*, **30**, 2114-2120, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>.
39. Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A. A., Dvorkin, M., Kulikov, A. S., Lesin, V. M., Nikolenko, S. I., Pham, S., Prjibelski, A. D., Pyshkin, A. V., Sirotnik, A. V., Vyahhi, N., Tesler, G., Alekseyev, M. A., and Pevzner, P. A. (2012) SPAdes: a new genome assembly algorithm and its applications to single-cell sequencing, *J. Comput. Biol.*, **19**, 455-477, <https://doi.org/10.1089/cmb.2012.0021>.
40. Altschul, S. (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs, *Nucleic Acids Res.*, **25**, 3389-3402, <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
41. Dierckxsens, N., Mardulyn, P., and Smits, G. (2017) NOVOPlasty: de novo assembly of organelle genomes from whole genome data, *Nucleic Acids Res.*, **45**, e18, <https://doi.org/10.1093/nar/gkw955>.
42. Bernt, M., Donath, A., Jühling, F., Externbrink, F., Florentz, C., Fritzsch, G., Pütz, J., Middendorf, M., and Stadler, P. F. (2013) MITOS: improved de novo metazoan mitochondrial genome annotation, *Mol. Phylogenet. Evol.*, **69**, 313-319, <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2012.08.023>.
43. Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012) Fast gapped-read alignment with bowtie 2, *Nat. Methods*, **9**, 357-359, <https://doi.org/10.1038/nmeth.1923>.
44. Milne, I., Stephen, G., Bayer, M., Cock, P. J., Pritchard, L., Cardle, L., Shaw, P. D., and Marshall, D. (2013) Using Tablet for visual exploration of second-generation sequencing data, *Brief Bioinform.*, **14**, 193-202, <https://doi.org/10.1093/bib/bbs012>.
45. Quinlan, A. R., and Hall, I. M. (2010) BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features, *Bioinformatics*, **26**, 841-842, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>.
46. Li, B., and Dewey, C.N. (2011) RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome, *BMC Bioinformatics*, **12**, 323, <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-323>.
47. Katoh, K., and Standley, D. M. (2013) MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability, *Mol. Biol. Evol.*, **30**, 772-780, <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010>.
48. Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT, *Nucleic Acids Symp. Ser.*, **41**, 95-98.
49. Nguyen, L. (2015) IQ-TREE: a fast and effective stochastic algorithm for estimating maximum-likelihood phylogenies, *Mol. Biol. Evol.*, **32**, 268-274, <https://doi.org/10.1093/molbev/msu300>.
50. Ronquist, F., Teslenko, M., van der Mark, P., Ayres, D. L., Darling, A., Höhna, S., Larget, B., Liu, L., Suchard, M. A., and Huelsenbeck, J. P. (2012) MrBayes 3.2: Efficient Bayesian phylogenetic inference and model choice across a large model space, *Syst. Biol.*, **61**, 539-542, <https://doi.org/10.1093/sysbio/sys029>.
51. Schwarz, G. (1978) Estimating the dimension of a model, *Ann. Statist.*, **6**, 461-464, <https://doi.org/10.1214/aos/1176344136>.
52. Kumar, S., Stecher, G., and Tamura, K. (2016) MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets, *Mol. Biol. Evol.*, **33**, 1870-1874, <https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>.
53. Smythe, A. B. (2015) Evolution of feeding structures in the marine nematode order Enoplida, *Integr. Comp. Biol.*, **55**, 228-240, doi: 10.1093/icb/icv043.
54. Jeong, R., Tchesunov, A. V., and Lee, W. (2020) Two species of Thoracostomopsidae (Nematoda: Enoplida) from Jeju Island, South Korea, *PeerJ*, **8**, e9037, <https://doi.org/10.7717/peerj.9037>.
55. Gao, S., Rena, Y., Suna, Y., Wub, Z., Ruan, J., He, B., Zhang, T., Yu, X., Tian, X., and Bu, W. (2016) PacBio full-length transcriptome profiling of insect mitochondrial gene expression, *RNA Biol.*, **13**, 820-825, <https://doi.org/10.1080/15476286.2016.1197481>.
56. Araujo, N. S., and Arias, M. C. (2019) Mitochondrial genome characterization of *Melipona bicolor*: Insights from the control region and gene expression data, *Gene*, **705**, 55-59, <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.04.042>.
57. Nikolaeva, O. V., Beregovaya, A. M., Efeykin, B. D., Miroliubova, T. S., Zhuravlev, A. Y., Ivantsov, A. Y., Mikhailov, K. V., Spiridonov, S. E., and Aleoshin, V. V. (2023) Expression of hairpin-enriched mitochondrial DNA in two hairworm species (Nematomorpha), *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 11411, <https://doi.org/10.3390/ijms241411411>.
58. Lee, K. W., Okot-Kotber, C., LaComb, J. F., and Bogenhagen, D. F. (2013) Mitochondrial ribosomal RNA (rRNA) methyltransferase family members are positioned to modify nascent rRNA in foci near the mitochondrial DNA nucleoid, *J. Biol. Chem.*, **288**, 31386-31399, <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.515692>.
59. Jedynak-Slyvka, M., Jabczynska, A., and Szczesny, R. J. (2021) Human mitochondrial RNA processing and modifications: overview, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 7999, <https://doi.org/10.3390/ijms22157999>.

60. She, H., Yang, Q., Shepherd, K., Smith, Y., Miller, G., Testa, C., and Mao, Z. (2011) Direct regulation of complex I by mitochondrial MEF2D is disrupted in a mouse model of Parkinson disease and in human patients, *J. Clin. Invest.*, **121**, 930-940, <https://doi.org/10.1172/JCI43871>.
61. Blumberg, A., Sailaja, B. S., Kundaje, A., Levin, L., Dadon, S., Shmorak, S., Shaulian, E., Meshorer, E., and Mishmar, D. (2014) Transcription factors bind negatively-selected sites within human mtDNA genes, *Genome Biol. Evol.*, **6**, 2634-2646, <https://doi.org/10.1093/gbe/evu210>.
62. Dong, D. W., Pereira, F., Barrett, S. P., Kolesar, J. E., Cao, K., Damas, J., Yatsunyk, L. A., Johnson, F. B., and Kaufman, B. A. (2014) Association of G-quadruplex forming sequences with human mtDNA deletion breakpoints, *BMC Genomics*, **15**, 677, <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-677>.
63. Butler, T. J., Estep, K. N., Sommers, J. A., Maul, R. W., Moore, A. Z., Bandinelli, S., Cucca, F., Tuke, M. A., Wood, A. R., Bharti, S. K., Bogenhagen, D. F., Yakubovskaya, E., Garcia-Diaz, M., Guilliam, T. A., Byrd, A. K., Raney, K. D., Doherty, A. J., Ferrucci, L., Schlessinger, D., Ding, J., and Brosh, R. M. (2020) Mitochondrial genetic variation is enriched in G-quadruplex regions that stall DNA synthesis *in vitro*, *Hum. Mol. Genet.*, **29**, 1292-1309, <https://doi.org/10.1093/HMG/DDAA043>.
64. Chatterjee, A., Seyfferth, J., Lucci, J., Gilsbach, R., Preissl, S., Böttinger, L., Mårtensson, C. U., Panhale, A., Stehle, T., Kretz, O., Sahyoun, A. H., Avilov, S., Eimer, S., Hein, L., Pfanner, N., Becker, T., and Akhtar, A. (2016) MOF Acetyl transferase regulates transcription and respiration in mitochondria, *Cell*, **167**, 722-738.e23, <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.052>.
65. Doimo, M., Chaudhari, N., Abrahamsson, S., L'Hôte, V., Nguyen, T. V. H., Berner, A., Ndi, M., Abrahamsson, A., Das, R. N., Aasumets, K., Goffart, S., Pohjoismäki, J. L. O., López, M. D., Chorell, E., and Wanrooij, S. (2023) Enhanced mitochondrial G-quadruplex formation impedes replication fork progression leading to mtDNA loss in human cells, *Nucleic Acids Res.*, **51**, 7392-7408, <https://doi.org/10.1093/nar/gkad535>.
66. Falabella, M., Kolesar, J. E., Wallace, C., De Jesus, D., Sun, L., Taguchi, Y. V., Wang, C., Wang, T., Xiang, I. M., Alder, J. K., Maheshan, R., Horne, W., Turek-Herman, J., Pagano, P. J., St Croix, C. M., Sondheimer, N., Yatsunyk, L. A., Johnson, F. B., and Kaufman, B. A. (2019) G-quadruplex dynamics contribute to regulation of mitochondrial gene expression, *Sci. Rep.*, **9**, 5605, <https://doi.org/10.1038/s41598-019-41464-y>.
67. Mishmar, D., Levin, R., Naeem, M. M., and Sondheimer, N. (2019) Higher order organization of the mtDNA: beyond mitochondrial transcription factor A, *Front. Genet.*, **10**, 1285, <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.01285>.
68. Bratic, A., Clemente, P., Calvo-Garrido, J., Maffezzini, C., Felser, A., Wibom, R., Wedell, A., Freyer, C., and Wredenberg, A. (2016) Mitochondrial polyadenylation is a one-step process required for mRNA integrity and tRNA maturation, *PLoS Genet.*, **12**, e1006028, <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006028>.
69. Krüger, A., Remes, C., Shiriaev, D. I., Liu, Y., Spähr, H., Wibom, R., Atanassov, I., Nguyen, M. D., Cooperman, B. S., and Rorbach, J. (2023) Human mitochondria require mtRF1 for translation termination at non-canonical stop codons, *Nat. Commun.*, **14**, 30, <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35684-6>.
70. Singh, V., Moran, J. C., Itoh, Y., Soto, I. C., Fontanesi, F., Couvillion, M., Huynen, M. A., Churchman, L. S., Barrientos, A., and Amunts, A. (2024) Structural basis of LRPPRC-SLIRP-dependent translation by the mitoribosome, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **31**, 1838-1847, <https://doi.org/10.1038/s41594-024-01365-9>.
71. Ruzzenente, B., Metodiev, M. D., Wredenberg, A., Bratic, A., Park, C. B., Cámará, Y., Milenkovic, D., Zickermann, V., Wibom, R., Hultenby, K., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Brandt, U., Stewart, J. B., Gustafsson, C. M., and Larsson, N. G. (2012) LRPPRC is necessary for polyadenylation and coordination of translation of mitochondrial mRNAs, *EMBO J.*, **31**, 443-456, <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.392>.
72. Siira, S. J., Spähr, H., Shearwood, A. M. J., Ruzzenente, B., Larsson, N. G., Rackham, O., and Filipovska, A. (2017) LRPPRC-mediated folding of the mitochondrial transcriptome, *Nat. Commun.*, **8**, 1532, <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01221-z>.
73. Chang, J. H., and Tong, L. (2012) Mitochondrial poly (A) polymerase and polyadenylation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1819**, 992-997, <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.10.012>.
74. Honarmand, S., and Shoubridge, E. A. (2020) Poly (A) tail length of human mitochondrial mRNAs is tissue-specific and a mutation in LRPPRC results in transcript-specific patterns of deadenylation, *Mol. Genet. Metab. Rep.*, **25**, 100687, <https://doi.org/10.1016/j.ymgmr.2020.100687>.
75. Temperley, R. J., Wydro, M., Lightowers, R. N., and Chrzanowska-Lightowers, Z. M. (2010) Human mitochondrial mRNAs-like members of all families, similar but different, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1081-1085, <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.02.036>.
76. Moran, J. C., Brivanlou, A., Brischigliaro, M., Fontanesi, F., Rouskin, S., and Barrientos, A. (2024) The human mitochondrial mRNA structurome reveals mechanisms of gene expression, *Science*, **385**, eadm9238, <https://doi.org/10.1126/science.adm9238>.

**GENE ORDER IN MITOCHONDRIAL DNA
AFFECTS THE ABUNDANCE OF THEIR TRANSCRIPTS
(A CASE OF MARINE NEMATODES)**

O. V. Nikolaeva¹, A. S. Ovcharenko^{1,2}, P. V. Khorkhordina^{1,2}, T. S. Miroliubova^{1,3},
N. S. Sadovskaya¹, V. A. Scobeyeva^{1,2}, N. P. Sanamyan⁴, E. G. Panina⁵,
K. V. Mikhailov^{1,6}, L. Yu. Rusin⁶, A. V. Tchesunov^{1,2}, and V. V. Aleoshin^{1,2,6*}

¹ Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
119234 Moscow, Russia; e-mail: Aleshin@genebee.msu.su

² Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

³ Severtsov Institute of Ecology and Evolution, Russian Academy of Sciences, 119071 Moscow, Russia

⁴ Kamchatka Branch of the Pacific Institute of Geography,
Far Eastern Branch of the Russian Academy of Sciences, 683000 Petropavlovsk-Kamchatsky, Russia

⁵ Zoological Institute, Russian Academy of Sciences, 199034 Saint Petersburg, Russia

⁶ Kharkevich Institute for Information Transmission Problems, Russian Academy of Sciences,
127051 Moscow, Russia

Mitochondrial genomes of most animals contain the same set of genes, with all or many protein-coding genes (PCGs) arranged in the same order, forming conserved blocks termed syntenies. Some syntenies have been preserved for hundreds of millions of years and are found in both vertebrates and invertebrates. This evolutionary conservation indicates a functional role for PCG arrangement; however, the biochemical and/or physiological mechanisms by which gene order in mtDNA affects viability are unknown. Among animals, there are taxa that have completely lost conserved syntenies in mtDNA. Canonical animal syntenies in mtDNA had not been reported in nematodes, until some were recently discovered in previously unstudied nematode taxa, including the marine family Thoracostomopsidae (Nematoda, Enoplida). We sequenced the complete mitochondrial genomes of three thoracostomopsid species, determined the gene order and their expression levels from RNA-seq data integrated for the family representatives in all available databases. It was found that six species of the Thoracostomopsidae reveal three distinct patterns of PCG arrangement, where relative mRNA levels correlate with gene order rather than species phylogeny. We hypothesize that the influence of PCG translocations on their expression levels underlies the long-term preservation of mitochondrial syntenies among animals.

Keywords: mtDNA, mitogenome, transcriptome, genome sequencing, RNA-seq, molecular evolution, phylogeny, nematodes, Enoplia, Thoracostomopsidae, *Enoplolaimus*, *Marimermis*, *Thoracostomopsis*, *Trileptium*