


МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ХАРКІВСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені В.Н. КАРАЗІНА
Біологічний факультет
Кафедра зоології та екології тварин


Кваліфікаційна робота
здобувачки другого (магістерського) рівня вищої освіти
за темою:

**ЕВОЛЮЦІЯ МІТОХОНДРІАЛЬНОГО ГЕНОМУ У СВІТЛІ
ЦИТОНУКЛЕАРНОЇ НЕСУМІСНОСТІ ТА ГІБРИДИЗАЦІЇ НА
ПРИКЛАДІ РОДУ *VIPERA* (LAURENTI, 1768)**

Спеціальність (спеціалізація) 091 Біологія та біохімія
Освітня програма Біологія

Виконавець: _

Олена Іванова

Науковий керівник: _

Олександр Зіненко

Харків 2025

АНОТАЦІЯ

Іванова О.О. Еволюція мітохондріального геному у світлі цитонуклеарної несумісності та гібридизації на прикладі роду *Vipera* (Laurenti, 1768). – Магістерська кваліфікаційна робота. – Харківський національний університет імені В. Н. Каразіна, кафедра зоології та екології тварин, Харків, 2025.

Магістерська робота викладена на 83 сторінках, що включає в себе наступні розділи: зміст, вступ, основну частину, висновки та список використаної літератури. Дана робота включає 7 рисунків, 134 використаних джерела та 3 додатки.

Швидка молекулярна еволюція мітохондріального геному в порівнянні з ядерним, а також глибока інтеграція ядерних та мітохондріальних геномів у клітинному метаболізмі створює цікаву систему, що потенційно коєволюціонує і створює бар'єри для міжвидової гібридизації. Ми досліджували геноми кількох видів гадюк роду *Vipera* і шукали передумови для цитонуклеарної несумісності у міжвидових гібридів і коєволюції всередині виду.

Трансляція мітохондріального гена COX I у представників роду *Vipera* продемонструвала наявність переважно поодиноких та консервативних замін, що вказує на відсутність потреби у компенсаторній коєволюції між мітохондріальними та ядерними компонентами комплексу IV та з високою імовірністю на взаємну функціональну сумісність мітохондріальних і ядерних геномів гадюк роду *Vipera*, підтвердженням чому є велика кількість міжвидових гібридів.

Також нами було охарактеризовано ядерну ДНК мітохондріального походження (NUMT) у геномах гадюк роду *Vipera*, було показано можливість використання NUMT як філогенетичних маркерів для уточнення положення спірного таксону *Vipera anatolica* в межах роду. Застосовано філогенетичний аналізу методом Maximum Likelihood,

проведено картування виявлених фрагментів у межах третьої хромосоми *Vipera ursinii*, аналіз гомології NUMT між *V. anatolica* та *V. ursinii*.

Ядерна копія мітохондріального геному складається з чотирнадцяти гомологічних фрагментів мітохондріального походження на третій хромосомі *V. ursinii*. На основі отриманих даних запропоновано модель постінтеграційної еволюції NUMT-фрагментів, що описує імовірні шляхи дуплікації, інверсії та фрагментації після закріплення в ядерному геномі. Виявлення гомологічних NUMT у *V. anatolica* та *V. ursinii* розглядається як свідчення їх спільної еволюційної історії та надає підтримку гіпотезі про належність *V. anatolica* до комплексу *V. ursinii-renardi* і підтримує сценарій, за яким мітохондріальний геном виду міг був бути запозиченим від спорідненого таксону внаслідок гібридизації та мітохондріальної інтрогресії.

У якості матеріалу для дослідження були використані опубліковані послідовності мітохондріальних та ядерних геномів представників роду *Vipera*, а також неопублікована раніше послідовність NUMT *V. anatolica*, отримана від Зіненко О.І.

Наукова новизна роботи полягає в першості проведення системного дослідження NUMT у представників роду *Vipera*; до цього часу ці структури не описувалися та не розглядалися в контексті категоріальних філогенетичних маркерів для цієї групи. Практичне значення отриманих результатів полягає в можливості використання NUMT як нового типу філогенетичних даних для філогенетичних та популяційно-генетичних досліджень роду *Vipera*. Запропонований підхід може бути адаптований для ревізії таксонів, що демонструють ретикулярну еволюційну історію.

Ключові слова: мітохондріальний геном, *Vipera*, NUMT, цитонуклеарна коєволюція, філогенетичні маркери.

ЗМІСТ

АНОТАЦІЯ.....	2
ЗМІСТ.....	4
ВСТУП.....	6
Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ.....	9
1.1. Еволюційна динаміка мітохондріального геному.....	9
1.1.1. Особливості структури й успадкування мтДНК.....	9
1.1.2. Виникнення та редукція геному мітохондрій.....	12
1.1.3. Перенесення генів у процесі еволюції: EGT, гіпотеза кДНК і масового потоку.....	13
1.2. Особливості організації мітохондріального геному змії.....	15
1.3. Цитонуклеарна коеволюція.....	16
1.3.1. Теоретичні основи цитонуклеарної коеволюції.....	16
1.3.2. Гіпотеза ядерної компенсації (nuclear compensation hypothesis)...	19
1.3.3. Цитонуклеарна несумісність: гібридизація та видоутворення.....	20
1.3.4. Мітохондріальна інтрогресія.....	23
1.4. Морфологічні та філогенетичні особливості гадюк роду <i>Vipera</i>	24
1.4.1. Рід <i>Vipera</i>	24
1.4.2. <i>Vipera anatolica</i>	26
1.5. NUMT.....	29
1.5.1. Загальна характеристика.....	29

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ.....	59
ПОДЯКИ.....	78
ДОДАТКИ.....	79

ВСТУП

Однією з фундаментальних проблем сучасної науки є втрата інформації про попередні стани складних систем. У фізиці ця проблема проявляється у вигляді інформаційного парадоксу чорних дір - концептуальної проблеми взаємодії квантової механіки та загальної теорії відносності; згідно із теорією, дані про речовину, що потрапляє за горизонт подій, зникають без можливості відновлення [1]. Це суперечить уявленню про те, що у квантових процесах інформація має зберігатися, і ставить під питання саму оборотність фундаментальних законів природи [2]. У біології це проблема неможливості точного повного відновлення еволюційних шляхів організмів: сучасний геном будь-якого організму є результатом тривалого процесу мутацій, дуплікацій, втрат та рекомбанації, що безповоротно знищили інформацію про попередні стани. Це явище можна визначити як ефект стирання шляху: еволюційні процеси, подібно до чорних дір, зберігають лише кінцевий результат, видимий для спостерігача, але “стирають” будь-які відомості про конкретні стани, що до нього призвели. Як безлике випромінювання Гокінга не несе повних відомостей про тип та стан матерії, що були зтягнуті за горизонт подій, так і геном містить лише непрямі відбитки давніх еволюційних подій.

У цьому контексті багатогеномна система еукаріотичної клітини може розглядатися як виняткова модель для аналізу втрат та трансформації інформації. Її утворення внаслідок ендосимбіотичної інтеграції супроводжувалося глибокою редукцією мітохондріального геному та перенесенням значної частини генів до ядра, що в результаті сформувало складну цитонуклеарну взаємодію, у якій функціонування клітини стало залежним від узгодженої роботи декількох геномних систем [3,4]. Однак не варто розглядати цю подію як феномен далекого минулого, оскільки цей процес триває і нині, періодично проявляючись у вигляді інтеграції фрагментів мітохондріальної та пластидної ДНК в ядерний геном. Такі

послідовності, відомі як ядерно-мітохондріальні вставки (NUMTs), є свідченнями безперервності потоку інформації між геномами клітини та можуть бути використані як “молекулярні скам’янілості” та додаткові маркери еволюції.

Застосування таких маркерів має значення у вивченні груп із сітчастою еволюційною історією, де традиційні філогенетичні підходи не завжди дозволяють реконструювати послідовність подій. Однією із таких груп є євразійські гадюки роду *Vipera*, представники якого зазнали багаторазових подій гібридизації, мітохондріальної інтрогресії та локальної адаптації [5].

Аналіз таких подій вимагає врахування ще одного виміру – цитонуклеарної коєволюції, адже ефективність роботи дихального ланцюга залежить від узгодженої взаємодії білкових субодиниць, чиї амінокислотні послідовності кодуються різними геномами клітини [3]. Під час інтрогресії мітохондріальних гаплотипів узгодження може бути порушеним через невідповідність запозичених мітохондріальних варіантів коєволюційно оптимізованим ядерним партнерам [4,5]. Результатом є явище цитонуклеарної несумісності, що проявляється зниженням ефективності енергетичного метаболізму та утворенням репродуктивних бар’єрів. Перевірка можливості таких конфліктів можлива за допомогою методів, спрямованих на оцінку структурної та функціональної консервативності мітохондріальних білків та їх узгодженість із ядерними компонентами дихального ланцюга.

Таким чином актуальність дослідження визначається потребою комплексного підходу до аналізу взаємодії між мітохондріальним та ядерним геномами, зокрема через врахування NUMT як джерела додаткової інформації про філогенетичні зв’язки всередині роду, напрямки інтрогресій та гібридизації, а також дослідження структурної консервативності білкових продуктів мітохондріального геному (зокрема COX I) для оцінки можливих проявів цитонуклеарної несумісності.

Метою даної роботи є дослідження закономірностей молекулярної коеволюції у представників роду *Vipera* на прикладі гену великої субодиниці цитохром оксидази (COX I). Для досягнення мети передбачено розв'язання таких завдань:

- перевірити нейтральність еволюції досліджуваної ділянки мітохондріального геному за допомогою стандартних тестів на нейтральність та оцінити можливі відхилення від нейтральної моделі;
- перевірити амінокислотну послідовність гену COX I на наявність радикальних амінокислотних замінів у різних представників роду, описати їх характер, частоту та можливий функціональний ефект;
- охарактеризувати ядерні копії мітохондріального походження (NUMTs) у степових та лучних гадюк, їх структуру, потенційне джерело та можливі механізми отримання;
- на основі отриманих даних перевірити низку гіпотез про родинні відносини між *Vipera anatolica* та представниками комплексу *V. ursinii-renardi*, запозичення мітохондріального геному в ході інтрогресії тощо.

Теоретична цінність полягає у поглибленні уявлень про процеси взаємодії ядерного та мітохондріального геному та інтерпретації NUMT як маркерів еволюційних процесів, доповнених аналізом варіабельності COX I як індикатора потенційних цитонуклеарних конфліктів. Практичне значення дослідження виявляється у можливості використання NUMT для розв'язання філогенетичних суперечностей у групах із ретикулярною історією.

Розділ 1. ОГЛЯД І АНАЛІЗ НАУКОВОЇ ЛІТЕРАТУРИ

1.1. Еволюційна динаміка мітохондріального геному

1.1.1. Особливості структури й успадкування мтДНК

Мітохондрія – напівавтономна органела еукаріотичних клітин, основною функцією якої є синтез АТФ шляхом окисного фосфорилування. Походження мітохондрій імовірно пов'язане із давньою подією ендосимбіозу предка еукаріотів із організмом, подібним на α -протеобактерію [3]. Мітохондріальна ДНК (мтДНК) представляє собою генетичний матеріал еукаріот, локалізований у мітохондріях. На відміну від ядерної ДНК, вона має ряд структурних та функціональних особливостей. У процесі еволюції геном мітохондрії зазнав значної редукції — із тисяч бактеріальних генів залишилося лише кілька десятків, тоді як решта були передані до ядерного геному або втрачені [3,4]. Така редукція пов'язана з функцією органели: у мтДНК зберігаються лише гени, продукти яких (зокрема білки дихального ланцюга) потребують локального контролю експресії або є настільки гідрофобними, що їх імпорт із цитозолу неможливий [4]. У залежності від структури молекули (лінійна чи кільцеподібна), розміру, наявності інтронів чи плазмідоподібних структур та гомогенності чи гетерогенності генетичного матеріалу, виділяють шість основних типів мітохондріальних геномів [6].

Зазвичай при згадці про мтДНК мають на увазі мтДНК першого типу, притаманну для двосторонньо-симетричних тварин - кільцеву молекулу довжиною 11-50 тис. пар основ, яка, за деякими винятками, кодує 37 генів: 13 білкових (NAD1–6, NAD4L; CYTB; COX1–3; ATP6 and 8), 22 гени тРНК та 2 гени рРНК [7]. Інтрони зазвичай відсутні, єдиним винятком є ген COX1 у кільчастих черв'яків *Nephtys sp* [8]. Для мтДНК першого типу притаманна мінімальна кількість міжгенних ділянок, що зазвичай обмежуються так званими контрольними ділянками, які містять сайти початку реплікації. Синтенія здебільшого є досить консервативною, хоча

деякі таксономічні групи, наприклад *Mollusca*, є більш схильними до радикальних перебудов архітектури мітогеному, ніж інші [9]. У межах хордових (*Chordata*) організація мітогеномів хребетних є висококонсервативною, тоді як у асцидій є гіперваріабельною. Перебудови генів між відносно близькоспорідненими таксонами зазвичай включають гени тРНК (але не тільки) і особливо часто зустрічаються навколо контрольних ділянок [6].

Другий тип організації мтДНК являє собою кільцеву молекулу розміром 19-1000 тис. пар нуклеотидів з інтронами, тандемними повторами та додатковими ORF (відкритими рамками зчитування); кількість генів коливається від 40 до 156. Розміри мітогеномів цього типу можуть варіювати навіть всередині виду через динамічність інтронів, як це було відмічено у грибів [10]. До цього типу належить найбільший секвенований мітогеном рослини - смілки конічної *Silene conica* - розміром $\approx 11,3$ Мб [11]. Попри гігантські розміри, набори білків, що кодуються, є відносно консервативними [6]. Окрім грибів та рослин, другий тип організації також властивий деяким протистам із групи хоанофлагелат, наприклад морському одноклітинному *Monosiga brevicollis* [12]. Третій тип загалом нагадує другий, але при цьому містить додаткові плазмидоподібні структури та/або лінійні молекули [13].

Четвертий та шостий типи представлені гетерогенними наборами молекул відповідно кільцевої чи лінійної форми розміром 1 до 200 тис. пар основ. Гени розподілені між різними молекулами, і для формування повноцінних транскриптів потрібна складна посттранскрипційна обробка, зокрема редагування РНК та з'єднання продуктів транскрипції з різних молекул. Класичним прикладом є *Diplonema papillatum* (*Euglenozoa:Diplonemea*) у якого гени розділені на численні часткові сегменти, а зрілі мРНК формуються шляхом злиття транскриптів, отриманих із молекул різного походження [6,14, 15]. Серед багатоклітинних організмів подібна структура виявлена у деяких видів

вошей (*Insecta: Phthiraptera*), чий мітогеном має кілька варіантів, що включають повнорозмірну хромосому з 37 генами та набір гетерогенних мінікільцевих молекул, набір мінікільців, менших за розміром, ніж повна хромосома, з однією короткою контрольною областю або набір мінікільців, що несуть 1-3 гени з довгою складною контрольною областю [16].

П'ятий тип включає лінійні однокомпонентні мітохондріальні геноми, які незалежно виникли в кількох філогенетичних гілках: у деяких інфузорій (*Tetrahymena pyriformis*, *Paramecium aurelia*), апікомплексів (*Plasmodium* та споріднені види), грибів, зелених водоростей (*Chlamydomonas spp.*) та у деяких кнідарій [6,11,17]. Для стабілізації кінців таких молекул використовуються різні варіанти «теломерних» структур: шпильки з ковалентно замкненої ДНК (наприклад, у *Paramecium aurelia*, дріжджів *Pichia pijperii*), кластери коротких повторів (у *Fusarium*), інвертовані повтори чи довгі одноланцюгові послідовності на 3'-кінцях (у *Chlamydomonas reinhardtii*), а також складні комбінації повторів (у *Theileria parva*, *Amoebidium parasiticum*) [18]. В окремих випадках функцію стабілізації виконують білки, ковалентно зв'язані з 5'-кінцями молекули, як це спостерігається у мітохондріальних плазмидах грибів.

Для більшості еукаріот характерне материнське успадкування мтДНК: зигота отримує лише мітохондрії, що знаходяться у цитоплазмі яйцеклітини, у той час як батьківські елімінуються шляхом деградації. Однак деяким грибам, зокрема дріжджам, притаманне біпарентальне успадкування, під час якого в зиготі опиняються дві мітохондріальні лінії, отримані від обох батьків, одна (зазвичай та, що походить від меншої клітини) з яких пізніше елімінується [10]. Для двостулкових молюсків характерним є подвійне уніпарентальне успадкування, за якого поряд із материнським мітохондріальним геномом (F-тип) існує чоловічий геном (M-тип), що передається сперматозоїдами. У самок M-мітохондрії розподіляються хаотично та елімінуються, тоді як у самців вони формують окремий агрегат і зберігаються в гермінативній лінії. У дорослих особин

соматичні тканини містять переважно F-геном, тоді як сперматозоїди — лише M-геном, який експресується під час сперматогенезу. Обидва геноми мають однакову організацію, але відрізняються послідовністю на 20–40% і темпами еволюції, при цьому M-геном підлягає слабшим селективним обмеженням [19]. Рослинам притаманні як материнське, так і біпарентальне (рід *Pelargonium*) або винятково батьківське успадкування, як у *Sequoia sempervirens* [20,21].

1.1.2. Виникнення та редукція геному мітохондрій

Практично всі еукаріотичні організми, проаналізовані на сьогодні, мають мітохондрії або органели, що походять від мітохондрій, за надзвичайно рідкісними винятками, що виникають внаслідок вторинної втрати, як у оксимонади *Monocercomonoides sp.* [22]. Питання виникнення мітохондрій належить до фундаментальних проблем біології, оскільки безпосередньо пов'язане із розумінням ранньої еволюції еукаріотичних організмів та розвитку складних форм життя на Землі. Наразі більшість дослідників дотримуються так званої ендосимбіотичної теорії походження мітохондрій, згідно з якою усі мітохондрії походять від спільної предкової органели, яка виникла в результаті інтеграції альфапротеобактерії в клітину-хазяїна, споріднену з сучасними асгардськими археями. Більшість сценаріїв походження та ранньої еволюції еукаріотів надають мітохондріальному ендосимбіозу вирішальну роль [23].

Питання часу виникнення мітохондрій як органел та зв'язок із еукаріогенезом (виникненням оформленого ядра) досі залишається відкритим. Зокрема, яку роль відіграв предок мітохондрій, який ініціював ендосимбіоз? Виникли мітохондрії одночасно з появою ядра або після неї? Аналіз скам'янілостей акантоморфних акритархів, знайдених в Індії, свідчить про те, що приблизно 1,63 млрд років тому організми мали складний цитоскелет, функціонування якого енергетично уможлилювала лише наявність мітохондрій, що означає, що ці органели виникли раніше [24]. Датування цієї події методами молекулярного годинника дають

приблизні оцінки від 1,8 млрд років (що узгоджується із появою LECA -останнього спільного предка еукаріот) до 2,3 млрд років [25]. Вищі оцінки засновані на події Кисневої катастрофи (Great Oxidation Event) - різкому зростанні рівня кисню в атмосфері та воді, що відбулося 2.2-2.5 млрд років тому та супроводжувалося масовим вимиранням анаеробів, що домінували в тогочасних екосистемах [26]. Таким чином, виникнення мітохондрій може розглядатися як відчайдушний еволюційний крок, спрямований на адаптацію до ворожої кисневої атмосфери.

1.1.3. Перенесення генів у процесі еволюції: EGT, гіпотеза кДНК і масового потоку

Ключовим наслідком подальшого переходу від ендосимбіонта до органели стала редукція геному мітохондрій, що у сучасних еукаріотів складається лише з невеликої частки від колишнього бактеріального, здебільшого від 3 (у *Chromera velicia*) до 66 генів (у *Andalucia godoyi*), необхідних переважно для кодування ключових елементів дихального ланцюга та апарату трансляції, тоді як решта білків кодуються ядерним геномом та транспортуються в органелу спеціалізованими системами імпорту [3, 27].

Скорочення пулу генів організмів, що переходять до паразитичного та ендосимбіотичного способу життя є повторюваним явищем, що декілька разів незалежно виникало у кількох одноклітинних еукаріотів, які перейшли до облігатно внутрішньоклітинного способу життя [28] та у величезній різноманітності бактеріальних та архейних ендосимбіонтів, які незалежно походять від дивергентних філогенетичних ліній та зустрічаються у широкому діапазоні господарів [27]. Sloan et al. наводить щонайменше три можливі механізми, за якими відбувається скорочення: пряма втрата через послаблений відбір генів, які є надлишковими щодо організму-господаря/ядра або непотрібними у внутрішньоклітинному контексті; ендосимбіотичний перенос генів (EGT) до ядра (також відомий як внутрішньоклітинний перенос генів (IGT)); рекрутинг та перебудова вже

наявних ядерних генів для заміни функцій ендосимбіонтів/органел [27,29]. Порівняння вмісту мітогеномів у різних таксономічних групах еукаріотів дозволяє оцінити “втрати”, що відбулися в результаті редукції.

Історія втрати мітохондріальних генів розділяється на дві загальні фази [30]. Перша - значна редукція, що передує останньому спільному предку еукаріотів (LECA), після якої всі відомі мітогеноми мають певну підмножину невеликого пулу з 69 предкових білок-кодуючих генів, що є незначною часткою з більш ніж 1000 генів, які, за оцінками, були присутні в бактеріальному попереднику мітохондрій [27,31]. Друга фаза редукції мітогеному є гетерогенною з варіаціями як у часі, так і в різних філогенетичних лініях, і триває до сьогодні. Для окремих груп організмів поточний вміст мітохондріальних генів формувався тривалими періодами стазису, що переривався епізодами прискореної втрати генів. Прикладом може слугувати дивергенція двосторонньо-симетричних тварин, де специфічні для групи втрати та перенесення призвели до утворення сильно скороченого набору лише з 13 генів, що кодують білки, який залишається висококонсервативним протягом сотень мільйонів років [27].

Ендосимбіотичний перенос генів (EGT) вважають одним із ключових механізмів, що сприяв успішній інтеграції ендосимбіонта та втраті автономності мітохондрій. Для пояснення механізму цього процесу було запропоновано декілька гіпотез. Одна з них - гіпотеза кДНК (сDNA hypothesis) передбачає передачу генів з мітохондрій до ядра не напряму, а через стадію РНК-посередника: мРНК із мітохондрій транспортується із органел до ядра, де перетворюється на кДНК та вбудовується в геном [32]. Хоча цей сценарій вважають рідкісним, він був підтриманий дослідженнями у квіткових рослин, де було виявлено ядерні копії мітохондріальних генів, позбавлені органелярних інтронів і специфічних сайтів сплайсингу. Це свідчить, що вони походять саме від зрілих мРНК, а не від прямого перенесення ДНК [33]. Існує і альтернативна точка зору -

гіпотеза масового потоку (*massive gene flow*) - основним носієм генетичного матеріалу для перенесення є ДНК, а не мРНК. Великі об'єми мітохондріального генетичного матеріалу вивільнялися під час руйнування органел внаслідок аутофагії, гаметогенезу, клітинного стресу, тощо [34]. Подальше включення мтДНК до ядерного геному відбувалося під час репарації із залученням механізму негомологічного з'єднання кінців. Свідченням на користь цієї гіпотези є наявність у ядерних геномах кластерів органелярних послідовностей, що важко пояснити одиничними випадковими інтеграціями [27,34].

1.2. Особливості організації мітохондріального геному змій

Мітохондріальні геноми змій є одними із найбільш варіабельних серед хребетних за структурною організацією та еволюційною пластичністю. У типовому стані мітогеном змій представлений кільцеподібною молекулою ДНК довжиною приблизно 16-18 тисяч пар нуклеотидів, що містить 13 білок-кодуєчих генів, 22 тРНК, 2 рРНК та контрольну ділянку (*D-loop*), що забезпечує ініціацію реплікації. Мітогеноми змій містять низку характеристик, незвичайних для хребетних: дубльовані контрольні області (мутація, що виникла та стабільно підтримується у більшості родин змій понад 70 млн років), підвищену швидкість еволюції порівняно з ядерною ДНК, укорочення генів тРНК та стоп-кодонів у білок-кодуєчих генах [35,36].

Аналіз Qian et. al показує виникнення одинадцяти типів незалежних структурних перебудов, що виникали протягом еволюції змій. “Гарячою точкою змін” є контрольна ділянка та гени тРНК, що її оточують. Особливо помітними ці процеси є серед представників *Alethinophidia*, у яких зафіксовано випадки дуплікації контрольного регіону та переміщення тРНК-Pro і тРНК-Phe [37]. До перебудов, імовірно, залучений механізм «дуплікації-рандомної втрати» (*duplication-random loss*), що супроводжується нерівномірною реплікацією та нерівноважними точками

відновлення молекули [35]. Перебудови та зміни порядку генів є поліфілетичними та виникали незалежно у різних філогенетичних лініях [37].

Мітогеном більшості представників *Viperidae* за класифікацією Qian et. al належить до групи III-B та характеризується дуплікацією контрольної ділянки та двома транслокаціями тРНК лейцину (між CR2 та тРНК glutаміну) та проліну (між тРНК ізолейцину та CR2) [35]. Представлена у звіті Gao D. та співавторів анотація мітогеному *V. berus* є гарною ілюстрацією типової організації мітохондріального геному гадюкових. Мітохондріальний геном *V. berus* має кільцеву форму 16 370 п.н. завдовжки та містить 13 генів, що кодують білки (PCG), 22 гени транспортної РНК (тРНК) та два гени рибосомної РНК. Загальний нуклеотидний склад: 32,2% А, 27,1% Т, 28% С, 12,6% G, із загальним вмістом G+C 40,6%; послідовності тРНК довжиною від 58 до 72 п.н. Більшість генів тРНК розташовані на Н-ланцюзі. Як велика, так і мала рибосомна РНК кодуються на Н-ланцюзі, їх розмір становить 1480 та 913 пар основ [38].

1.3. Цитонуклеарна коеволюція

1.3.1. Теоретичні основи цитонуклеарної коеволюції

Набуття еукаріотичною клітиною мітохондрій та хлоропластів із подальшим перенесенням більшості їх генетичного матеріалу до ядра породило явище узгодженої взаємодії між ядерним та органелярним геномами. Співіснування в клітині декількох геномних систем пов'язане із низкою проблем: необхідність наявності систем активного імпорту білків з цитоплазми до мітохондрій для підтримання їх життєдіяльності та функцій; кожна клітина містить кілька мітохондрій (від декількох десятків до тисяч на соматичну клітину), кожна з яких потребує точної кількості молекулярних факторів, кодованих ядерною ДНК; мутації у мтДНК можуть призводити до співіснування в клітині\тканині\організмі кількох популяцій мітохондрій - явища гетероплазмії [39]. Крім цього варто

відзначити неоднорідність швидкості накопичення мутацій в ядерній та мітохондріальній ДНК: у тварин мтДНК еволюціонує на порядок (приблизно у 10 разів) швидше, ніж ядерна ДНК [27,39]. Така асиметрія зумовлює тиск на ядерні гени, що кодують білки мітохондріальних комплексів, змушуючи їх постійно “підлаштовуватися” у відповідь на динамічні зміни в мтДНК.

Класичним прикладом довготривалої та узгодженої взаємодії між геномними системами слугують ферментні комплекси ланцюга транспорту електронів та ОХРНОС [40]. У мітохондріях окисне фосфорилування здійснюється п'ятьма мультисубодиничними ферментними комплексами (I–V), що вбудовані у внутрішню мітохондріальну мембрану. Комплекси I–IV переносять електрони (e^-) від NADH або сукцинату до молекулярного кисню, створюючи при цьому градієнт протонів (H^+) через внутрішню мембрану мітохондрій. Цей енергетичний градієнт використовується комплексом V (АТФ-синтазою) для синтезу АТФ з АДФ та неорганічного фосфату [40,41]. Такі комплекси є місцем тісної взаємодії генів, які зазнають впливу різних рівнів мутаційної активності, ефективного розміру популяції та механізмів спадковості. Загальна гіпотеза коеволуції полягає в тому, що висока швидкість мутацій та/або неефективний природний добір проти слабо шкідливих мутацій сприяють швидкій еволюції мітохондріальних геномів, що, у свою чергу, створює селекційний тиск на зміни у ядерно-кодованих білках, а також у структурі та складі ферментних комплексів. З цієї точки зору цитоплазматичні геноми виступають первинними «рушіями» цитонуклеарної коеволуції, тоді як ядерні геноми є основними «реципієнтами» [27].

Ця взаємодія проявляється не лише у ко-експресії ядерних та мітохондріальних генів, але і віддзеркалена у структурній організації мітохондріальних білкових комплексів, що у порівнянні із своїми бактеріальними аналогами були значною мірою перебудовані та розширені завдяки залученню ядерно-кодованих «надлишкових»

субодиниць, специфічних для еукаріотів (supernumerary subunits), що з'явилися після ендосимбіозу [27]. Більшість цих “надлишкових” субодиниць були додані ще до виникнення останнього спільного еукаріотичного предка (LECA), що збігається з періодом EGT [42]. Наприклад, мітохондріальний ОХРНOS-комплекс I (NADH:убіхіноноксидоредуктаза) має лише 14 субодиниць у сучасних бактерій, в той час як у мітохондріях ссавців та покритонасінних рослин він розширився до 45 та 49 субодиниць відповідно [27], при цьому щонайменше 26 із них є еукаріотично-специфічними та з'явилися ще до розходження основних еукаріотичних ліній [43]. Походження доданих субодиниць частково простежується до дуплікацій вже існуючих генів із інших мітохондріальних комплексів або навіть інших субодиниць у тому ж ферментному комплексі, однак при цьому 21 з набутих субодиниць у комплексі I ссавців не мають жодних ідентифікованих гомологів поза еукаріотами [27,44]. Щодо функції додаткових субодиниць існувало кілька гіпотез, однак нині найбільш поширеною гіпотезою є ідея про залучення цих структур для стабілізації, правильної збірки та регуляції ОХРНOS-комплексів. Ця ідея підкріплюється дослідженням Stroud et al. з нокауту надлишкових субодиниць в комплексі I: виявлено, що 25 субодиниць (81% від проаналізованих) необхідні для належного складання комплексу, а їх втрата загалом впливає на стабільність сусідніх білків [45]. Надлишкові білкові елементи залучені до формування суперкомплексів, що покращує ефективність транспорту електронів та зменшує вироблення реактивних форм кисню (ROS) [27]. Деякі можуть мати специфічні функції, наприклад, сприяти адаптації до гіпоксії [46]. Також було запропоновано, що залучення нових субодиниць служить формою компенсаторної коеволюції, яка компенсує вплив слабо шкідливих змін у цитоплазматичних генах. Згідно з цією моделлю, після того, як у цитоплазматично кодованих субодиницях відбуваються слабкошкідливі та дестабілізуючі зміни, відбувається відбір для залучення абсолютно нових субодиниць до

комплексу для забезпечення структурної стабілізації [47]. Альтернативна модель передбачає, що залучення субодиниць спочатку було нейтральним, але воно також змінило ландшафт пристосованості для подальших мутацій у основних мітохондріально кодованих субодиницях, і деякі мутації, які в іншому випадку б порушили стабільність комплексу, могли б потім виникнути та нейтрально поширитися шляхом генетичного дрейфу без шкідливих наслідків, тим самим «фіксує» функціональну важливість раніше неадаптивних численних субодиниць [27].

1.3.2. Гіпотеза ядерної компенсації (nuclear compensation hypothesis)

Одним із ключових механізмів, що пояснюють збереження функції мітохондрій попри накопичення мутацій у мтДНК, є гіпотеза ядерної компенсації (nuclear compensation hypothesis). Згідно з класичними уявленнями, мітогеноми мають бути особливо вразливими до дії “храповика Мюллера” у зв’язку із клональним розмноженням без рекомбінації та уніпарентальним спадкуванням, а отже схильністю до накопичення шкідливих мутацій [48]. Згодом такий процес мав би призвести до руйнування білків дихального ланцюга, але у реальності загального зниження ефективності функції мітохондрій не спостерігається [48,49].

Для пояснення цього феномену було висунуто припущення про існування механізму компенсації шкідливих змін в мтДНК через зміни у ядерно-кодованих генах, що залучені до функціонування мітохондрій. Було запропоновано два основні шляхи здійснення такого процесу:

- через зміни в амінокислотних послідовностях у ядерно-кодованих білках, які б через зміну своєї конформації могли нейтралізувати або полегшувати дисфункції, спричинені мутаціями в мтДНК [39,40];
- через рекрутинг додаткових ядерно-кодованих субодиниць до складу мітохондріальних комплексів, що стабілізують структуру та функцію ферментів, як описано у попередньому пункті.

Незважаючи на ґрунтовну теоретичну базу, прямі докази, що підтверджують ядерну компенсацію, рідкісні. Аналіз Weaver et al., проведений на даних 58 видів ссавців, показав, що еволюційні швидкості мітохондріальних генів тісно корелюють зі швидкостями ядерно-кодованих білків, які взаємодіють із ними, тоді як для інших ядерних генів такої тенденції не виявлено [50]. Автори відмітили, що темпи амінокислотних замін mt-генів і N-mt білків дуже сильно корелюють ($r_s \approx 0,82$) навіть після нормалізації на загальні ядерні швидкості еволюції. При цьому ядерні гени, що не взаємодіють із мітохондріями (контрольні N-гени), демонструють слабкі або відсутні кореляції з mt-генами. Додатково було відмічене підвищення значення dN/dS у N-mt генів порівняно з mt-генами [50]. Аналіз Hill зазначає, що сильні кореляції спостерігаються здебільшого у видів із високим метаболічним навантаженням, що у свою чергу може свідчити про контекст-залежну природу коеволюційних процесів [48].

Але в той самий час дослідження просторово-часових закономірностей та варіативності патернів змін у різних лініях тварин ставлять під сумнів ідею про домінуючу роль ядерної компенсації у мітонуклеарних взаємодіях. Дослідження закономірності еволюції послідовностей 79 субодиниць OXPHOS у 31 виді двостулкових молюсків продемонструвало чіткі сигнали мітонуклеарної коеволюції, проте не виявило доказів ядерної компенсації: субодиниці, кодовані мітохондріями, показали подібні співвідношення dN/dS порівняно з субодиницями, кодованими ядром, а в генах nuOXPHOS не було виявлено жодних сайт-специфічних сигналів компенсаторного позитивного відбору [51].

У висновку можна стверджувати що коеволюція може реалізовуватися не лише через ядерну компенсацію, але й через інші механізми: спільні адаптивні зміни обох геномів, компенсацію всередині мітохондріального геному (mt–mt), або ж більш нейтральні структурні зміни [50].

1.3.3. Цитонуклеарна несумісність: гібридизація та видоутворення

Цитонуклеарна несумісність є особливою формою генетичної конфліктної взаємодії між мітохондріальними та ядерними геномами, коли алелі одного геному стають функціонально невідповідними алелям іншого. Невідповідності між продуктами *mt*- і *N-mt*-генів призводять до зниження ефективності переносу електронів у дихальному ланцюгу, надлишкового продукування та накопичення вільних радикалів, зниження синтезу АТФ та запуску апоптозу [52,53]. Найбільш виразно такі порушення проявляються у випадку гібридизації, де поєднання нових, еволюційно неперевірених комбінацій мітохондріальних і ядерних генів може проявлятися у зниженні життєздатності та фертильності гібридів, а отже процеси коєволюції та коадаптації є високо специфічними для видів, а іноді і для популяцій. Отже цей феномен можна розглядати як специфічну форму несумісності Добжанського-Мюллера і розглядати як фактор видоутворення [54].

Згідно з класичними моделями видоутворення, тривала ізоляція популяцій приводить до їх дивергенції, що в результаті спричиняє репродуктивну ізоляцію через порушення коадапованих генних комплексів у гібридному потомстві [55,56]. Донедавна вважалося, що подібні взаємодії стосуються переважно ядерних генів, а мітохондріальні генотипи розглядалися як нейтральні маркери дивергенції [57,58]. Проте сучасні дослідження показують, що коадаптація генів *mt* і *N-mt* та швидкість, з якою можуть виникати мітонуклеарні несумісності, відіграють важливу роль у процесі видоутворення. Висока швидкість мутацій у мітохондріальних генах у поєднанні з ізоляцією популяцій призводить до швидкої та непередбачуваної дивергенції коадапованих мітоядерних комплексів, і, як наслідок, генотипи *mt* і *N-mt* однієї популяції стають несумісними з комбінаціями *mt/N-mt* інших популяцій, що формує

постзиготичні бар'єри для потоку генів і створює передумови для утворення нових видів [55].

З такої точки зору можна визначити видоутворення як процес дивергенції популяцій, зокрема, у коадаптованих мітонуклеарних генотипах. З цього випливає, що вид можна визначити як популяцію, яка є репродуктивно ізольованою від інших популяцій через несумісності в унікально коадаптованих мітохондріальних та ядерних генах. Ця концепція видів на основі мітонуклеарної сумісності ставить мітохондріальні гени разом з підмножиною ядерних генів, з якими вони взаємодіють, як основних учасників процесу видоутворення та визначення характеристик видів [56]. Ця загальна ідея отримала емпіричну підтримку у сучасних дослідженнях. Прикладом може слугувати робота, присвячена оцінці мітонуклеарної несумісності у природних гібридів мечохвостих риб *Xiphophorus birchmanni* та *Xiphophorus malinche*, де було виявлено летальний ефект, зумовлений порушенням взаємодії між трьома генами, що кодують білки комплексу I мітохондріального дихального ланцюга, один із яких належить мітохондріальному геному, а два інші — ядерному. Поєднання алелів різного походження у гібридів призводило до порушення конформації комплексу I, дефіциту АТФ та накопичення реактивних форм кисню, що проявлялося у гібридній летальності на ранніх етапах розвитку [53]. Robles, N.V. et al., використовуючи метод admixture mapping, доповнили дослідження та виділили щонайменше 9 регіонів ядерного геному, що демонструють мітонуклеарні несумісності різної сили — від сублетальних ефектів до суттєвого обмеження потоку генів, що свідчить про їхню роль у формуванні постзиготичних бар'єрів. Ця робота показує, що мітоядерні взаємодії мають полігенний і варіабельний характер, здатний суттєво впливати на процеси репродуктивної ізоляції та видоутворення [59]. Експерименти на веслоногих рачках *Tigriopus californicus*, що населяють припливні басейни біля тихоокеанського узбережжя Північної Америки та мають високу генетичну диференціацію

між ізольованими популяціями, продемонстрували стійкі ознаки гібридного розпаду у поколінні F₂, зокрема зниження активності чотирьох із п'яти комплексів окисного фосфорилування (OXPHOS), тоді як Комплекс II залишався функціонально незмінним, оскільки він кодується виключно ядерними генами [52]. Дослідження Ellison та Burton продемонструвало, що несумісності проявляються рецесивно: гібриди F₁ зберігають високу пристосованість, тоді як гібриди F₂ демонструють значні порушення, які можуть бути усунуті беккросами до материнської лінії, але не до батьківської [60]. Аналогічні результати зустрічаються також у експериментах із гібридизації ос-наїздників ос-наїзників *Nasonia* [52].

1.3.4. Мітохондріальна інтрогресія

Потенційна роль мітонуклеарних несумісностей у видоутворенні ще більше посилюється там, де частота заміщення мтДНК підвищена порівняно з ядерним геномом, і де структура популяції підтримує алопатрію протягом достатнього часу для розвитку множинних мітонуклеарних несумісностей. Мітохондріальна інтрогресія - явище перенесення мтДНК між видами або популяціями внаслідок гібридизації та наступних зворотних схрещувань, в результаті чого чужорідні гаплотипи закріплюються в новому генетичному середовищі [61]. Подібне явище виявлене у багатьох групах організмів та нині розглядається не лише як маркер еволюційних подій гібридизації, але і як механізм адаптацій та видоутворення.

Особливий інтерес викликає факт того, що мітохондріальна інтрогресія може бути адаптивною, що вносить деякі протиріччя в гіпотезу мітонуклеарної коеволюції. У випадках, коли власний мітогеном виду зазнає деградації або втрачає ефективність, інтрогресований мітогеном від іншого виду або популяції може частково відновлювати працездатність енергетичного апарату клітини незважаючи на певну несумісність із ядерним геномом [62]. Дослідження цього процесу у риб та птахів

виявили, що інтрогресовані гаплотипи асоціюються із підвищеною стійкістю до температурних стресів та більшою ефективністю енергетичного метаболізму [62,63], а у ящірок *Urosaurus graciosus* та *Urosaurus ornatus* інтрогресована мтДНК пов'язана з підвищеною стійкістю до ушкоджень ДНК, спричинених реактивними формами кисню (ROS) [64].

Проте, коли відбувається обмін мітохондріями між видами через гібридизацію, виникає невідповідність між мітогеномом і ядерним геномом реципієнта, що створює додаткові виклики для відновлення еволюційної історії видів. Утворюються так звані філогенетичні спотворення: дерева, побудовані на основі мітохондріальної ДНК, можуть демонструвати штучну близькість із донорським видом, тоді як за ядерними геномами реципієнт належить до іншої еволюційної лінії. Це може призводити до помилкових таксономічних висновків [65].

1.4. Морфологічні та філогенетичні особливості гадюк роду

Vipera

1.4.1. Рід *Vipera*

Рід *Vipera* належить до підродини *Viperinae* сімейства *Viperidae*. За сучасними даними він містить близько 20 видів та є одним із найвідоміших і найбільш досліджених родів родини гадюк (*Viperidae*) [5]. Змії цього роду широко поширені у Палеарктиці: представники *Vipera* трапляються від Північної Африки до Арктичного кола, а також від Великобританії до Азії до Тихого океану [5,66]. Гадюки роду *Vipera* мають загальні морфологічні риси, характерні для справжніх гадюк: міцне, струнке тіло, сильно кілюваті спинні луски, вертикальна зіниця ока та наявність щонайменше одного ряду підочно-щелепних лусок. Звичайний розмір тіла більшості видів – 50–70 см, рідко перевищує 1 м. У будові голови звертає на себе увагу закруглена морда [66,67]. Спинне забарвлення у багатьох видів представлено чітким зигзагоподібним малюнком на світлому або сірому

фоні, хоча можливі й монохромні варіанти (зокрема меланістичні форми, як *V. nikolskii*). У цілому види та підвиди демонструють сильну мінливість у зовнішньому вигляді - формі черепа, числі та розташуванні лусок, малюнку - які можуть змінюватися під час подій гібридизації або локальної селекції, що ускладнює чітке визначення окремих таксонів [5]. Як і більшість гадюк, усі види *Vipera* є живородними та отруйними, і багато з них перебувають під загрозою зникнення через тиск людини, включаючи переслідування та руйнування середовища існування [68].

Рід *Vipera* включає види з двома різними екологічними спорідненостями: євросибірську групу холодоадаптованих видів, що населяють переважно північні регіони або гірські хребти, та середземноморський набір теплоадаптованих таксонів з парapatричними ареалами по всьому Середземноморському басейну. Середземноморська група складається з одного видового комплексу та трьох видів (тобто комплексу *V. ammodytes*, *V. aspis*, *V. latastei* та *V. monticola*) з високим підвидовим різноманіттям, але невизначеними філогенетичними зв'язками між ними [5,69,70]. На противагу цьому, євросибірські види утворюють добре підтверджену монофілетичну групу, що входить до середземноморських гадюк та поділяється на дві клади: (I) *Vipera berus*, широко поширена по всій Палеарктиці, та вікаріантна *V. seoanei*, ендемічна для Іберії; та (II) клада, що сильно постраждала від таксономічної інфляції, представлена в Європі близькоспорідненими степовими та лучними гадюками (*V. ursinii*, *V. graeca* та *V. renardi*) та кавказькими лініями комплексу *V. kaznakovi* [70].

Незважаючи на сильну емпіричну спрямованість, таксономічне та філогеографічне різноманіття гадюк залишається важким для узгодження. До недавнього часу більшість філогенетичних досліджень цього роду були зосереджені лише на аналізі мтДНК та декількох консервативних ядерних локусах, що не дозволяло повною мірою відновити еволюційну історію, особливо враховуючи, що багато видів *Viperidae*, як відомо,

гібридизуються, незважаючи на сильну молекулярну та фенотипічну дивергенцію [5,71,72]. Дослідження Dufresnes *et al.*, проведене на даних ddRADseq, уперше надало узагальнену картину геномної структури та мітонуклеарних зв'язків у палеарктичних гадюк роду *Vipera*, підтвердивши наявність сигналів давньої та/або повторної гібридизації між основнимикладами. Особливо показовим є приклад *Vipera walser*, ядерний геном якої тяжіє до комплексу *V. berus*, тоді як мітохондріальний - до кавказької лінії *V. kaznakovi*, що свідчить про історичну мітохондріальну інтрогресію, що відбулася на ранніх етапах дивергенції або внаслідок пізнішого гібридизаційного контакту із нині зниклим (імовірно вимерлим) видом. Подібні сигнали сучасної гібридизації та потоку генів також виявлено у інших таксонів (*V. pontica*, *V. aspis zinnikeri*), що підтверджує наявність тривалих зон парapatрії та потенційного генетичного обміну між віддаленими лініями [5].

Наявність стійкої репродуктивної сумісності між еволюційно давніми видами роду створює унікальну можливість для вивчення процесів мітонуклеарної коєволюції, оскільки у таких системах можна простежити, яким чином добір діє на узгодження ядерних та мт-генів після подій інтрогресії [70]. Таким чином рід *Vipera* є перспективною моделлю для дослідження еволюційних наслідків гібридизації, функціональної сумісності генетичних систем та механізмів підтримання генетичної цілісності у групах із ретикулярною історією.

1.4.2. *Vipera anatolica*

Vipera anatolica (Eiselt & Baran, 1970) — вузькоендемичний вид гадюк (*Viperidae*), відомий із гірської частини провінції Анталія, південно-західна Туреччина; раніше розглядався як підвид *Vipera ursinii*. Первинний опис було здійснено за двома екземплярами, зібраними в 1969 році А. Будаком і Ф. Шпітценбергером з Коху-Даг - частини західного гірського хребта Тавр [73]. До 2013-2014 року в науковій літературі було описано лише п'ять особин, усі знайдені в одному місці, після чого вид було повторно виявлено

в заповіднику Чигликара, що знаходився на відстані близько 2 км від типового місцезнаходження [74]. У 2016 р. у віддаленій східній частині провінції Анталія виявили нову популяцію *V. anatolica*, що розташовувалася за 200 км від типового ареалу на гірському хребті Гейїк. На підставі помітних відмінностей в морфології, середовищі і генетичній будові цю популяцію описано як окремий підвид *Vipera anatolica senliki* [75]. *Vipera anatolica* проживає в дуже вузькому ареалі: на висотах приблизно 1,800-1,950 м над рівнем моря для типової популяції, і $\approx 1,755$ м для підвиду *senliki*. У порівнянні з багатьма іншими видами *Vipera*, які мають ширший ареал (часто охоплюючи кілька країн або великих гірських систем), *V. anatolica* є дуже локалізованим і перебуває в межах кількох ізольованих висотних плато.

Vipera anatolica є змією невеликого розміру із помірним статевим диморфізмом; за даними польових спостережень, максимальна загальна довжина у виявлених екземплярів коливається у діапазоні 242–368 мм, самиці крупніші [73,74]. Голова є чітко відмежованою від шиї, трикутної форми, як у типових представників роду, очі відносно помірного розміру із вертикальними зіницями [75]. Кількість вентральних щитків невелика порівняно із спорідненими видами та складає 116-120 у самців та 118-119 у самиць [73,74]. Змія має типовий для лучних гадюк малюнок у вигляді зигзагоподібної темної смуги на спині, що чітко вирізняється на більш світлому сіро-бурому фоні; зигзаг зрідка може перериватися або утворювати серію окремих плям, особливо характерно для підвиду *Vipera anatolica senliki*. Верхня частина голови має ряд темних плям, що у деяких екземплярів утворюють суцільну темну смугу. Колір хвостової частини також незначно відрізняється за інтенсивністю забарвлення та є діагностичною ознакою для розрізнення підвидів. Забарвлення самців є більш контрастним порівняно із самицями [73-75].

Аналізи протеоміки та пептидоміки показали, що обидва підвиди *Vipera anatolica* мають типовий для роду набір токсинів. Дослідження

Nempel et al. показало, що склад отрути виду має високий рівень структурної консервативності, але при цьому демонструє специфічні відмінності у складі білкових родин у порівнянні з іншими гадюками Західної Палеарктики - *V. berus*, *V. ammodytes*, *V. ursinii* [76]. Основний компонент (35-45% білкового складу) становлять металопротеїнази (SVMPs), що відповідають за геморагічну дію, деструкцію тканин жертв та індукцію локальних некрозів. Фосфоліпази A₂ (PLA₂; ~20%), що відповідають за міо- та нейротоксичний ефект, виявлені у специфічних ізоформах, що демонструють послідовну схожість з нейротоксичними та міотоксичними PLA₂ з *Vipera ammodytes*, зокрема з підтипами амодитоксину A/B та віперотоксину F [73,76]. Додатковими компонентами є серинпротеїнази (SVSPs; ~10%), що спричиняють системні гемостатичні порушення, дизінтегрини та лектини С-типу (CTLs). Особливої уваги заслуговує низький рівень токсичності отрути для ссавців, що, імовірно, є наслідком екологічної спеціалізації виду - *V. anatolica* полює переважно на безхребетних та дрібних земноводних, тоді як більшість європейських гадюк орієнтовані на дрібних хребетних [74].

Однією із найбільш інтригуючих деталей щодо анатолійської гадюки є її спірне філогенетичне положення на еволюційному дереві роду *Vipera*. Ранні дослідження філогенії, проведені Zinenko et al. на основі мітохондріальних послідовностей (Cytb + COI), розглядали вид як відособлену та давню лінію у межах підроду/комплексу *Pelias*, що об'єднує лугових та степових гадюк, адаптованих до холодних температур [76,77]. Орієнтовний час дивергенції *V. anatolica* із комплексом *V. kaznakovi-ursinii-renardi* оцінювався у 5.28 (3.88–6.95) Млн років, однак автори публікації наголошували на можливості хибної оцінки, вважаючи, що розміщення *V. anatolica* всередині комплексу може мати більше сенсу з огляду на схожі середовища існування з усіма видами у своїй групі та розташування між їхніми ареалами, а також на невелику кількість подібних рис з *V. kaznakovi* [76]. Аналіз ядерних даних ddRAD-seq, проведений

Dufresnes *et al.*, поміщає *V.anatolica* як окрему гілку всередині комплексу *ursinii-renardi*, підкріплюючи припущення, викладене майже 10 роками раніше у вищезгаданій публікації [5].

Таким чином положення виду до сьогодні є предметом дискусій, оскільки відомі тенденції роду *Vipera* (міто-ядерні дисонанси, інтрогресії) роблять інтерпретацію лише на основі одного типу філогенетичних маркерів неповною та потенційно помилковою. Доцільним також може бути поєднання філогенетичних досліджень із палеокліматичними моделями, оскільки досі достеменно невідомо, чи є *V. anatolica* реликтом більш широкого плейстоценового ареалу чи результатом локальної та швидкої дивергенції.

1.5. NUMT

1.5.1. Загальна характеристика NUMT

Ядерно-мітохондріальні сегменти ДНК (NUMT) – це фрагменти мітохондріальної ДНК (мтДНК), які були вставлені в ядерний геном. NUMTs можуть мати розмір від кількох десятків пар основ до охоплення майже всієї мтДНК та знайдені по всьому ядерному геному у багатьох організмів, включаючи ссавців, риб, молюсків, дріжджі та рослини [78]. Концепція NUMT була вперше запропонована в 1967 році [79], але експериментальні докази NUMTs почали з'являтися в літературі лише на початку 1980-х років [80,81]. NUMTs можуть походити із різних сегментів мітохондріального геному, проте є свідчення частого формування цих структур із ділянки D-петлі - некодуючого контрольного фрагмента ДНК, що бере участь у ініціації реплікації та регуляції транскрипції [78]. Більшість фрагментів ДНК, перенесених з мітохондрій у ядерний геном, мають розмір менше 1 тис. п.н. [82], проте трапляються і випадки перенесення повних мітохондріальних геномів, особливо у рослин [83]. Наразі немає єдиної думки щодо механізму вставки сегментів мтДНК у ядерний геном [78]. Однак, кілька досліджень дали деяке уявлення про

потенційні механізми та не випадковий вибір місця вставки NUMT. Загалом, більшість NUMTs виявляють у некодуючих ділянках геному - інтронах або міжгенних ділянках, тоді як інтеграції у білок-кодуючі екзони є вкрай рідкісними, що пояснюється негативним відбором проти порушення функції життєво важливих генних ділянок [84]. NUMTs також виявляють схильність локалізуватися у регіонах геному, багатих на повтори та ретротранспозонні послідовності. У роботі Volner, M., Vovo, S., Ballan, M. *et al.* усі ідентифіковані вставки мітохондріального походження у геномі *Sus scrofa* фланкувалися повторюваними елементами, особливо класів SINE та LINE [85]. Дослідження розподілу NUMTs серед геномів ссавців, проведене Tsuji, J. *et al.*, виявило високу щільність ретротранспозонів у фланкуючих ділянках NUMTs людини, резуса, миші та щура. Відмічено, що частка основ, замаскованих під ретротранспозони, у геномних ділянках довжиною 1000 п.н., що фланкують NUMTs, набагато більша, ніж загальний середній показник по геному: у людини 89,3% проти 40,6%, у макаки-резус 87,9% проти 39,8%, у миші 90,4% проти 37,8% та у щура 82,85% проти 35,4%. Також дослідники відмічають статистично значуще збагачення фланків NUMTs A+T-олігомерами [84].

Локалізація *in situ* тварин і рослин виявляє часті взаємодії між мтДНК та ядерним гетерохроматином, особливо із перицентромерними та/або субтеломерними ділянками [86]. За припущеннями, тяжіння NUMTs до цих регіонів може пояснюватися тим, що в цих ділянках майже немає кодуючих послідовностей та часто трапляються дволанцюгові розриви ДНК, що створює сприятливі умови для інтеграції [87]. Додатково виявлено, що місця інтеграції NUMTs нерідко характеризуються наявністю коротких ділянок мікрогомології (1–7 п.н.) між мітохондріальною вставкою та ядерною послідовністю [84]. Такі мікрогомології виконують роль «якоря» для систем репарації та вказують на участь у процесі не тільки механізмів негомологічного з'єднання кінців (NHEJ), але і мікрогомологій-залежного приєднання кінців (MMEJ).

Порівняльні та популяційні аналізи, зокрема робота Wei *et al.* демонструють відсутність “гарячих точок” інтеграції NUMTs: вставки відбуваються на всіх хромосомах, причому кількість NUMTs переважно корелює з довжиною хромосоми, за виключенням X-хромосоми [88]. У тварин мітохондріальні вставки, як правило, є розсіяними [84,85,89], в той час як у рослин NUMTs часто організовані у кластери [90].

Таким чином, наявні дані дають підставу стверджувати, що інтеграція NUMTs має не випадковий характер: вони уникають функціональних ділянок геному (або швидко елімінуються звідти негативним доборою), але успішно закріплюються у ділянках, що поєднують структурну нестабільність та низьку селекційну значущість. Це підкреслює що NUMTs є продуктами не лише випадкових подій, але й закономірних молекулярних процесів, пов’язаних із динамікою геному.

1.5.2. Потенціал NUMT у філогенетичних дослідженнях

Застосування мітохондріальних молекулярних маркерів набуло широкого застосування у ідентифікації видів (баркодинг), філогенетиці, філогеографії та популяційній генетиці. Однак, їх застосування може бути ускладнене ядерними мітохондріальними псевдогенами (NUMT), що через їхню послідовну схожість з автентичною мтДНК можуть бути коампліфіковані під час ПЛР, що призводить до помилок секвенування та хибних сигналів [91]. NUMT можуть не тільки ускладнювати ідентифікацію видів, але й генерувати гаплотипи-привиди, що можуть спотворювати результати філогенетичних аналізів, потенційно завищуючи показники гаплотипової різноманітності в популяціях [92].

Незважаючи на ці труднощі, NUMT продемонстрували потенціал в еволюційних дослідженнях, виступаючи в ролі “молекулярних скам’янілостей”, що здатні зберігати інформацію про еволюційну історію виду [93]. Оскільки вставка фрагментів мтДНК у певні ядерні локуси відбувається рідко й мало ймовірно повторно в ті самі позиції, сама подія інтеграції може розглядатися як унікальний філогенетичний маркер:

порівняння присутності або відсутності гомологічних NUMT у споріднених таксонів дозволяє відновити послідовність розгалужень еволюційного дерева, що може бути актуально для аналізу глибоких розходжень, де класичні маркери можуть давати суперечливі сигнали [93,94].

Оскільки NUMT у ядрі накопичують мутації з меншою швидкістю, ніж мітохондріальні послідовності, вони можуть дати уявлення про давні варіанти мітохондріальної ДНК, які є втраченими у сучасних таксонах. Це дозволяє простежити історію контактів між видами та виявити події міжвидової гібридизації, а отже може бути використано у дослідженнях із реконструкції ретикулюційної еволюції - мережевих зв'язків між видами, що виникли через неоднократні події гібридизації. Наявність NUMT та рівень їх диференціації із мітохондріальними відповідниками також можуть бути додатковим параметром під час калібрування молекулярних годинників у філогенетичних дослідженнях, оскільки врахування подій переносу мтДНК дає можливість не тільки точніше датувати час розходження різних еволюційних ліній, але і виявити періоди підвищеної частоти перенесень, що можуть свідчити про геномні перебудови, стресові умови середовища або дію геномних мобільних елементів [95].

NUMT несуть інформацію про давні стани мітохондріальної ДНК, отже надають можливість дослідження механізмів сумісності та функціональної інтеграції між геномами всередині клітин. Аналіз їхньої кількості, розподілу та дивергенції між таксонами дає змогу оцінити темпи коеволюції мітохондріальних і ядерних компонентів, наслідки інтрогресії та добір на функціональну сумісність гібридних геномів [27,48,95].

Розділ 2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

2.1. Отримання послідовності NUMT *V.anatolica*

Секвенування часткової послідовності гену COX I *V. anatolica* за допомогою специфічних праймерів [77] не дало стабільних результатів: отримані продукти ПЛР містили подвійні піки на хроматограмі починаючи з середини послідовності, що вказувало на наявність двох копій гену, які відрізнялись інсерцією або делецією та зсувом послідовності відносно одна іншої. Тому для отримання чистих послідовностей кожної з копій була застосована процедура клонування продуктів ПЛР в *Escherichia coli* з використанням набору QIAGEN PCR Cloning Kit [96]. ДНК вектора, який містив послідовність COX I, пізніше була виділена за допомогою лужного лізису з культури бактерій та секвенована на капілярному секвенаторі Applied Biosystems в комерційній компанії. Отримані хроматограми перевірені на якість за допомогою програми MEGA 10 [97]. Вся лабораторна робота виконувалась на базі технічного університету Брауншвейга (TU Braunschweig) у 2011 році Олександром Зіненком та Мачеєм Пабіяном, які надали послідовності для аналізу.

2.2. Філогенетичний аналіз та аналіз молекулярної еволюції цитохром оксидази та її ядерної копії

Для порівняння послідовності NUMT із послідовностями COI інших представників роду *Vipera* було завантажено 61 послідовність гену великої субодиниці цитохром-оксидази (COI) (Додаток 1) з GenBank [98]. Вирівнювання послідовностей було виконано за допомогою MAFFT version 7 [99] із параметрами за замовчуванням. Редагування послідовностей (обрізка кінців) виконували у програмі Bioedit ver. 5.0.9 [100]. Аналіз трансляції послідовності гену великої субодиниці цитохром-оксидази (COI) представників роду *Vipera* виконували за допомогою MEGA 11, використовуючи генетичний код Vertebrate Mitochondrial із стартовим

кодоном «2nd site» [101]. Кількість синонімічних та несинонімічних замін, показник dN/dS, Tagima's D [102] (для усіх проаналізованих зразків роду *Vipera*) та тест Макдональда-Крайтмана (для пари NUMT – COX I *V.anatolica*) [103] обчислювали у програмі DNAsp ver.6.12 [104]. Після цього за допомогою MEGA 11 [101] визначали модель еволюції за критерієм BIC (Bayesian Information Criterion); для використовуваного набору даних цей показник був найменшим для моделі HKY + G + I (Hasegawa-Kishino-Yano model, Rates among sites = Gamma-distributed with Invariant sites); після чого філогенетичне дерево будували методом Maximum Likelihood із застосуванням онлайн-версії IQTREE [105]. Для оцінки статистичної підтримки гілок проведено bootstrap-аналіз із 1000 псевдореплікаціями. Отримане дерево візуалізували у Figtree ver.1.4.3 [106].

Для побудови філогенії, що відображала зв'язки між фрагментами NUMT, виявлені послідовності вирівнювали за допомогою MAFFT version 7 [99] із параметрами за замовчуванням. Після цього за допомогою MEGA 11 [101] визначали модель еволюції за критерієм BIC (Bayesian Information Criterion); для використовуваного набору даних цей показник був найменшим для моделі TN93 + G + I (Tamura-Nei 93 model, Rates among sites = Gamma-distributed with Invariant sites); після чого філогенетичне дерево будували методом Maximum Likelihood із застосуванням онлайн-версії IQTREE [105]. Для оцінки статистичної підтримки гілок проведено bootstrap-аналіз із 1000 псевдореплікаціями. Отримане дерево візуалізували у Figtree ver.1.4.3 [106].

Для побудови філогенетичного дерева із конкатенованими послідовностями NUMT обрані послідовності вручну об'єднували, після чого вирівнювали за допомогою MAFFT version 7 [99] із параметрами за замовчуванням. Після цього за допомогою MEGA 11 [101] визначали модель еволюції за критерієм BIC (Bayesian Information Criterion); для використовуваного набору даних цей показник був найменшим для моделі

TN93 + I (Tamura-Nei 93 model with Invariant sites); після чого філогенетичне дерево будували методом Maximum Likelihood із застосуванням онлайн-версії IQTREE [105]. Для оцінки статистичної підтримки гілок проведено bootstrap-аналіз із 1000 псевдореплікаціями. Отримане дерево візуалізували у Figtree ver.1.4.3 [106].

2.3. Пошук гомологів NUMT за допомогою BLAST

Пошук гомологічних до мітохондріальної ДНК послідовностей в ядерному геномі здійснювали допомогою інструменту BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) на платформі NCBI.

Порівняння було виконано для повного мітохондріального геному *V.ursinii* (OX365983.1) шляхом бластування проти референтних геномів гадюк (*Vipera*), наявних у базі GenBank. Отримані збіги відбирали за критерієм E-value $< 1e^{-5}$ та довжиною покриття (Query cover) понад 50% від повної послідовності запиту.

2.4. Візуалізація композиції ядерних копій

Виявлені у ядерному геномі *V.ursinii* (OX365983.1) ділянки мітохондріальної ДНК було завантажено у форматі .fasta та вирівняно проти мітохондріальних геномів *V.ursinii* та *V.berus* за допомогою MAFFT version 7 [99] із параметрами за замовчуванням. Візуалізацію вирівнювання було здійснено за допомогою R (ver. 4.4.3) [107].

2.5. Пошук повторюваних ділянок та транспозонів за допомогою RepeatMasker та Galaxy Genome Browser

Пошук повторюваних ділянок та мобільних генетичних елементів здійснювали за допомогою RepeatMasker [108] у середовищі Galaxy Genome Browser [109]. Повну послідовність 3 хромосоми завантажували у Galaxy Genome Browser, після чого піддавали аналізу в RepeatMasker із використанням курованої бази даних DFam. Для зручності подальшої

візуалізації та інтеграції результатів у геномні браузері анотацію повторів виводили у форматі GFF (Output annotation of repeats in GFF format).

2.6. Картування в Integrative Genomics Viewer

Для візуалізації положення фрагментів NUMT, анотованих повторів та сателітів було використано онлайн-версію Integrative Genomics Viewer (IGV) [110]. Файл із послідовністю 3-ї хромосоми *V.ursinii* було отримано із бази даних NCBI, після чого конвертовано у формат .bed за допомогою скрипту в R (ver. 4.4.3). Файли із координатами повторюваних послідовностей напряду завантажували до програмного забезпечення у форматі .gff3, а файли із координатами NUMTs та сателітних повторів попередньо конвертували із формату .fasta у формат .gff3 за допомогою скрипта в R із використанням пакетів dplyr [111], stringr [112], ggplot2 [113], RColorBrewer [114] та Biostrings [115]. Усі скрипти доступні за посиланням: https://github.com/HellaNOVA/masters_thesis

Розділ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1. Аналіз нуклеотидної мінливості та трансляції COX I у представників роду *Vipera*

Аналіз нуклеотидної мінливості COX I у зразках представників роду *Vipera* встановив, що загальне значення Tajima's D є негативним та статистично незначущим ($D = -0.96$, $P > 0.10$), що свідчить про відсутність значущих відхилень від нейтральної еволюційної моделі [102]. Для синонімічних сайтів не виявлено значущого відхилення ($D = -0.85$, $P > 0.10$), тоді як для несинонімічних сайтів спостерігається значно більш негативне та статистично значуще значення ($D = -1.89$, $P < 0.05$). Подібні результати є свідченням дії очищувального відбору, що видаляє амінокислотні заміни у гені COX I.

Нуклеотидна диверсифікація показує, що π для синонімічних сайтів ($Pi(s) = 0,19442$; скориговане за моделлю Jukes & Cantor: 0,24070) значно перевищує π для несинонімічних сайтів ($Pi(a) = 0,00161$, скориговане за моделлю Jukes & Cantor: 0,00161), що свідчить про низьку варіабельність амінокислотної послідовності, що є типовим для нуклеотидних послідовностей критично важливих для функціонування клітини білків. Значення $dN/dS = 0.0083$ свідчить про консервативність еволюції білка COX I у представників роду *Vipera*.

У висновку, еволюційні процеси, що відбуваються на проаналізованій ділянці мітохондріального геному, перебувають під впливом очищувального добору, що забезпечує стабільність амінокислотної послідовності білка та підтримує його функціональну цілісність.

Порівняння вирівняних амінокислотних послідовностей COX I (Додаток 2) вказало на наявність 15 мінливих позицій, у яких між видами роду *Vipera* трапляються амінокислотні заміни (Рис. 3.1.).

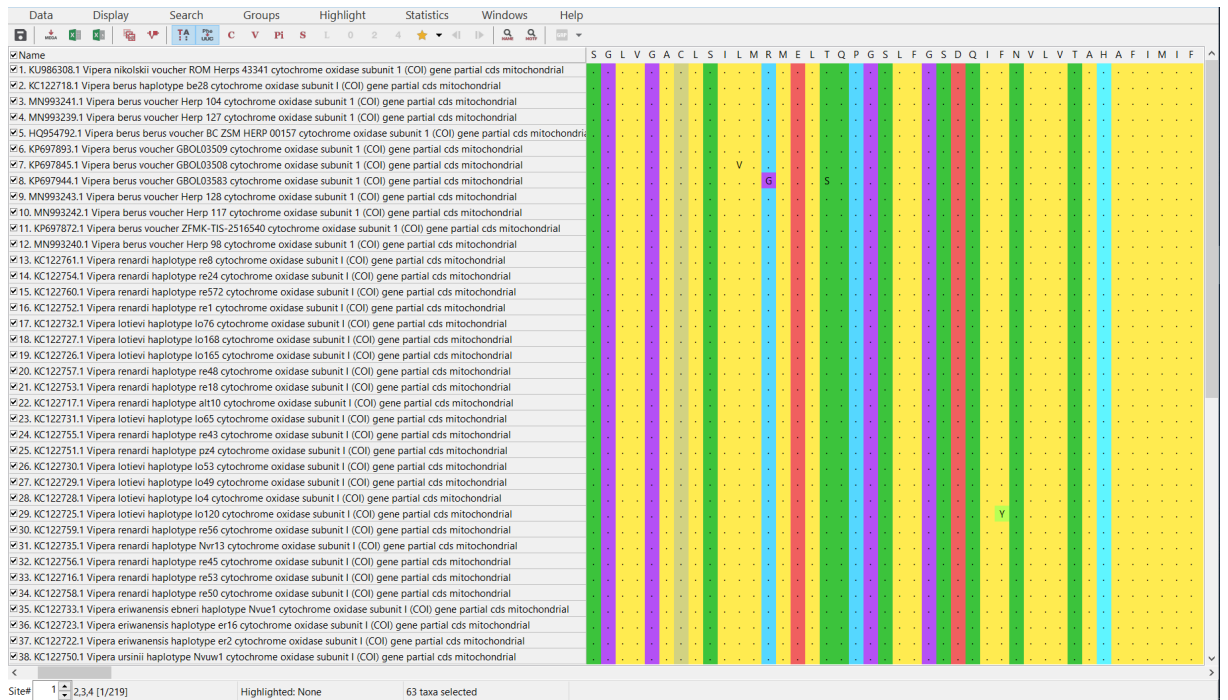


Рис. 3.1. Множинне вирівнювання амінокислотних послідовностей COX I у представників роду *Vipera*. Однобуквенні позначення використовуються на позначення різних амінокислотних залишків, кольори відповідають стандартній схемі програмного забезпечення MEGA 11. Кожен рядок відповідає окремій проаналізованій послідовності.

У позиції 4 зафіксовано заміну Phe→Leu, що не є радикальною відповідно до класифікації амінокислот за їх хімічними властивостями [116]. Цей варіант притаманний більшості представників комплексу *ursinii-renardi*, тоді як у представників *V.berus* більш розповсюдженим є консенсусний варіант.

У позиції 5 виявлено заміну Met→Leu, що класифікується як нерадикальна, оскільки обидві амінокислоти належать до неполярних [117]. Ця заміна спостерігається лише у *V.aspis* (KP697881.1).

У позиції 11 у *V.ammodytes* (MN993238.1) фіксується варіант Gly→Arg, що є радикальною заміною: невелика неполярна молекула гліцину заміщується на велику та сильноосновну молекулу аргініну.

Подібна заміна потенційно може впливати на локальну структуру білкового продукту [116].

У 13 позиції виявлено заміну Val→Ile, що класифікується як нерадикальна: обидві амінокислоти є гідрофобними, нейтральними та близькими за об'ємом бічного ланцюга [118]. Ця заміна спостерігається у одного представника *V.ursinii* (КС122746.1) та у виду *V.dinniki* (КС122719.1 та КС122720.1).

У позиції 19 фіксується зворотна до попередньої нерадикальна заміна Ile→Val у представника виду *V.seoanei* (КС122736.1).

У позиції 20 зафіксовано заміну Leu→Val, що не є радикальною: обидві амінокислоти неполярні та близькі за стеричними характеристиками [118]. Цей варіант зустрічається у одного представника виду *V.berus* (КР697845.1).

Позиція 22 демонструє варіант Arg→Gly, що належить до радикальних. Ця заміна спостерігається у одного представника *V.berus* (КР697944.1).

У 26 позиції виявлено заміну Thr→Ser, що класифікується як нерадикальна, оскільки обидві амінокислоти належать до полярних та незначно відрізняються об'ємом бічного ланцюга [116]. Цей варіант спостерігається лише у одного представника *V.berus* (КР697944.1).

У позиції 38 зафіксовано заміну Phe→Tyr, що належить до напівконсервативних, оскільки обидві амінокислоти є ароматичними та подібними за об'ємом, однак поява гідроксильної групи в тирозині збільшує полярність та може впливати на локальну структуру білкового продукту та утворення водневих зв'язків [119]. Ця заміна спостерігається у *V.anatolica* (КС122762.1) та *V.lotievi* (КС122725.1).

Для позиції 112 зафіксовано заміну Val→Ile, що належить до нерадикальних [118]. Цей варіант спостерігається у *V.lotievi* (КС122732.1) та трьох представників виду *V.ursinii* (КС122737.1, КС122740.1, КС122741.1).

У позиції 121 виявлено заміну Val→Met, що належить до частково консервативних, оскільки обидві амінокислоти є гідрофобними, однак метіонін містить тіоефірну групу, що потенційно змінює хімічні властивості бічного ланцюга, що дозволяє розглядати цю заміну як слабо радикальну [120]. Спостерігається у *V.renardi* (KC122756.1).

У 149 позиції фіксується нерадикальна заміна Ile→Val у одного представника виду *V.ammodytes* (MN993238.1).

Позиція 153 демонструє подібну заміну Ile→Val у представника виду *V.aspis* (KP697881.1) та виду *V.dinniki* (KC122719.1 та KC122720.1).

У позиції 160 виявлено заміну Met→Thr, що класифікується як радикальна, оскільки передбачає перехід від неполярного гідрофобного сірковмісного залишку до полярної амінокислоти з гідроксильною групою, що здатний суттєво змінювати фізико-хімічні властивості локального оточення у білковому продукті [116]. Така заміна спостерігається у одного представника виду *V.ammodytes* (KU986335.1).

У позиції 177 зафіксовано заміну Ile→Met, що класифікується як нерадикальна, з огляду на гідрофобність та подібні стеричні характеристики амінокислот [116]. Цей варіант зустрічається лише у *V.berus* (MN993240.1).

Узагальнюючи результати аналізу трансляції COX I у представників роду *Vipera*, слід зазначити, що переважна більшість виявлених варіацій є хімічно консервативними та не передбачають істотної зміни фізико-хімічних властивостей; радикальні субституції трапляються поодинокі і характеризують відмінності між більш віддаленими групами, гібриди між якими насправді є рідкісними (*V. ammodytes* та дрібними щиткоголовими гадюками).

З цього випливає, що на компенсаторну коєволюцію між мітохондріальними та ядерними субодинамиціями комплексу IV або виникнення цитонуклеарної несумісності під час можливих подій гібридизації між різними видами *Vipera* можна очікувати лише на

достатньо високому рівні дивергенції (*V. ammodytes* – решта лучних та степових гадюк). Висока ступінь подібності COX I серед досліджених послідовностей, мінімальна кількість та поодинокий характер радикальних замін дозволяють припускати що мітохондріальні геноми більшості різних видів роду є взаємно функціонально сумісними, а їх білкові продукти не створюють передумов для порушення роботи комплексу IV при гібридизації та подіях мітохондріальної інтрогресії.

Утім через особливості успадкування мітохондріального геному, радикальні амінокислотні заміни можуть також зустрічатись у інших мітохондріальних генах, і тому для повної та коректної оцінки доцільно проаналізувати весь набір мітохондріальних генів у подальших дослідженнях, оскільки такий підхід дозволить більш точно оцінити варіабельність, дії добору та можливі компенсаторні механізми, що забезпечують функціональну сумісність мітохондріальних білків.

3.2. Порівняння послідовності NUMT *V. anatolica* із мітохондріальним відповідником та іншими послідовностями

Отримана послідовність NUMT *V. anatolica* мала довжину 658 нуклеотидів. Тест Макдональда – Крайтмана показав, що між мітохондріальною послідовністю COI *V. anatolica* (KC122762.1) та NUMT нараховується 28 синонімічних (сайти 11, 25, 43, 59, 64, 145, 169, 190, 220, 277, 295, 307, 313, 328, 331, 364, 385, 391, 394, 448, 451, 487, 526, 550, 562, 577, 581, 583) та 6 несинонімічних (сайти 9, 38, 112, 114, 125, 354) заміни. У положенні 317-325 міститься делеція. Для з'ясування імовірного походження NUMT було реконструйовано філогенетичне дерево методом Maximum Likelihood (Рис. 3.2.). Мітохондріальна послідовність *V. anatolica* є сестринською базальною групою до комплексу *ursinii-renardi*, що збігається із попередніми реконструкціями, виконаними Zinenko et al. (2015) для цього роду. Однак, всупереч очікуванням, NUMT-послідовність, отримана для *Vipera anatolica*, не кластеризується безпосередньо з

мітохондріальним гаплотипом цього виду, а формує парафілетичну групу відносно нього, демонструючи більшу спорідненість із зразком *V.dinniki* і належить до групи мітохондріальних гаплотипів кавказських гадюк, ендеміків Кавказського альпійського та субальпійського поясу.

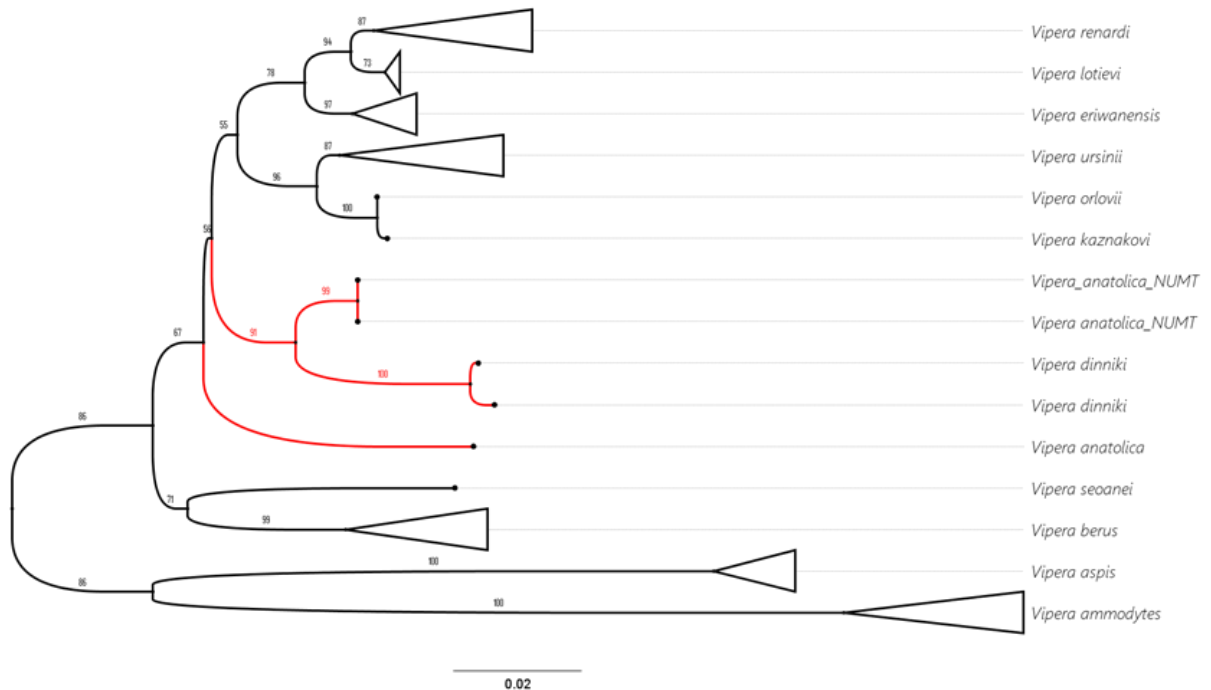


Рис. 3.2. Філогенетична реконструкція походження NUMT методом Maximum Likelihood. Числа на гілках відображають рівень бутстреп-підтримки.

3.3. Результати пошуку в BLAST

Оскільки послідовність мітохондріальної копії ядерного гену у анатолійської гадюки виявилась давнім запозиченням, що за філогенетичною реконструкцією відповідає часу розходження всієї групи степових, лучних та кавказських гадюк, було зроблено припущення, що цей NUMT має бути присутній і в інших ядерних геномах видів комплексу. У результаті пошуку в BLAST на третій хромосомі *V.ursinii* [121] було виявлено 14 фрагментів ДНК, подібних до мтДНК *V.ursinii* на 94,82%.

Розмір знайдених фрагментів коливався від 268 до 8131 нуклеотидів. Усі фрагменти формують кластер, розташований у положенні 102403203-102697530 третьої хромосоми, що відповідає перичентромерній ділянці хромосоми.

Кластер оточений повторюваними ділянками, що за допомогою BLAST було ідентифіковано як сателіти типу satellite DRU-Sat-1, описані раніше для перичентромерних ділянок хромосом у змій *Daboia russelii* (OP820475.1, відсоток подібності 95.83%) (Рис.3.3.).

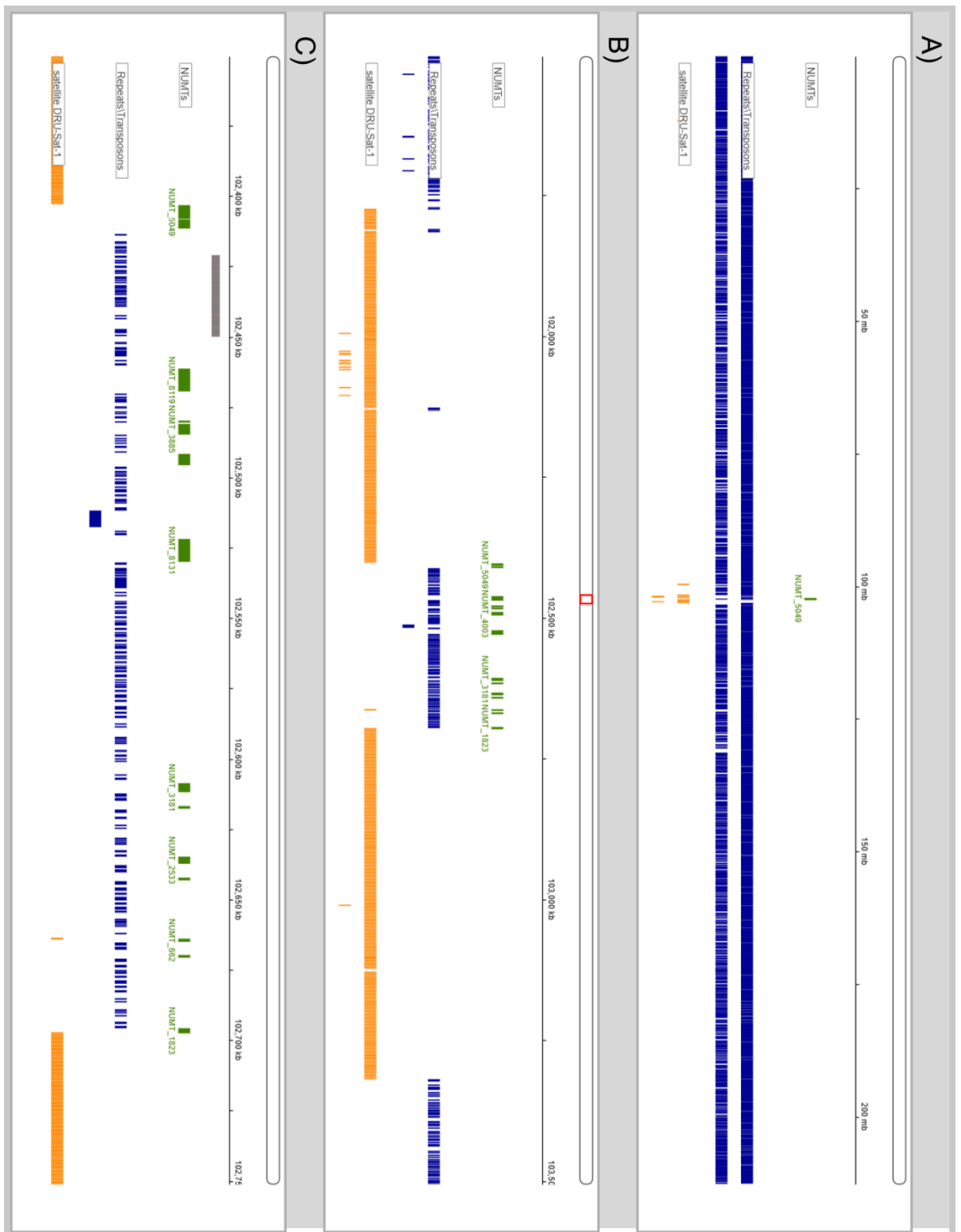


Рис. 3.3. Схема розташування фрагментів ДНК мітохондріального походження, виявлених на третій хромосомі *V.ursinii*. А) загальний вид положення кластеру фрагментів на хромосомі; В) збільшена перичентромерна ділянка, що демонструє кластер фрагментів у оточенні повторюваних ділянок, транспозонів та сателітів; С) детальний огляд

ділянки ($\approx 102.400\text{--}102750$ kb). Легенда: NUMTs – зеленим кольором позначено інтеграти мітохондріального походження; Repeats\Transposons – синім кольором позначені анотовані ділянки повторюваних послідовностей та транспозонів різних класів; Satellite DRU-Sat-1 - помаранчевим кольором позначено тандемні сателітні масиви типу satellite DRU-Sat-1. Горизонтальні треки відповідають ділянкам хромосоми; масштабні шкали у верхній частині панелей відображають позиції вздовж геномних координат.

Ділянка, де розміщені фрагменти NUMT, є насиченою мобільними генетичними елементами та простими повторами. Серед мобільних генетичних елементів виявлені Charlie-like ДНК-транспозони (давня група мобільних генетичних елементів, що відрізняються дуплікацією цільових сайтів (TSD) та термінально інвертованими повторами (TIR), суперсімейство hAT, Class II [122]), LTR-ретротранспозони типу HERV (ендоретровіруси, у людини часто асоційовані із розвитком пухлин, Class II, Betaretrovirus-like supergroup [123]), MER83 (ERV1 – тип повторів, що являють собою залишки давніх ретровірусних інфекцій, що характеризується довгими термінальними повторами (LTR) на своїх кінцях [124]), Ty3/Gypsy (представник родини *Metaviridae*, інтегрується у вузький регіон 2–3 п.н. вище від генів, які транскрибуються РНК-полімеразою III (наприклад, tRNA-гени) [125]), non-LTR-ретротранспозони типу LINE2 (еволюційно давнє сімейство мобільних генетичних елементів хребетних, часто деградовані [126], на хромосомі представлені у вигляді псевдогенів зворотної транскриптази) та Bov-B (поширені у геномах змій, отримані імовірно завдяки горизонтальному переносу генів від жертв – комах та дрібних хребетних [127]), SINE (короткі (100-400 нуклеотидів) неавтономні транспозони, що еволюційно походять від тРНК, 7SL-РНК або 5S рРНК, загалом неактивні у геномах [126,128]).

3.4. Опис знайдених фрагментів NUMT на третій хромосомі *V.ursinii*

Виявлені NUMT-фрагменти зберігають синтенію в межах фрагменту та загальну послідовність генів, характерну для відповідних ділянок мітохондріальної ДНК (Рис. 3.4.).

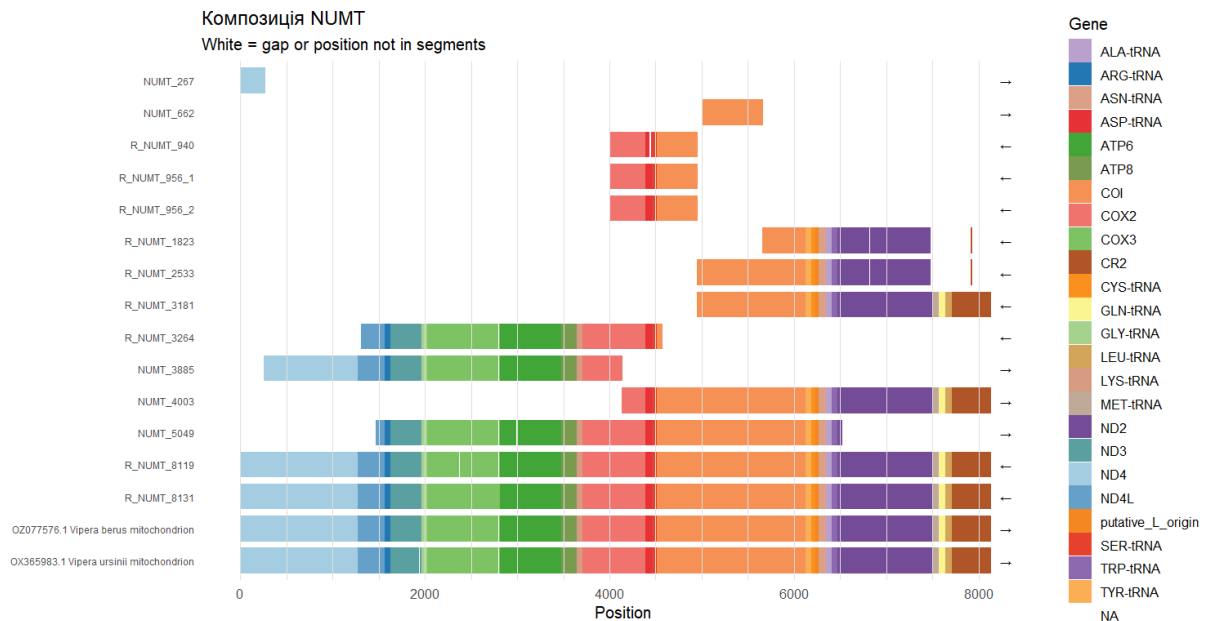


Рис. 3.4. Композиція фрагментів NUMT, знайдених на третій хромосомі *V.ursinii*. Горизонтальні ряди відображають вирівнювання фрагментів та відповідних їм фрагментів мітохондріальних геномів *V.ursinii* та *V.berus*. Кольори відповідають мітохондріальним генам, гомологічним до фрагментів NUMT (позначення наведено у легенді праворуч). Стрілки праворуч від кожного рядка вказують орієнтацію відповідного фрагмента (→ - напрямок фрагменту співпадає із орієнтацією мітохондріального генома, ← - напрямок фрагменту протилежний мітохондріальному геному). Вісь X відображає нуклеотидні позиції в межах множинного вирівнювання.

Найбільший фрагмент NUMT має загальну довжину 8131 пар основ та має координати 102521842 -102529972 bp (за збіркою хромосоми *V.ursinii*). Порівняння із мітохондріальними геномами *V.ursinii* та *V.berus* показало його гомологію із фрагментом, що охоплює ділянку від кінцевої частини CR2 (control region 2) до більшої частини гена ND4 включно.

Напряму NUMT протилежний напрямку організації геному мітохондрії. Частина генів зберігає рамку зчитування, тоді як інші демонструють ознаки псевдогенізації у вигляді появи внутрішніх стоп-кодонів внаслідок накопичення несинонімічних мутацій, зсувів рамки зчитування та коротких інсерцій. Порівняльне вирівнювання із мітохондріальними прототипами виявило 0 делецій та 5 інсерцій (1–5 п.о., 116 Т, 174 С, 388Т, 2800 А, 3140-3144 AGAGT), що є типовим для NUMTs, які зазнають нейтрального накопичення мутацій після перенесення у ядерний геном.

Фрагмент довжиною 8119 п.о. розташований за координатами 102461295-102469414 bp та є майже ідентичним попередньому фрагменту за генною композицією та орієнтацією відносно мітохондріального геному. Порівняльне вирівнювання із мітохондріальними прототипами виявило 4 інсерції (1–5 п.о., 116 Т, 174 С, 388Т, 3140-3144 AGAGT) та 2 делеції у положеннях 2375-2383 та 2801. Порівняння цього фрагмента із NUMT, виявленим у *V.anatolica* та описаним у 3.2., виявило повний збіг із ділянкою, розташованою за координатами 102466709-102467357 bp.

За координатами 102403203-102408252 знаходиться NUMT загальною довжиною 5049 п.о., що є гомологічним ділянці мітохондріального геному від кінцевого фрагменту гена ND2 до частини гена ND4L включно. Напряму NUMT ідентичний напрямку організації геному мітохондрії; містить 1 делецію (7 п.о. відсутні між 1527 та 1528 нуклеотидами послідовності NUMT) та 1 інсерцію (3140-3144 AGAGT).

Фрагмент довжиною 4003 п.о. знаходиться за координатами 102491632-102495635 та є гомологічним сегменту мітохондріального геному, що охоплює ділянку від кінцевої частини CR2 до частини гена COX2 включно. Напряму NUMT ідентичний напрямку організації мітохондріального геному, інсерції та делеції відсутні.

Фрагмент NUMT довжиною 3885 п.о. картовано між позиціями 102480857 та 102484742. Відрізок співвідноситься із ділянкою мітогеному, що простягається від частини гена COX2 до частини гена ND4 включно.

Напрям NUMT ідентичний напрямку організації мітохондріального геному, наявні 2 інсерції (1-5 п.о., 138 Т та 2888-2892 AGAGT), делеції відсутні.

NUMT-сегмент довжиною 3264 п.о. був виявлений у межах координат 102408254-102411518. Послідовність відповідає ділянці мітогеному від прикінцевої області гена COI до гена ND4L включно. Напрям NUMT протилежний напрямку організації геному мітохондрії. У положенні 1834-1838 наявна інсерція AGAGT, делеції відсутні.

Фрагмент довжиною 3181 п.о. знаходиться за координатами 102608636-102611817 та є гомологічним ділянці мітохондріального геному, що охоплює проміжок від частини CR2 до майже більшої частини послідовності гена COI. Напрям NUMT протилежний напрямку організації геному мітохондрії, інсерції та делеції відсутні.

Послідовність мітохондріального походження довжиною 2533 п.о. картовано між позиціями 102634743 та 102637276. Виявлений фрагмент містить невелику послідовність (10 п.о.), що відповідає CR2, що передує ділянці, синонімічній послідовності від майже повної копії гена ND2 до більшої частини гена COI; послідовності генів тРНК лейцина, глутаміна та метіоніна відсутні. Напрям NUMT протилежний напрямку організації геному мітохондрії. Виявлено 1 делецію (між 1527 та 1528 нуклеотидами послідовності NUMT відсутні 4 нуклеотида), інсерції відсутні.

Подібний за структурою (наявність невеликої частини CR2 та відсутність послідовностей тРНК) на попередньо описаний фрагмент довжиною 1823 п.о. знаходиться за координатами 102695707-102697530. Напрям NUMT протилежний напрямку організації геному мітохондрії. Послідовність містить 2 делеції (1 п.о. відсутня між 5 та 6 нуклеотидами, 4 п.о. відсутні між 1156 та 1157 нуклеотидами), інсерції відсутні.

Фрагмент довжиною 956 п.о. знаходиться за координатами 102642210-102643166 та є гомологічним сегменту мітохондріального геному, що охоплює частину гена COI і простягається до частини COX2

включно. Напряму NUMT протилежний напрям організації геному мітохондрії, інсерції та делеції відсутні.

Майже ідентичний за структурою попередньому фрагмент довжиною 956 п.о. знаходиться за координатами 102616750-102617706. Від описаного вище відрізняється тільки наявністю точкової мутації T>C у 365 нуклеотиді послідовності NUMT.

NUMT-сегмент довжиною 940 п.о. був виявлений у межах координат 102669701-102670641 і є гомологічним до ділянки мітохондріального геному, що починається від частини гена COI і завершується в межах послідовності гена COX2 включно. Напряму NUMT протилежний напрям організації геному мітохондрії. У межах послідовності наявна делеція довжиною 16 п.о. між 430 та 431 нуклеотидами, інсерцій не виявлено.

Фрагмент NUMT довжиною 662 п.о. картовано між позиціями 102664339 та 102665001. Послідовність є гомологічною до частини гена COI мітохондріального геному. Напряму NUMT ідентичний напрям організації геному мітохондрії, інсерції та делеції відсутні.

Найменша послідовність NUMT розташована за координатами 102480225-102480492 та є гомологічною до частини гена ND4. Напряму NUMT ідентичний напрям організації геному мітохондрії, наявні 2 інсерції (116 T, 174 C), делеції відсутні.

3.5. Реконструкція еволюційних подій інтеграції та фрагментації NUMT

Для з'ясування імовірних шляхів дуплікації та фрагментації мітохондріальної вставки було побудовано філогенетичне дерево методом Maximum Likelihood (Рис. 3.5.).

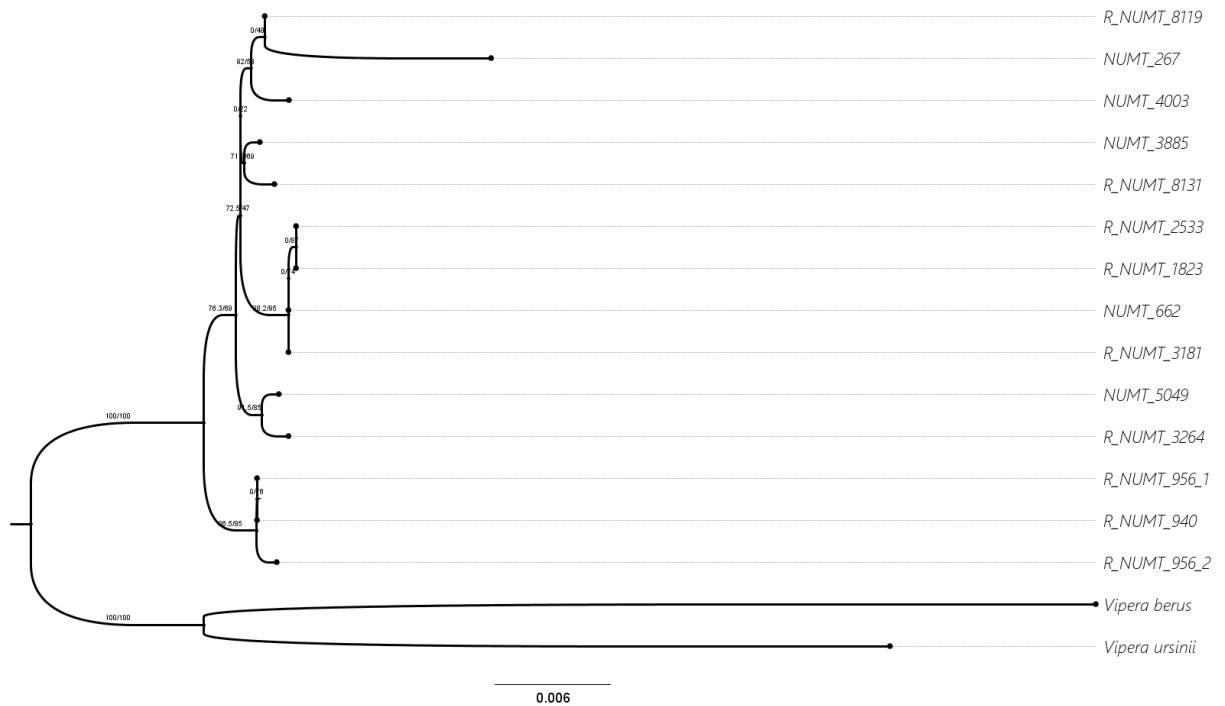


Рис. 3.5.1. Перша спроба філогенетичної реконструкції походження фрагментів NUMT методом Maximum Likelihood. Числа на гілках відображають рівень бутстреп-підтримки.

Перша спроба філогенетичної реконструкції була здійснена за припущенням, що кожен виявлений фрагмент NUMT є незалежною копією мітохондріальної ДНК, інтегрованою окремо. У результаті було отримано дерево, на якому виявлені фрагменти групувалися здебільшого відповідно до довжини фрагментів та їх генної композиції. Фрагменти, розташовані поруч у геномі, не формували спільних клад, отже було висунуто альтернативну гіпотезу про походження усіх NUMT із єдиної події інтеграції.

З огляду на компактне розташування та структурну композицію, наявність спільних делецій та інсерцій, можна припустити що усі виявлені фрагменти NUMT є результатом єдиної події інтеграції фрагмента мітохондріальної ДНК, що був гомологічний ділянці від кінцевої частини CR2 до гена ND4 та мав розмір ~ 8200 п.о., який зазнав подальшої дуплікації, фрагментації та інверсії. Зокрема, з огляду на взаємне

розташування та композицію, найбільш вірогідним є спільне походження фрагментів, позначених на рисунку 3.2. як NUMT_267, NUMT_3885 та NUMT_4003 (разом формують шматок розміром приблизно 8100 п.о.), NUMT_3181 та NUMT_956_1 (є логічними «продовженнями» одне одного), NUMT_2533 та NUMT_956_2 (аналогічно), та, імовірно, NUMT_662 та NUMT_940 (щоправда, вони не співпадають за напрямком). Відповідно до гіпотези було сформовано новий набір даних, в якому згадані фрагменти були об'єднані в конкатеновані послідовності.

Такий підхід надав змогу усунути суперечності, що виникли при першій спробі реконструкції: гілки стали більш структурованими, а суміжні фрагменти стали об'єднуватися у спільні клади, що, на думку автора, є логічним та більш правдоподібним з огляду на просторове розташування фрагментів NUMT (Рис.3.4.2.). В результаті усі фрагменти NUMT, як і в попередньому випадку, утворювали єдиний кластер із короткими гілками, що потенційно свідчить про їх недавнє спільне походження. На дереві чітко виділяються дві субклади, перша з яких об'єднує фрагменти та конкатенати більшого розміру (R_NUMT_8131, R_NUMT_8119, NUMT_5049, R_NUMT_3264 та об'єднаний NUMT_267_3885_4003), що розташовані у межах координат 102403203-102529972 третьої хромосоми *V.ursinii*, в той час як друга сформована із фрагментів та конкатенатів меншого розміру (R_NUMT_1823 та конкатенати R_NUMT_956_1_3181, R_NUMT_956_2_2533, R_NUMT_940_662), що розташовані в межах координат 102608636-102697530. Обидві субклади мають високі значення бутстреп-підтримки у вузлах.

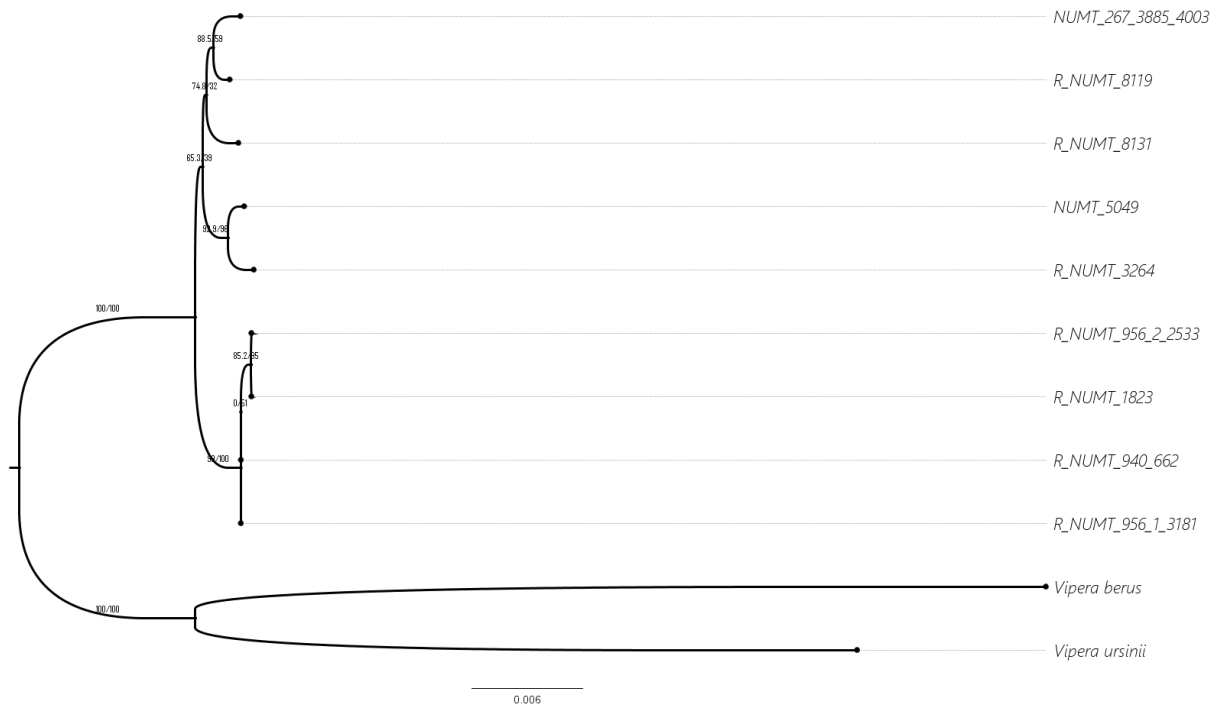


Рис. 3.5.2. Філогенетичної реконструкція походження фрагментів NUMT методом Maximum Likelihood відповідно до гіпотези про спільне походження фрагментів. Числа на гілках відображають рівень бутстреп-підтримки.

Субклада, представлена більшими фрагментами NUMT, імовірно, походить від первинної події інтеграції, в той час як субклада, сформована коротшими та сильніше фрагментованими послідовностями, відображає події вторинної інтеграції та фрагментації вже закріпленої у ядерному геномі мітохондріальної послідовності. На користь цієї гіпотези можуть свідчити не тільки філогенетична підтримка та просторова локалізація фрагментів, але і ряд спільних ознак: для «великої» субклади характерні спільні патерни інсерцій (інсерція AGAGT у R_NUMT_8131, R_NUMT_8119, NUMT_5049, R_NUMT_3264, у складі об'єднаного NUMT_267_3885_4003 у фрагменті 3885; повторювані одонуклеотидні інсерції 116T та 174C у R_NUMT_8131, R_NUMT_8119 та NUMT_267_3885_4003 у фрагменті 267), а в «малій» субкладі спостерігається переважна єдність орієнтації відносно мітогеному (усі,

окрім NUMT_662, протилежні за напрямком), спільна зона гомології (від CR2 до COX2) та повторювані патерни делецій (R_NUMT_1823 та об'єднаний R_NUMT_956_2_2533 містять делецію блоку тРНК).

3.6. Гіпотетична модель постінтеграційної еволюції NUMT

Враховуючи наявні дані про гомологію NUMTs із частинами мітохондріального геному, їх просторову організацію та результати філогенетичного аналізу, можна запропонувати модель, що описує імовірний шлях інтеграції мітохондріальної ДНК до ядра та її подальшу трансформацію. За цією моделлю, первинна подія інтеграції полягала у перенесенні до ядра фрагменту мтДНК розміром ~8200 п.о., що був гомологічний ділянці від кінцевої частини CR2 до гена ND4 та його закріпленні у інвертованому положенні. Невдовзі після фіксації фрагмент набув пентаінсерції AGAGT, після чого зазнав кількох подій дуплікації, частково з інверсіями. Одна з таких дуплікацій (імовірно більш давня) призвела до формування дещо відособленого кластеру, що поєднує фрагменти довжиною 5049 п.о. та 3264 п.о. Інша подія дуплікації відбулася після набуття предковим фрагментом двох точкових інсерцій та призвела до формування фрагментів довжиною 8119 п.о., 8131 п.о.. Вподальшому один з цих двох фрагментів, імовірно, зазнав дуплікації з інверсією та утворив копію, що була фрагментована на ділянки довжиною 267, 3885 та 4003 п.о.. Паралельно в результаті часткової дуплікації одного з великих фрагментів, що зберіг первинну орієнтацію відносно мітогеному, утворився фрагмент, що невдовзі після фіксації зазнав фрагментації та наразі представлений як вставки довжиною 3181 та 956 п.о., після чого він був декілька разів дуплікований так, що кожного разу дупліковані фрагменти ставали все коротшими та накопичували делеції. У процесі дуплікації фрагмент довжиною 662 п.о. додатково зазнав інверсії. Для кращої візуалізації цієї моделі було створено кладограму об'єднаних

фрагментів NUMT та співставлено з просторовою організацією ділянок на хромосомі (Рис. 3.5.).

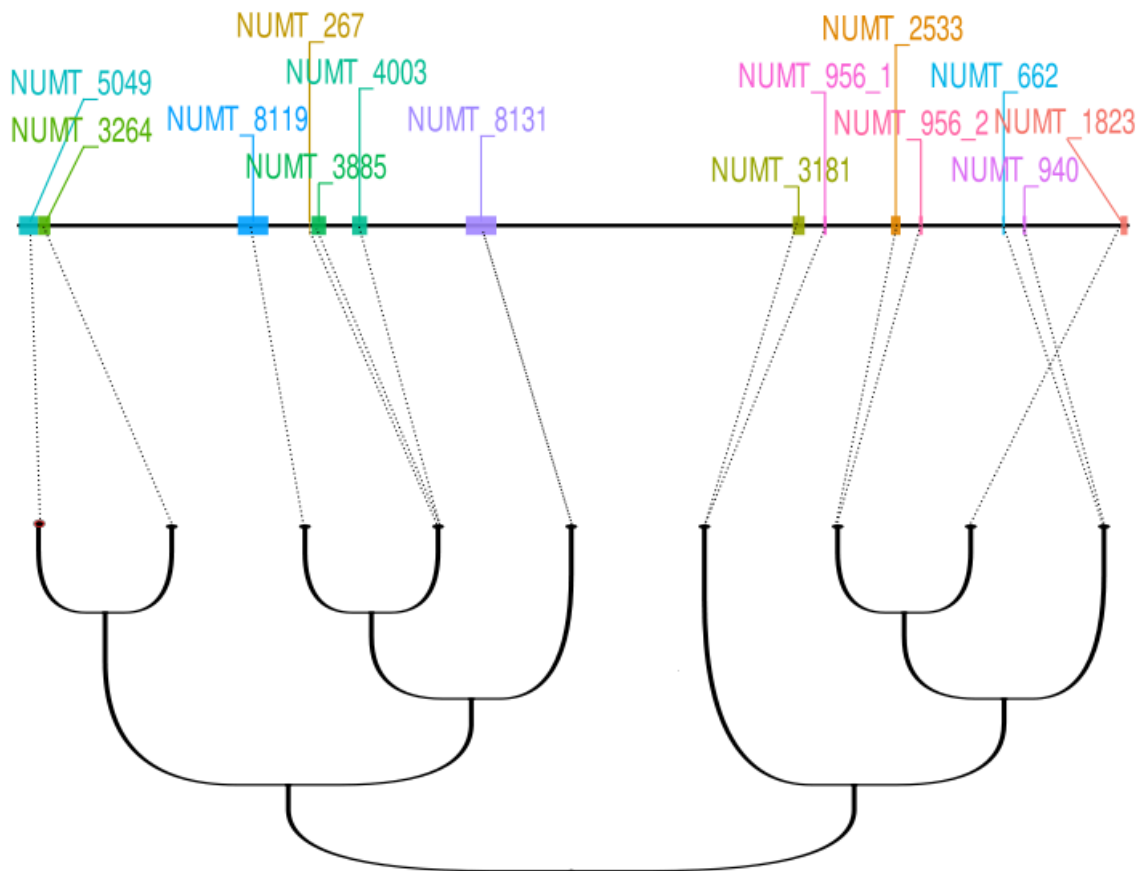


Рис.3.6. Схема, що об'єднує кладограму філогенії NUMT та візуалізацію просторового розташування фрагментів (кожен виділено окремим кольором) на третій хромосомі *V.ursinii*. Пунктирні лінії відображають взаємозв'язок між відповідними послідовностями.

З огляду на розташування кластеру фрагментів NUMT у перицентромерній ділянці хромосоми та наявність великої кількості різноманітних мобільних генетичних елементів на фланках, дуплікація та фрагментація можуть бути спричинені як лабільністю геному, так і активністю мобільних генетичних елементів. Хоча перицентромерні ділянки майже не зазнають дії класичних механізмів кросинговеру з огляду на щільну гетерохроматинову структуру, ці ділянки часто насичені повторюваними послідовностями (сателіти та мобільні генетичні елементи), що множаться за рахунок механізму non-allelic homologous

recombination (NAHR) - рекомбінації між нелокальними (не-алельними) подібними послідовностями, що призводить до “зсуву вирівнювання” хромосом і внаслідок цього до дуплікацій (або делецій) сусідніх ділянок [129]. Ретротранспозони типу LINE \ Bov-B здатні захоплювати та переносити у сусідні ділянки фрагменти ДНК через target-primed reverse transcription (TPRT). Під час цього процесу фермент ORF2 створює розрив у місці майбутньої вставки та продукує власну копію через механізм зворотньої транскрипції, під час якої нерідко «перепишує» також частину сусідньої ДНК (явище 3'-трансдукції) і сприяє активації SINE-транспозонів, якщо вони розташовані поруч [130]. До процесу фрагментації також можуть бути залучені ретроелементи класів hAT-Charlie та Gypsy, які функціонують за принципом «copy-and-paste» та здатні утворювати дволанцюгові розриви ДНК [125]. Згадані класи мобільних генетичних елементів, на відміну від ссавців, досі проявляють ознаки активності серед змій, в тому числі у гадюк, що свідчить про їх активну участь у нещодавніх подіях реаранжування геному рептилій [131,132].

Не зважаючи на велику кількість потенційних «винуватців» дуплікації та фрагментації NUMT, упевнено вказати на конкретний тип чи клас мобільних елементів, що ініціював ці події, неможливо. Хоча на фланках NUMT ідентифіковано ділянки, подібні на транспозони, їх розподіл не формує чітких закономірностей; як висновок можна припустити, що формування сучасного вигляду кластеру інтегратів мітохондріального походження відбулося внаслідок комбінованої дії мобільних генетичних елементів.

3.7. NUMT як доказ приналежності *Vipera anatolica* до комплексу *V. ursinii-renardi*

З огляду на розбіжності у філогенії *Vipera anatolica*, отриманої на основі аналізу мітохондріальних маркерів та даних ddRAD-секвенування,

виконаних відповідно Zinenko *et al.* [77] та Dufresnes *et al.* [5], еволюційна історія виду є результатом міжвидових контактів, що відбувалися на стику ареалів предків представників комплексу *V.ursinii-renardi-kaznakovi*. Географічне положення в межах Анатолійського півострова та схожість екологічних ніш створювали умови для гібридизації між видами, і, як наслідок, мітохондріальний геном *V.anatolica* міг бути інтрогресований від спорідненого таксону, в той час як ядерний міг зберегти автентичні риси комплексу.

Для тестування гіпотези про мітохондріальну інтрогресію доцільним є використання виявленого NUMT у *V.anatolica* як додаткового філогенетичного маркера. Прикладами подібних підходів використання наявності\відсутності NUMT як категоріальних маркерів є дослідження Einat Nazkani-Covo з аналізу еволюційної динаміки приматів [93], робота X. Liu *et al.* щодо розподілу та видоспецифічності NUMT у *Orthoptera* (автори використовують терміни “autaponumts” and “synaponumts” на позначення унікальних та спільних для декількох таксонів NUMT) [133], стаття Нау J. M. та співавторів, де NUMT було використано як аутгрупу для аналізу філогенетики популяцій *Sphenodon*, що не мають близькоспоріднених живих родичів [134].

Ідентичність фрагменту NUMT, виявленого у *V.anatolica*, до ділянки, розташованої за координатами 102466709-102467357 bp на третій хромосомі *V.ursinii*, свідчить про те, що подія інтеграції мітохондріального фрагмента передувала їхньому таксономічному розмежуванню. З урахуванням низької імовірності незалежної вставки однакових ділянок мтДНК у ядерні локуси, спостережуване явище є аргументом на користь тісної філогенетичної спорідненості *V.anatolica* із комплексом *V.ursinii-renardi* за ядерною ДНК та незалежно узгоджується із результатами, викладеними у роботі Dufresnes *et al.* [5].

Філогенетичне «заглиблення» *V.anatolica* на мітохондріальних деревах, відмічене у дослідженні Zinenko *et al.* [77], може відображати не

справді давню ізоляцію виду, а наслідки події мітохондріальної інтрогресії. У цьому контексті мтДНК виду може бути реліктом вимерлої нині лінії гадюк, що передала свій мітохондріальний геном під час давніх подій міжвидової гібридизації, внаслідок чого філогенетичний сигнал штучно зміщується у базальне положення комплексу *Pelias*.

Суперечність між мітохондріальними та ядерними сигналами перестає бути методологічною проблемою; геноми *V.anatolica* є мозаїкою слідів різних еволюційних подій, у яких ядерний компонент відображає зв'язки із представниками комплексу *V.ursinii-renardi*, а мітохондріальний несе у собі пам'ять про нині втрачену еволюційну лінію.

ВИСНОВКИ

Проведене дослідження дозволило поглибити уявлення про еволюцію мітохондріального геному в контексті цитонуклеарної сумісності та гібридаційних процесів у представників гадюк роду *Vipera*.

1. Нуклеотидна послідовність гену COX I демонструє головним чином нейтральну еволюцію з синонімічними замінами.

2. Результати аналізу трансляції COX I засвідчили переважно консервативний характер амінокислотних замін серед близько споріднених представників роду *Vipera*, що вказує на взаємну функціональну сумісність їх мітохондріальних геномів у випадках гібридизації та подій мітохондріальної інтрогресії. Кількість радикальних амінокислотних замін зростає з збільшенням еволюційної відстані між видами і справжню цитонуклеарну коеволюцію та несумісність у випадку міжвидової гібридизації слід очікувати на рівні різних підродів гадюк (*V. ammodytes* – решта дрібних гадюк роду *Vipera*).

3. Виявлений та охарактеризований NUMT *Vipera anatolica* демонструє значну дивергенцію від сучасної мітохондріальної послідовності COX I виду та споріднений із мітохондріальними послідовностями видів, що належать до комплексу кавказьких гадюк, зокрема *Vipera dinniki*.

4. У результаті BLAST-пошуку на третій хромосомі *V. ursinii* виявлено великий кластер NUMT із 14 фрагментів, що демонструють високу подібність ($\approx 95\%$) і гомологічність до NUMT *V. anatolica*. Філогенетичний аналіз NUMT свідчить про формування кластеру внаслідок єдиної події інтеграції великого фрагмента мітохондріальної ДНК, що вподальшому зазнавав серії дуплікацій, інверсій та фрагментації.

5. Наявність гомологічного NUMT у *V. anatolica* та *V. ursinii* свідчить про спільне походження цих видів. Таким чином, високо дивергентна

мітохондріальна ДНК *V. anatolica* є давнім запозиченням, отриманим внаслідок захоплення мітохондрій у іншого, наразі вимерлого виду.

6. Головним трендом в еволюції мітохондріального геному гадюк роду *Vipera* є не компенсаторна еволюція ядерного геному, а захоплення мітохондріальних геномів у споріднених видів внаслідок гібридизації.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Stoica O. C. Revisiting the Black Hole Entropy and the Information Paradox. *Advances in High Energy Physics*. 2018. Т. 2018. С. 1–16. URL: <https://doi.org/10.1155/2018/4130417> (дата звернення: 16.11.2025).
2. Gerbershagen, M. (2022). Quantum information and the emergence of spacetime in the AdS/CFT correspondence (PhD Thesis). Julius-Maximilians-Universität Würzburg. doi:10.25972/OPUS-28199
3. Veeraragavan S., Johansen M., Johnston I. G. Evolution and maintenance of mtDNA gene content across eukaryotes. *Biochemical Journal*. 2024. Т. 481, № 15. С. 1015–1042. URL: <https://doi.org/10.1042/bcj20230415> (дата звернення: 24.10.2025).
4. Roger A. J., Muñoz-Gómez S. A., Kamikawa R. The Origin and Diversification of Mitochondria. *Current Biology*. 2017. Т. 27, № 21. С. R1177–R1192. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.09.015> (дата звернення: 24.10.2025).
5. Phylogenomic insights into the diversity and evolution of Palearctic vipers / C. Dufresnes та ін. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2024. С. 108095. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2024.108095> (дата звернення: 24.10.2025).
6. Zardoya R. Recent advances in understanding mitochondrial genome diversity. *F1000Research*. 2020. Т. 9. С. 270. URL: <https://doi.org/10.12688/f1000research.21490.1> (дата звернення: 24.10.2025).
7. Oxusoff L., Préa P., Perez Y. A complete logical approach to resolve the evolution and dynamics of mitochondrial genome in bilaterians. *PLOS ONE*. 2018. Т. 13, № 3. С. e0194334. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194334> (дата звернення: 24.10.2025).

8. Vallès Y., Halanych K. M., Boore J. L. Group II Introns Break New Boundaries: Presence in a Bilaterian's Genome. *PLoS ONE*. 2008. Т. 3, № 1. С. e1488. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0001488> (дата звернення: 24.10.2025).
9. Molluscan mitochondrial genomes break the rules / F. Ghiselli та ін. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2021. Т. 376, № 1825. С. 20200159. URL: <https://doi.org/10.1098/rstb.2020.0159> (дата звернення: 24.10.2025).
10. Sandor S., Zhang Y., Xu J. Fungal mitochondrial genomes and genetic polymorphisms. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 2018. Т. 102, № 22. С. 9433–9448. URL: <https://doi.org/10.1007/s00253-018-9350-5> (дата звернення: 24.10.2025).
11. Rapid Evolution of Enormous, Multichromosomal Genomes in Flowering Plant Mitochondria with Exceptionally High Mutation Rates / D. B. Sloan та ін. *PLoS Biology*. 2012. Т. 10, № 1. С. e1001241. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001241> (дата звернення: 24.10.2025).
12. Richter, D. J., & Nitsche, F. (2016). *Choanoflagellata*. In J. M. Archibald, A. G. B. Simpson, & C. H. Slamovits (Eds.), *Handbook of the Protists* (pp. 1–19). Cham: Springer. ISBN 978-3-319-32669-6. Available at: <https://ficoherb.fciencias.unam.mx/Recursos/Bibl/Handbookoftheprotists.pdf> (дата звернення: 24.10.2025).
13. The alternative reality of plant mitochondrial DNA: One ring does not rule them all / A. Kozik та ін. *PLOS Genetics*. 2019. Т. 15, № 8. С. e1008373. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008373> (дата звернення: 24.10.2025).
14. From simple to supercomplex: mitochondrial genomes of euglenozoan protists / D. Faktorová та ін. *F1000Research*. 2016. Т. 5. С. 392.

- URL: <https://doi.org/10.12688/f1000research.8040.2> (дата звернення: 24.10.2025).
15. RNA-level unscrambling of fragmented genes in Diplonemamitochondria / G. N. Kiethega та ін. *RNA Biology*. 2013. Т. 10, № 2. С. 301–313. URL: <https://doi.org/10.4161/rna.23340> (дата звернення: 24.10.2025).
 16. Mitochondrial genome deletions and minicircles are common in lice (Insecta: Phthiraptera) / S. L. Cameron та ін. *BMC Genomics*. 2011. Т. 12, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2164-12-394> (дата звернення: 24.10.2025).
 17. Mitochondrial genome comparison reveals the evolution of cnidarians / H. Feng та ін. *Ecology and Evolution*. 2023. Т. 13, № 6. URL: <https://doi.org/10.1002/ece3.10157> (дата звернення: 24.10.2025).
 18. Nosek J., Tomáška L. Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Current Genetics*. 2003. Т. 44, № 2. С. 73–84. URL: <https://doi.org/10.1007/s00294-003-0426-z> (дата звернення: 24.10.2025).
 19. Metabolic remodelling associated with mtDNA: insights into the adaptive value of doubly uniparental inheritance of mitochondria / S. Bettinazzi та ін. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2019. Т. 286, № 1896. С. 20182708. URL: <https://doi.org/10.1098/rspb.2018.2708> (дата звернення: 24.10.2025).
 20. Biparental inheritance of organelles in *Pelargonium*: evidence for intergenomic recombination of mitochondrial DNA / J. Aritz та ін. *Planta*. 2012. Т. 237, № 2. С. 509–515. URL: <https://doi.org/10.1007/s00425-012-1768-x> (дата звернення: 24.10.2025).
 21. Adams, R. P. *Inheritance of chloroplasts and mitochondria in conifers: A review of paternal, maternal, leakage and facultative inheritance* / R. P. Adams // *Phytologia*. — 2019. — Т. 101, № 2. — С. 134–138. —

- Опубліковано онлайн 21 березня 2019 р. — ISSN 0303-1943. — Режим доступу: <https://www.phytologia.org/> (дата звернення: 24.10.2025)
22. A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle / A. Karnkowska та ін. *Current Biology*. 2016. Т. 26, № 10. С. 1274–1284. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.03.053> (дата звернення: 24.10.2025).
 23. Gabaldón T. Origin and Early Evolution of the Eukaryotic Cell. *Annual Review of Microbiology*. 2021. Т. 75, № 1. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-090817-062213> (дата звернення: 24.10.2025).
 24. Butterfield N. J. Early evolution of the Eukaryota. *Palaeontology*. 2014. Т. 58, № 1. С. 5–17. URL: <https://doi.org/10.1111/pala.12139> (дата звернення: 24.10.2025).
 25. Bravo-Arévalo J. E. Tracing the evolutionary pathway: on the origin of mitochondria and eukaryogenesis. *The FEBS Journal*. 2025. URL: <https://doi.org/10.1111/febs.70109> (дата звернення: 24.10.2025).
 26. A geological timescale for bacterial evolution and oxygen adaptation / A. A. Davín та ін. *Science*. 2025. Т. 388, № 6742. URL: <https://doi.org/10.1126/science.adp1853> (дата звернення: 24.10.2025).
 27. Cytonuclear integration and co-evolution / D. B. Sloan та ін. *Nature Reviews Genetics*. 2018. Т. 19, № 10. С. 635–648. URL: <https://doi.org/10.1038/s41576-018-0035-9> (дата звернення: 24.10.2025).
 28. Mori S., Sumiya N., Matsunaga S. Nucleomorph: A Fascinating Remnant of Endosymbiosis. *CYTOLOGIA*. 2022. Т. 87, № 3. С. 203–208. URL: <https://doi.org/10.1508/cytologia.87.203> (дата звернення: 24.10.2025).
 29. Johnston I. G., Williams B. P. Evolutionary Inference across Eukaryotes Identifies Specific Pressures Favoring Mitochondrial Gene Retention. *Cell*

- Systems*. 2016. Т. 2, № 2. С. 101–111.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.cels.2016.01.013> (дата звернення: 24.10.2025).
30. Wang Z., Wu M. Phylogenomic Reconstruction Indicates Mitochondrial Ancestor Was an Energy Parasite. *PLoS ONE*. 2014. Т. 9, № 10. С. e110685. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110685> (дата звернення: 24.10.2025).
31. A New Lineage of Eukaryotes Illuminates Early Mitochondrial Genome Reduction / J. Janouškovec та ін. *Current Biology*. 2017. Т. 27, № 23. С. 3717–3724.e5. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.10.051> (дата звернення: 24.10.2025).
32. Timmis J. N. Endosymbiotic Evolution: RNA Intermediates in Endosymbiotic Gene Transfer. *Current Biology*. 2012. Т. 22, № 9. С. R296–R298. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.03.043> (дата звернення: 24.10.2025).
33. Grewe F., Zhu A., Mower J. P. Loss of a Trans-Splicing nad1 Intron from Geraniaceae and Transfer of the Maturase Gene matR to the Nucleus in Pelargonium. *Genome Biology and Evolution*. 2016. Т. 8, № 10. С. 3193–3201. URL: <https://doi.org/10.1093/gbe/evw233> (дата звернення: 24.10.2025).
34. Keeling P. J. Horizontal gene transfer in eukaryotes: aligning theory with data. *Nature Reviews Genetics*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1038/s41576-023-00688-5> (дата звернення: 24.10.2025).
35. Multiple independent structural dynamic events in the evolution of snake mitochondrial genomes / L. Qian та ін. *BMC Genomics*. 2018. Т. 19, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4717-7> (дата звернення: 24.10.2025).
36. Comparative mitochondrial genomics of snakes: extraordinary substitution rate dynamics and functionality of the duplicate control region / Z. J. Jiang

- та ін. *BMC Evolutionary Biology*. 2007. Т. 7, № 1. С. 123.
URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2148-7-123> (дата звернення: 24.10.2025).
37. Evolution of the Noncoding Features of Sea Snake Mitochondrial Genomes within Elapidae / X. Xiaokaiti та ін. *Genes*. 2022. Т. 13, № 8. С. 1470.
URL: <https://doi.org/10.3390/genes13081470> (дата звернення: 24.10.2025).
38. Gao D., Liu C., Hao S. Characterization of the complete mitochondrial genome of the European adder (*Vipera berus*) using Illumina sequencing technology. *Conservation Genetics Resources*. 2017. Т. 10, № 4. С. 793–796. URL: <https://doi.org/10.1007/s12686-017-0932-9> (дата звернення: 24.10.2025).
39. Mito-nuclear co-evolution: the positive and negative sides of functional ancient mutations / L. Levin та ін. *Frontiers in Genetics*. 2014. Т. 5. URL: <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00448> (дата звернення: 24.10.2025).
40. Rand D. M., Haney R. A., Fry A. J. Cytonuclear coevolution: the genomics of cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*. 2004. Т. 19, № 12. С. 645–653. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.10.003> (дата звернення: 24.10.2025).
41. Kadenbach B. Complex IV– the regulatory center of mitochondrial oxidative phosphorylation. *Mitochondrion*. 2020. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.10.004> (дата звернення: 24.10.2025).
42. Gray M. W. Mosaic nature of the mitochondrial proteome: Implications for the origin and evolution of mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. Т. 112, № 33. С. 10133–10138. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1421379112> (дата звернення: 24.10.2025).

43. The Enigma of the Respiratory Chain Supercomplex / D. Milenkovic та ін. *Cell Metabolism*. 2017. Т. 25, № 4. С. 765–776. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2017.03.009> (дата звернення: 24.10.2025).
44. Elurbe D. M., Huynen M. A. The origin of the supernumerary subunits and assembly factors of complex I: A treasure trove of pathway evolution. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2016. Т. 1857, № 7. С. 971–979. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2016.03.027> (дата звернення: 24.10.2025).
45. Accessory subunits are integral for assembly and function of human mitochondrial complex I / D. A. Stroud та ін. *Nature*. 2016. Т. 538, № 7623. С. 123–126. URL: <https://doi.org/10.1038/nature19754> (дата звернення: 24.10.2025).
46. Higd1a is a positive regulator of cytochrome c oxidase / Т. Hayashi та ін. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2015. Т. 112, № 5. С. 1553–1558. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.1419767112> (дата звернення: 24.10.2025).
47. Parallel Structural Evolution of Mitochondrial Ribosomes and OXPHOS Complexes / E. O. van der Sluis та ін. *Genome Biology and Evolution*. 2015. Т. 7, № 5. С. 1235–1251. URL: <https://doi.org/10.1093/gbe/evv061> (дата звернення: 24.10.2025).
48. Hill G. E. Mitonuclear Compensatory Coevolution. *Trends in Genetics*. 2020. Т. 36, № 6. С. 403–414. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2020.03.002> (дата звернення: 24.10.2025).
49. Sloan D. B., Fields P. D., Havird J. C. Mitonuclear linkage disequilibrium in human populations. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2015. Т. 282, № 1815. С. 20151704.

- URL: <https://doi.org/10.1098/rspb.2015.1704> (дата звернення: 24.10.2025).
50. Genomic signatures of mitonuclear coevolution in mammals / R. J. Weaver та ін. *Molecular Biology and Evolution*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msac233> (дата звернення: 24.10.2025).
51. Mitonuclear Coevolution, but not Nuclear Compensation, Drives Evolution of OXPHOS Complexes in Bivalves / G. Piccinini та ін. *Molecular Biology and Evolution*. 2021. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab054> (дата звернення: 24.10.2025).
52. Burton R. S. The role of mitonuclear incompatibilities in allopatric speciation. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 2022. Т. 79, № 2. URL: <https://doi.org/10.1007/s00018-021-04059-3> (дата звернення: 24.10.2025).
53. A lethal mitonuclear incompatibility in complex I of natural hybrids / B. M. Moran та ін. *Nature*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06895-8> (дата звернення: 24.10.2025).
54. Postel Z., Touzet P. Cytonuclear Genetic Incompatibilities in Plant Speciation. *Plants*. 2020. Т. 9, № 4. С. 487. URL: <https://doi.org/10.3390/plants9040487> (дата звернення: 24.10.2025).
55. Hill G. E. Mitonuclear Ecology. *Molecular Biology and Evolution*. 2015. Т. 32, № 8. С. 1917–1927. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msv104> (дата звернення: 24.10.2025).
56. Hill G. E. Mitonuclear coevolution as the genesis of speciation and the mitochondrial DNA barcode gap. *Ecology and Evolution*. 2016. Т. 6, № 16. С. 5831–5842. URL: <https://doi.org/10.1002/ece3.2338> (дата звернення: 24.10.2025).

57. Does Nonneutral Evolution Shape Observed Patterns of DNA Variation in Animal Mitochondrial Genomes? / A. S. Gerber та ін. *Annual Review of Genetics*. 2001. Т. 35, № 1. С. 539–566. URL: <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.091106> (дата звернення: 24.10.2025).
58. Intergenomic Epistasis for Fitness: Within-Population Interactions Between Cytoplasmic and Nuclear Genes in *Drosophila melanogaster* / D. K. Dowling та ін. *Genetics*. 2006. Т. 175, № 1. С. 235–244. URL: <https://doi.org/10.1534/genetics.105.052050> (дата звернення: 24.10.2025).
59. Admixture Mapping Reveals Evidence for Multiple Mitonuclear Incompatibilities in Swordtail Fish Hybrids / N. V. Robles та ін. *Molecular Ecology*. 2025. URL: <https://doi.org/10.1111/mec.70106> (дата звернення: 24.10.2025).
60. Ellison C. K., Burton R. S. INTERPOPULATION HYBRID BREAKDOWN MAPS TO THE MITOCHONDRIAL GENOME. *Evolution*. 2008. Т. 62, № 3. С. 631–638. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.2007.00305.x> (дата звернення: 24.10.2025).
61. TOEWS D. P. L., BRELSFORD A. The biogeography of mitochondrial and nuclear discordance in animals. *Molecular Ecology*. 2012. Т. 21, № 16. С. 3907–3930. URL: <https://doi.org/10.1111/j.1365-294x.2012.05664.x> (дата звернення: 24.10.2025).
62. Mitonuclear interactions impact aerobic metabolism in hybrids and may explain mitonuclear discordance in young, naturally hybridizing bird lineages / C. S. McDiarmid та ін. *Molecular Ecology*. 2024. URL: <https://doi.org/10.1111/mec.17374> (дата звернення: 24.10.2025).
63. Gershoni M., Templeton A. R., Mishmar D. Mitochondrial bioenergetics as a major motive force of speciation. *BioEssays*. 2009. Т. 31, № 6.

- C. 642–650. URL: <https://doi.org/10.1002/bies.200800139> (дата звернення: 24.10.2025).
64. Haenel G. J., Solomon C., Boudett E. Hybrid lizards with introgressed MtDNA show increased resistance to DNA damage from reactive oxygen species. *Evolutionary Ecology*. 2025. URL: <https://doi.org/10.1007/s10682-025-10338-3> (дата звернення: 24.10.2025).
65. Brennan I. G., Bauer A. M., Jackman T. R. Mitochondrial introgression via ancient hybridization, and systematics of the Australian endemic pygopodid gecko genus *Delma*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2016. Т. 94. С. 577–590. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2015.10.005> (дата звернення: 24.10.2025).
66. A Guide to the Clinical Management of Viper Snakebite in Italy / M. R. Di Nicola та ін. *Toxins*. 2024. Т. 16, № 6. С. 255. URL: <https://doi.org/10.3390/toxins16060255> (дата звернення: 24.10.2025).
67. Vipers of Major clinical relevance in Europe: Taxonomy, venom composition, toxicology and clinical management of human bites / M. R. Di Nicola та ін. *Toxicology*. 2021. Т. 453. С. 152724. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tox.2021.152724> (дата звернення: 24.10.2025).
68. The IUCN Red List of Threatened Species. *IUCN Red List of Threatened Species*. URL: <https://www.iucnredlist.org/> (дата звернення: 24.10.2025).
69. Unveiling the Evolutionary History of European Vipers and Their Venoms From a Multi-Omic Approach / A. Talavera та ін. *Molecular Ecology*. 2025. URL: <https://doi.org/10.1111/mec.70019> (дата звернення: 24.10.2025).
70. Evaluating taxonomic inflation: towards evidence-based species delimitation in Eurasian vipers (Serpentes: Viperinae) / I. Freitas та ін. *Amphibia-Reptilia*. 2020. Т. 41, № 3. С. 285–311.

- URL: <https://doi.org/10.1163/15685381-bja10007> (дата звернення: 24.10.2025).
71. Guiller G., Lourdais O., Ursenbacher S. Hybridization between a Euro-Siberian (*Vipera berus*) and a Para-Mediterranean viper (*V. aspis*) at their contact zone in western France. *Journal of Zoology*. 2016. Т. 302, № 2. С. 138–147. URL: <https://doi.org/10.1111/jzo.12431> (дата звернення: 24.10.2025).
 72. Hidden in the sand: phylogenomics unravel an unexpected evolutionary history on the desert-adapted vipers of the genus *Cerastes* / G. Mochales-Riaño та ін. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2023. С. 107979. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2023.107979> (дата звернення: 24.10.2025).
 73. A new population and subspecies of the critically endangered Anatolian meadow viper *Vipera anatolica* Eiselt and Baran, 1970 in eastern Antalya province / B. Göçmen та ін. *Amphibia-Reptilia*. 2017. Т. 38, № 3. С. 289–305. URL: <https://doi.org/10.1163/15685381-00003111> (дата звернення: 24.10.2025).
 74. Zinenko, O., Avci, A., Spitzenberger, F., Tupikov, A., Shiryaev, K., Bozkurt, E., ... & Stuempel, N. *Rediscovered and critically endangered: Vipera anatolica EISELT & BARAN, 1970, of the western Taurus Mountains (Turkey), with remarks on its ecology* / O. Zinenko, A. Avci, F. Spitzenberger [та ін.] // *Herpetozoa*. — 2016. — Т. 28. — С. 63–73.
 75. Göçmen, B., Mulder, J., Karış, M., & Oğuz, M. A. *The poorly known Anatolian Meadow Viper, Vipera anatolica: new morphological and ecological data* / B. Göçmen, J. Mulder, M. Karış, M. A. Oğuz // *Herpetologica Romanica*. — 2014. — Т. 8. — С. 1–10. — ISSN 1842-9203. — Режим доступу: <http://biozoojournals.ro/herprom/herprom.html> (дата звернення: 24.10.2025)

76. Extended Snake Venomics by Top-Down In-Source Decay: Investigating the Newly Discovered Anatolian Meadow Viper Subspecies, *Vipera anatolica senliki* / B.-F. Hempel та ін. *Journal of Proteome Research*. 2020. Т. 19, № 4. С. 1731–1749. URL: <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.9b00869> (дата звернення: 24.10.2025).
77. Mitochondrial phylogeny shows multiple independent ecological transitions and northern dispersion despite of Pleistocene glaciations in meadow and steppe vipers (*Vipera ursinii* and *Vipera renardi*) / O. Zinenko та ін. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2015. Т. 84. С. 85–100. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2014.12.005> (дата звернення: 24.10.2025).
78. The Mighty NUMT: Mitochondrial DNA Flexing Its Code in the Nuclear Genome / L. Xue та ін. *Biomolecules*. 2023. Т. 13, № 5. С. 753. URL: <https://doi.org/10.3390/biom13050753> (дата звернення: 24.10.2025).
79. du Buy H. G., Riley F. L. HYBRIDIZATION BETWEEN THE NUCLEAR AND KINETOPLAST DNA'S OF *Leishmania enriettii* AND BETWEEN NUCLEAR AND MITOCHONDRIAL DNA'S OF MOUSE LIVER. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1967. Т. 57, № 3. С. 790–797. URL: <https://doi.org/10.1073/pnas.57.3.790> (дата звернення: 24.10.2025).
80. Mitochondrial D-loop sequences are integrated in the rat nuclear genome† / S. Zullo та ін. *Journal of Molecular Biology*. 1991. Т. 221, № 4. С. 1223–1235. URL: [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(91\)90930-5](https://doi.org/10.1016/0022-2836(91)90930-5) (дата звернення: 24.10.2025).
81. Lewin R. Promiscuous DNA leaps all barriers. *Science*. 1983. Т. 219, № 4584. С. 478–479. URL: <https://doi.org/10.1126/science.6823547> (дата звернення: 24.10.2025).

82. The genomic landscape of polymorphic human nuclear mitochondrial insertions / G. Dayama та ін. *Nucleic Acids Research*. 2014. Т. 42, № 20. С. 12640–12649. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gku1038> (дата звернення: 24.10.2025).
83. Horizontal Transfer of Entire Genomes via Mitochondrial Fusion in the Angiosperm *Amborella* / D. W. Rice та ін. *Science*. 2013. Т. 342, № 6165. С. 1468–1473. URL: <https://doi.org/10.1126/science.1246275> (дата звернення: 24.10.2025).
84. Mammalian NUMT insertion is non-random / J. Tsuji та ін. *Nucleic Acids Research*. 2012. Т. 40, № 18. С. 9073–9088. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gks424> (дата звернення: 24.10.2025).
85. A comprehensive atlas of nuclear sequences of mitochondrial origin (NUMT) inserted into the pig genome / M. Bolner та ін. *Genetics Selection Evolution*. 2024. Т. 56, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s12711-024-00930-6> (дата звернення: 24.10.2025).
86. Puertas M. J., González-Sánchez M. Insertions of mitochondrial DNA into the nucleus—effects and role in cell evolution. *Genome*. 2020. Т. 63, № 8. С. 365–374. URL: <https://doi.org/10.1139/gen-2019-0151> (дата звернення: 24.10.2025).
87. Michalovova M., Vyskot B., Kejnovsky E. Analysis of plastid and mitochondrial DNA insertions in the nucleus (NUPTs and NUMTs) of six plant species: size, relative age and chromosomal localization. *Heredity*. 2013. Т. 111, № 4. С. 314–320. URL: <https://doi.org/10.1038/hdy.2013.51> (дата звернення: 24.10.2025).
88. Nuclear-embedded mitochondrial DNA sequences in 66,083 human genomes / W. Wei та ін. *Nature*. 2022. URL: <https://doi.org/10.1038/s41586-022-05288-7> (дата звернення: 24.10.2025).

89. Characterization of Nuclear Mitochondrial Insertions in Canine Genome Assemblies / P. Z. Schall та ін. *Genes*. 2024. Т. 15, № 10. С. 1318. URL: <https://doi.org/10.3390/genes15101318> (дата звернення: 24.10.2025).
90. Nuclear Integrants of Organellar DNA Contribute to Genome Structure and Evolution in Plants / G.-J. Zhang та ін. *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. Т. 21, № 3. С. 707. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms21030707> (дата звернення: 24.10.2025).
91. Liu H., Liu Y., Hu Y. Mitochondrial Impostors: Prevalence and Impacts of NUMTs on Genetic and Evolutionary Studies in Carnivora. *Genome Biology and Evolution*. 2025. URL: <https://doi.org/10.1093/gbe/evaf174> (дата звернення: 24.10.2025).
92. Nuclear-mitochondrial DNA segments resemble paternally inherited mitochondrial DNA in humans / W. Wei та ін. *Nature Communications*. 2020. Т. 11, № 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15336-3> (дата звернення: 24.10.2025).
93. Hazkani-Covo E. Mitochondrial Insertions into Primate Nuclear Genomes Suggest the Use of numts as a Tool for Phylogeny. *Molecular Biology and Evolution*. 2009. Т. 26, № 10. С. 2175–2179. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msp131> (дата звернення: 24.10.2025).
94. Comparative genome microsynteny illuminates the fast evolution of nuclear mitochondrial segments (NUMTs) in mammals / M. Uvizl та ін. *Molecular Biology and Evolution*. 2023. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msad278> (дата звернення: 24.10.2025).
95. Hazkani-Covo E., Zeller R. M., Martin W. Molecular Poltergeists: Mitochondrial DNA Copies (numts) in Sequenced Nuclear Genomes. *PLoS Genetics*. 2010. Т. 6, № 2. С. e1000834.

- URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000834> (дата звернення: 24.10.2025).
96. QIAGEN PCR Cloning Kits. Sample to Insight - QIAGEN. URL: <https://www.qiagen.com/us/products/discovery-and-translational-research/pcr-qpcr-dpcr/pcr-enzymes-and-kits/hifidelity-long-range-and-other-pcr/qiagen-pcr-cloning-kits> (дата звернення: 17.11.2025).
97. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms / S. Kumar та ін. *Molecular Biology and Evolution*. 2018. Т. 35, № 6. С. 1547–1549. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096> (дата звернення: 17.11.2025).
98. National Center for Biotechnology Information (NCBI) [Електронний ресурс]. — Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information, [1988]. — Режим доступу: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> (дата звернення: 24.10.2025).
99. 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. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/mst010> (дата звернення: 24.10.2025).
100. Hall, T. A. *BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT* / T. A. Hall // *Nucleic Acids Symposium Series*. — 1999. — Vol. 41, № 41. — С. 95–98.
101. Tamura K., Stecher G., Kumar S. MEGA11: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 11. *Molecular Biology and Evolution*. 2021. Т. 38, № 7. С. 3022–3027. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120> (дата звернення: 24.10.2025).
102. Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*. 1989. Т. 123, № 3. С. 585–595. URL: <https://doi.org/10.1093/genetics/123.3.585> (дата звернення: 24.10.2025).

103. McDonald J. H., Kreitman M. Adaptive protein evolution at the Adh locus in *Drosophila*. *Nature*. 1991. Т. 351, № 6328. С. 652–654. URL: <https://doi.org/10.1038/351652a0> (дата звернення: 24.10.2025).
104. DnaSP 6: DNA Sequence Polymorphism Analysis of Large Data Sets / J. Rozas та ін. *Molecular Biology and Evolution*. 2017. Т. 34, № 12. С. 3299–3302. URL: <https://doi.org/10.1093/molbev/msx248> (дата звернення: 24.10.2025).
105. W-IQ-TREE: a fast online phylogenetic tool for maximum likelihood analysis / J. Trifinopoulos та ін. *Nucleic Acids Research*. 2016. Т. 44, W1. С. W232–W235. URL: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw256> (дата звернення: 24.10.2025).
106. Rambaut, A. (2012) FigTree, Version 1.4.3. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (дата звернення: 24.10.2025)
107. R Core Team (2025). *_R: A Language and Environment for Statistical Computing_*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <https://www.R-project.org/>.
108. Smit, A., Hubley, R., & Green, P. *RepeatMasker Open-4.0* [Електронний ресурс]. — 2013–2015. — Режим доступу: <http://www.repeatmasker.org> (дата звернення: 24.10.2025)
109. The Galaxy Community. *The Galaxy platform for accessible, reproducible, and collaborative data analyses: 2024 update* / The Galaxy Community // *Nucleic Acids Research*. — 2024. — Vol. 52, Issue W1. — P. W83–W94. — DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkae410> (дата звернення: 24.10.2025)
110. Integrative genomics viewer / J. T. Robinson та ін. *Nature Biotechnology*. 2011. Т. 29, № 1. С. 24–26. URL: <https://doi.org/10.1038/nbt.1754> (дата звернення: 24.10.2025).
111. Wickham H, François R, Henry L, Müller K, Vaughan D (2025). dplyr: A Grammar of Data Manipulation. R package version 1.1.4, <https://dplyr.tidyverse.org> (дата звернення: 08.11.2025).

112. Wickham H (2025). stringr: Simple, Consistent Wrappers for Common String Operations. R package version 1.6.0, <https://stringr.tidyverse.org> (дата звернення: 08.11.2025).
113. H. Wickham. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. Springer-Verlag New York, 2016.
114. Neuwirth E (2022). RColorBrewer: ColorBrewer Palettes. R package version 1.1-3, <https://CRAN.R-project.org/package=RColorBrewer> (дата звернення: 08.11.2025).
115. Pagès H, Aboyoun P, Gentleman R, DebRoy S (2025). Biostrings: Efficient manipulation of biological strings. doi:10.18129/B9.bioc.Biostrings, R package version 2.78.0, <https://bioconductor.org/packages/Biostrings> (дата звернення: 08.11.2025).
116. Aledo P., Aledo J. C. Proteome-Wide Structural Computations Provide Insights into Empirical Amino Acid Substitution Matrices. International Journal of Molecular Sciences. 2023. Т. 24, № 1. С. 796. URL: <https://doi.org/10.3390/ijms24010796> (дата звернення: 17.11.2025).
117. Dagan T., Talmor Y., Graur D. Ratios of Radical to Conservative Amino Acid Replacement are Affected by Mutational and Compositional Factors and May Not Be Indicative of Positive Darwinian Selection. Molecular Biology and Evolution. 2002. Vol. 19, no. 7. P. 1022–1025. URL: <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a004161> (date of access: 17.11.2025).
118. Grantham R. Amino Acid Difference Formula to Help Explain Protein Evolution. Science. 1974. Т. 185, № 4154. С. 862–864. URL: <https://doi.org/10.1126/science.185.4154.862> (дата звернення: 17.11.2025).
119. Ganesan A., Mohammadi N., Wang F. From building blocks of proteins to drugs: a quantum chemical study on structure–property relationships of phenylalanine, tyrosine and dopa. RSC Advances. 2014. Т. 4, № 17. С.

8617. URL: <https://doi.org/10.1039/c3ra47364c> (дата звернення: 17.11.2025).
120. Valine, Not Methionine, Is Amino Acid 106 in Human Cytosolic Thymidine Kinase (TK1) / D. Berenstein та ін. *Journal of Biological Chemistry*. 2000. Т. 275, № 41. С. 32187–32192. URL: <https://doi.org/10.1074/jbc.m005325200> (дата звернення: 17.11.2025).
121. The genome sequence of the Hungarian meadow viper, *Vipera ursinii rakosiensis* Méhely, 1893 / В. Halpern та ін. *Wellcome Open Research*. 2024. Т. 9. С. 404. URL: <https://doi.org/10.12688/wellcomeopenres.22694.1> (дата звернення: 01.11.2025).
122. Hassan N. T., Adelson D. L. Fake IDs? Widespread misannotation of DNA transposons as a general transcription factor. *Genome Biology*. 2023. Т. 24, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/s13059-023-03102-9> (дата звернення: 24.10.2025).
123. Human endogenous retrovirus-K (HML-2): a comprehensive review / M. Garcia-Montojo та ін. *Critical Reviews in Microbiology*. 2018. Т. 44, № 6. С. 715–738. URL: <https://doi.org/10.1080/1040841x.2018.1501345> (дата звернення: 24.10.2025).
124. Genomic characterization of large rearrangements of the LDLR gene in Czech patients with familial hypercholesterolemia / R. Goldmann та ін. *BMC Medical Genetics*. 2010. Т. 11, № 1. URL: <https://doi.org/10.1186/1471-2350-11-115> (дата звернення: 24.10.2025).
125. Structural basis of Ty3 retrotransposon integration at RNA Polymerase III-transcribed genes / G. Abascal-Palacios та ін. *Nature Communications*. 2021. Т. 12, № 1. URL: <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27338-w> (дата звернення: 24.10.2025).

126. LINE-2 transposable elements are a source of functional human microRNAs and target sites / R. Petri та ін. *PLOS Genetics*. 2019. Т. 15, № 3. С. e1008036. URL: <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008036> (дата звернення: 24.10.2025).
127. Existence of Bov-B LINE Retrotransposons in Snake Lineages Reveals Recent Multiple Horizontal Gene Transfers with Copy Number Variation / W. Puinongpo та ін. *Genes*. 2020. Т. 11, № 11. С. 1241. URL: <https://doi.org/10.3390/genes11111241> (дата звернення: 24.10.2025).
128. Kojima K. K. A New Class of SINEs with snRNA Gene-Derived Heads. *Genome Biology and Evolution*. 2015. Т. 7, № 6. С. 1702–1712. URL: <https://doi.org/10.1093/gbe/evv100> (дата звернення: 24.10.2025).
129. Miga K. H. Centromere studies in the era of ‘telomere-to-telomere’ genomics. *Experimental Cell Research*. 2020. Т. 394, № 2. С. 112127. URL: <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2020.112127> (дата звернення: 07.11.2025).
130. Pan-cancer analysis of whole genomes identifies driver rearrangements promoted by LINE-1 retrotransposition / B. Rodriguez-Martin та ін. *Nature Genetics*. 2020. Т. 52, № 3. С. 306–319. URL: <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0562-0> (дата звернення: 07.11.2025).
131. Evolutionary trajectories of snake genes and genomes revealed by comparative analyses of five-pacer viper / W. Yin та ін. *Nature Communications*. 2016. Т. 7, № 1. URL: <https://doi.org/10.1038/ncomms13107> (дата звернення: 07.11.2025).
132. The Mobilome of Reptiles: Evolution, Structure, and Function / S. Boissinot та ін. *Cytogenetic and Genome Research*. 2019. Т. 157, № 1-2. С. 21–33. URL: <https://doi.org/10.1159/000496416> (дата звернення: 07.11.2025).

133. Genomic and transcriptomic perspectives on the origin and evolution of NUMTs in Orthoptera / X. Liu та ін. *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 2024. С. 108221.
URL: <https://doi.org/10.1016/j.ympev.2024.108221> (дата звернення: 07.11.2025).
134. Hay J. M., Sarre S. D., Daugherty C. H. Nuclear mitochondrial pseudogenes as molecular outgroups for phylogenetically isolated taxa: a case study in *Sphenodon*. *Heredity*. 2004. Т. 93, № 5. С. 468–475.
URL: <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800525> (дата звернення: 07.11.2025).

ПОДЯКИ

Автор висловлює щиру подяку:

- колективу кафедри порівняльної анатомії Інституту зоології та біомедичних досліджень (IZBR) Ягеллонського університету (Uniwersytet Jagielloński), зокрема професору Мачею Пабіану (Maciej Rabijan) та Йоанні Якобик (Joanna Jakóvik) за можливість практичної підготовки, переданий досвід та фахові консультації, що суттєво сприяло виконанню дослідження;

- професору кафедри зоології та екології тварин Утевському Сергію Юрійовичу за отримані навички роботи з програмами реконструкції філогенії та аналізу еволюції послідовностей;
- доценту кафедри ботаніки та екології рослин Комаристій Вікторії Павлівні за отримані навички роботи з геномними браузерми та хмарними обчислювальними платформами;
- Збройним Силам України за їх щоденний подвиг, що уможливив написання цієї роботи;
- Жук Олесі, Казаковій Аліні, Обіденій Ксенії та Соколову Михайлу за щоденну моральну підтримку та натхнення.

ДОДАТКИ

Додаток 1. Послідовності генів COI представників роду *Vipera*, використані в цьому дослідженні

№	Вид	Код доступу в базі GenBank
1	<i>Vipera berus nikolskii</i>	KU986308.1
2	<i>Vipera berus</i>	KC122718.1
3	<i>Vipera berus</i>	MN993241.1
4	<i>Vipera berus</i>	MN993239.1
5	<i>Vipera berus</i>	HQ954792.1
6	<i>Vipera berus</i>	KP697893.1
7	<i>Vipera berus</i>	KP697845.1
8	<i>Vipera berus</i>	KP697944.1
9	<i>Vipera berus</i>	MN993243.1
10	<i>Vipera berus</i>	MN993242.1
11	<i>Vipera berus</i>	KP697872.1
12	<i>Vipera berus</i>	MN993240.1
13	<i>Vipera renardi</i>	KC122761.1
14	<i>Vipera renardi</i>	KC122754.1
15	<i>Vipera renardi</i>	KC122760.1
16	<i>Vipera renardi</i>	KC122752.1
17	<i>Vipera lotievi</i>	KC122732.1
18	<i>Vipera lotievi</i>	KC122727.1
19	<i>Vipera lotievi</i>	KC122726.1
20	<i>Vipera renardi</i>	KC122757.1
21	<i>Vipera renardi</i>	KC122753.1
22	<i>Vipera renardi</i>	KC122717.1

23	<i>Vipera lotievi</i>	KC122731.1
24	<i>Vipera renardi</i>	KC122755.1
25	<i>Vipera renardi</i>	KC122751.1
26	<i>Vipera lotievi</i>	KC122730.1
27	<i>Vipera lotievi</i>	KC122729.1
28	<i>Vipera lotievi</i>	KC122728.1
29	<i>Vipera lotievi</i>	KC122725.1
30	<i>Vipera renardi</i>	KC122759.1
31	<i>Vipera renardi</i>	KC122735.1
32	<i>Vipera renardi</i>	KC122756.1
33	<i>Vipera renardi</i>	KC122716.1
34	<i>Vipera renardi</i>	KC122758.1
35	<i>Vipera eriwanensis ebneri</i>	KC122733.1
36	<i>Vipera eriwanensis</i>	KC122723.1
37	<i>Vipera eriwanensis</i>	KC122722.1
38	<i>Vipera ursinii</i>	KC122750.1
39	<i>Vipera ursinii</i>	KC122749.1
40	<i>Vipera ursinii</i>	KC122748.1
41	<i>Vipera ursinii</i>	KC122747.1
42	<i>Vipera ursinii</i>	KC122746.1
43	<i>Vipera ursinii</i>	KC122745.1
44	<i>Vipera ursinii</i>	KC122743.1
45	<i>Vipera ursinii</i>	KC122744.1
46	<i>Vipera ursinii</i>	KC122742.1
47	<i>Vipera ursinii</i>	KC122739.1
48	<i>Vipera ursinii</i>	KC122738.1
49	<i>Vipera orlovi</i>	KC122734.1
50	<i>Vipera kaznakovi</i>	KC122724.1
51	<i>Vipera ursinii</i>	KC122741.1

52	<i>Vipera ursinii</i>	KC122740.1
53	<i>Vipera ursinii</i>	KC122737.1
54	<i>Vipera dinniki</i>	KC122720.1
55	<i>Vipera dinniki</i>	KC122719.1
56	<i>Vipera ursinii anatolica</i>	KC122762.1
57	<i>Vipera seoanei</i> *	KC122736.1
58	<i>Vipera aspis</i> *	KP697881.1
59	<i>Vipera ammodytes</i> *	MN993238.1
60	<i>Vipera ammodytes</i> *	KU986335.1
61	NUMT COI <i>Vipera anatolica</i> **	-

* - використані як аутгрупа (outgroup)

** - отримана від Олександра Зіненка та Мачея Пабіяна

Додаток 2. Файли із вирівнюваннями послідовностей

У складі електронних додатків подано такі файли:

- [vipera_COI_align_for_thesis.fas](#) - файл із нуклеотидним вирівнюванням гена COX I для представників роду *Vipera*;
- [vipera_COI_align_for_thesis_amino_acid.fas](#) - файл з амінокислотним вирівнюванням гена COX I для представників роду *Vipera*.

Додаток 3. АНОТАЦІЯ (АНГЛІЙСЬКОЮ)

ANNOTATION

Ivanova O.O. Evolution of the mitochondrial genome in the light of cytonuclear incompatibility and hybridization on the example of the genus *Vipera* (Laurenti, 1768). – Master's qualification work. – V. N. Karazin Kharkiv National University, Department of Zoology and Animal Ecology, Kharkiv, 2025.

The master's work is presented on 83 pages, which includes the following sections: table of contents, introduction, main part, conclusions and list of used literature. This work includes 7 figures, 134 used sources and 3 appendices.

The rapid molecular evolution of the mitochondrial genome compared to the nuclear one, as well as the deep integration of nuclear and mitochondrial genomes in cellular metabolism creates an interesting system that potentially co-evolves and creates barriers to interspecific hybridization. We studied the genomes of several species of vipers of the genus *Vipera* and searched for the prerequisites for cytonuclear incompatibility in interspecific hybrids and coevolution within the species.

Translation of the mitochondrial gene COX I in representatives of the genus *Vipera* demonstrated the presence of mostly single and conservative substitutions, which indicates the absence of a need for compensatory coevolution between mitochondrial and nuclear components of complex IV and with a high probability of mutual functional compatibility of the mitochondrial and nuclear genomes of vipers of the genus *Vipera*, which is confirmed by a large number of interspecific hybrids.

We also characterized nuclear DNA of mitochondrial origin (NUMT) in the genomes of vipers of the genus *Vipera*, and showed the possibility of using NUMT as phylogenetic markers to clarify the position of the controversial taxon

Vipera anatolica within the genus. . Phylogenetic analysis using the Maximum Likelihood method was applied, mapping of the identified fragments within the third chromosome of *Vipera ursinii* was performed, and NUMT homology analysis between *V. anatolica* and *V. ursinii* was performed.

The nuclear copy of the mitochondrial genome consists of fourteen homologous fragments of mitochondrial origin on the third chromosome of *V. ursinii*. Based on the obtained data, a model of post-integration evolution of NUMT fragments was proposed, which describes the probable paths of duplication, inversion and fragmentation after consolidation in the nuclear genome. The discovery of homologous NUMTs in *V. anatolica* and *V. ursinii* is considered as evidence of their common evolutionary history and provides support for the hypothesis that *V. anatolica* belongs to the *ursinii-renardi* complex and supports the scenario according to which the mitochondrial genome of the species could have been borrowed from a related taxon as a result of hybridization and mitochondrial introgression.

Published mitochondrial and nuclear genome sequences of representatives of the genus *Vipera* were used as the material for the study, as well as the previously unpublished NUMT sequence of *V. anatolica*, obtained from Zinenko O.I.

The scientific novelty of the work lies in the primacy of conducting a systematic study of NUMT in representatives of the genus *Vipera*; until now, these structures have not been described and considered in the context of categorical phylogenetic markers for this group. The practical significance of the results obtained lies in the possibility of using NUMT as a new type of phylogenetic data for phylogenetic and population genetic studies of the genus *Vipera*. The proposed approach can be adapted for the revision of taxa that exhibit a reticulate evolutionary history.

Keywords: mitochondrial genome, *Vipera*, NUMT, cytonuclear coevolution, phylogenetic markers.