

РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУЖЕРОДНОЙ МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ДНК ПРИ ПЕРВЫХ ДРОБЛЕНИЯХ ТРАНСМИТОХОНДРИАЛЬНЫХ ЭМБРИОНОВ МЫШИ

© М. Е. Кустова, В. А. Соколова, М. Г. Басс, Ф. М. Захарова, А. В. Сорокин, В. Б. Васильев¹

НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: vadim@mtdna.ru*

Проанализировано распределение митохондриальной ДНК (мтДНК) человека по отдельным blastomeres мыши при дроблении зародышей, в которые на стадии одной или двух клеток инъекцировали взвесь митохондрий человека. МтДНК человека определяли с помощью полимеразной цепной реакции, используя видоспецифические праймеры. Всего проанализировано 315 эмбрионов мыши на стадии 2 и 4 blastomeres. Во всех исследованных зародышах наряду с мышинной мтДНК присутствовали копии митохондриального генома человека, т. е. наблюдался феномен искусственно смоделированной гетероплазмы. Отмечено, что чужеродная мтДНК не всегда присутствовала во всех blastomeres трансмитохондриальных зародышей. Математическая обработка показала, что за время между инъекцией митохондрий человека и последующим дроблением не происходит равномерного распределения мтДНК человека по цитоплазме. Полученные результаты также указывают на наличие более 2—3 единиц сегрегации мтДНК в общем количестве митохондрий (примерно $5 \cdot 10^2$), введенных в зародыш при микроинъекции.

Ключевые слова: митохондрии, сегрегация мтДНК, гетероплазма, трансгенные мыши.

Проблема распределения мутантной митохондриальной ДНК (мтДНК) по тканям в ходе эмбрионального развития имеет большое, если не решающее, значение для понимания механизмов возникновения и прогрессирования так называемых митохондриальных болезней, обусловленных дегенерацией некоторых тканей (органов) из-за угнетения энергетического метаболизма (Васильев, 2006). Имеются в виду только те заболевания, которые прямо связаны с дефектом мтДНК и соответственно наследуются по материнской линии (почти все свои митохондрии зародыш человека получает из яйцеклетки).

В предыдущих исследованиях (Sokolova et al., 2004; Bass et al., 2006) мы показали принципиальную возможность получения лабораторных животных, развившихся из зигот, в которые были инъекцированы митохондрии человека. При этом чужеродная для организма мыши мтДНК человека выступает как аналог мутантного митохондриального генома, попадая лишь в некоторые ткани (мозаичность, наблюдаемая и у больных с расстройствами обмена энергии) и сосуществуя с собственной (мышинной) мтДНК (феномен гетероплазмы, т. е. сосуществования двух и более разновидностей мтДНК). В то же время она не вызывает ничего похожего на клинический фенотип, наблюдаемый у пациентов с болезнями ОХРНOS (oxidative phosphorylation). Мы предположили, что введение митохондрий человека в мышиную зиготу может оказаться полезным приемом для изучения распределения чужеродной (а в перспективе — и мутантной) мтДНК по тканям мышинного зародыша, и провели некоторые расчеты в поисках возможных закономерностей этого процесса (Басс и др., 2005; Bass et al., 2006). Однако однозначного алгоритма распределения чужеродной мтДНК по тканям трансмитохондри-

альных мышей не выявлено, возможно потому, что исследовались в основном новорожденные и взрослые животные, а также относительно небольшая выборка зародышей на поздних сроках внутриутробного развития.

Распределение различающихся копий митохондриального генома по дочерним клеткам в ходе цитокинеза напрямую зависит от сегрегации молекул мтДНК — практически неизученного процесса, в основе которого лежит неизвестный механизм, действующий как «бутылочное горлышко», пропускающее лишь часть молекул мтДНК из общего митохондриального пула материнской клетки (Nowell, 1999). Помимо общебиологического значения исследований сегрегации мтДНК выявление возможно существующего алгоритма ее распределения по тканям (органам) может вызвать решающий сдвиг в конструировании моделей митохондриальных болезней человека на животных. Невозможность целенаправленно получать изменения в заранее известных тканях животных затрудняет изучение патогенеза болезней ОХРНOS в настоящее время.

В связи с этим нами была поставлена задача исследовать распределение чужеродной мтДНК на ранних стадиях развития мышинных зародышей. В настоящей работе представлены результаты исследования зародышей, достигших стадии 2 и 4 blastomeres после инъекции митохондрий человека в мышиную зиготу.

Материал и методика

Получение митохондрий. Митохондрии человека выделяли из культуры клеток гепатомы человека HepG2. Клетки культивировали *in vitro* при 37 °С в среде

DMEM с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. Выделение митохондрий проводили методом дифференциального центрифугирования. Клетки лизировали в гипотоническом буфере (250 мМ сахарозы, 20 мМ Трис-НСI и 2 мМ ЭДТА, рН 7.4). Первое центрифугирование с целью осаждения ядер проводили при ускорении 750 g. Центрифугирование надосадочной жидкости проводили при ускорении 9600 g, что обеспечивало осаждение митохондрий. Полученную фракцию митохондрий переносили в PBS (рН 6.8) и образовавшуюся взвесь органелл использовали для микроинъекций в зиготы мыши.

Митохондрии, выделенные из печени мыши, использовали для получения мтДНК мыши, необходимой в качестве контроля, образцы тканей гомогенизировали в 4-кратном объеме гипотонического буфера. Далее митохондрии выделяли, как описано выше. Функциональную активность митохондрией оценивали при помощи красителя Mito Tracker Red, как описано ранее (Sokolova et al., 2004). Все процедуры проводили при 4 °С.

Перенос митохондрий человека в зиготу мыши и выделение ДНК. Использовали мышей (CBA × C57BL)F1 из питомника «Рапполово» (Санкт-Петербург) в возрасте 3 нед. Яйцеклетки получали с помощью гормональной стимуляции самок (Nagy et al., 2003): самкам вводили 5 единиц сывороточного гонадотропина (PMSG; фирма Интервет), через 48 ч им инъецировали 10 единиц хорионического гонадотропина (hCG; фирма Интервет) и подсаживали в клетку с самцами на ночь. Утром отбирали самок с копуляционными пробками. Зародышей извлекали из яйцеводов самок либо через 20 ч после введения hCG (для инъекции митохондрий человека в зиготу), либо через 46 ч (для инъекции митохондрий человека в один из blastомеров двухклеточного зародыша). Манипуляции с зародышами и техника микроинъекций в них митохондрий были разработаны и описаны нами ранее (Vasilyev et al., 1999). В зиготу или в один из blastомеров двухклеточного зародыша инъецировали суспензию митохондрий в объеме приблизительно 3—19 пкл, содержащую примерно 500 митохондрий.

После микроинъекции зиготы или двухклеточные зародыши многократно отмывали в среде HT-6 и культивировали в пластиковых чашках Петри в каплях среды M3 под слоем минерального масла в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °С. По достижении зародышами стадии 2 или 4 blastомеров эмбрионы разделяли на отдельные blastомеры, которые затем лизировали и выделяли из них тотальную ДНК.

Анализ присутствия мтДНК человека в клетках мышинных эмбрионов с помощью ПЦР. МтДНК человека в мышинных зародышах выявляли с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР), используя видоспецифические праймеры. Было проведено сравнение последовательностей мтДНК человека (Anderson et al., 1981) и мыши (Bibb et al., 1981). Для синтеза 5'-праймеров выбрали близкие по локализации негомологичные участки 13959—13976 в мтДНК человека и 13437—13455 в мтДНК мыши. Для синтеза 3'-праймеров были выбраны участки 14190—14207 в мтДНК человека и 13584—13601 в мтДНК мыши, имеющие высокую степень гомологии (15 совпадающих пар оснований из 18). Таким образом, были подобраны пары праймеров, дающие в результате ПЦР амплификаты различной длины: 249 пар оснований для мтДНК человека и 164 пары оснований для мтДНК мыши.

Обе пары праймеров были рассчитаны таким образом, что температура связывания (ренатурации) была одинаковой и составляла 51 °С. В предварительных экспериментах было показано, что при проведении 40 циклов ПЦР не происходит перекрестной реакции между мтДНК мыши и праймерами к мтДНК человека. Отсутствовало и взаимодействие между праймерами к мтДНК мыши и мтДНК человека.

Дополнительным контролем служило наличие в амплифицируемом участке мтДНК человека сайта для расщепления специфической эндонуклеазой AluI. Под действием AluI полученный в результате амплификации фрагмент мтДНК человека длиной 249 пар оснований расщепляется на два — 190 и 59 пар оснований. Подобный сайт отсутствует в амплифицируемом участке мтДНК мыши.

Статистический анализ. Во всех экспериментальных группах рассчитывали выборочную долю от общего числа особей или эмбрионов, входящих в данную экспериментальную группу. Под выборочной долей понимается доля особей или эмбрионов, имеющих интересующий нас признак (например, развившихся до определенной стадии или являющихся трансгенными). Для всех полученных долей рассчитывали ошибку выборочной доли. Для удобства обсуждения все доли выражали в %. Достоверность различия между различными выборочными долями рассчитывали с применением критерия ζ , который является аналогом критерия Стьюдента для биномиального распределения, и критерия χ^2 ; в необходимых случаях при попарном сравнении применяли поправку Йетса на непрерывность (Гланц, 1999).

Реактивы. DMEM и эмбриональная телячья сыворотка (Биолот, Россия); краситель MitoTracker Red (Molecular Probe, США); минеральное масло (Sigma, США).

Результаты и обсуждение

При исследовании *in vitro* ранних стадий дробления эмбрионов, полученных из зигот, которым микроинъецировали митохондрии человека, методом ПЦР в каждом из них было выявлено присутствие как мтДНК мыши, так и мтДНК человека. Это говорит о том, что нам удалось создать модель, удовлетворяющую требованию гетероплазмы. Однако чужеродная мтДНК была обнаружена не во всех blastомерах. Так, из 156 зародышей, проанализированных на стадии 2 blastомеров, только у 102 мтДНК человека была обнаружена в обоих blastомерах, а у 54 присутствовала только в 1 из 2 blastомеров. При этом мтДНК мыши присутствовала во всех проанализированных blastомерах (см. рисунок).

Тот факт, что на ранних стадиях дробления зиготы *in vitro* чужеродная мтДНК обнаруживается не во всех blastомерах, указывает на возникновение мозаичности по мтДНК уже на самых ранних стадиях эмбрионального развития, а с другой стороны — на возможно неслучайное распределение чужеродных митохондрий при дроблении зиготы. Привнесенное нами в зиготу количество митохондрий человека (порядка $5 \cdot 10^2$) достаточно велико в сравнении с числом blastомеров, на которые делится зародыш при первых дроблениях, поэтому при стохастическом распределении чужеродных митохондрий вероятность попадания их в оба blastомера чрезвычайно велика. Однако из 156 зародышей после первого дробления у 54 из них (т. е. у 34.6 ± 3.8 %) мтДНК человека присут-

вует только в одном из бластомеров. Это может быть вызвано несколькими возможными причинами.

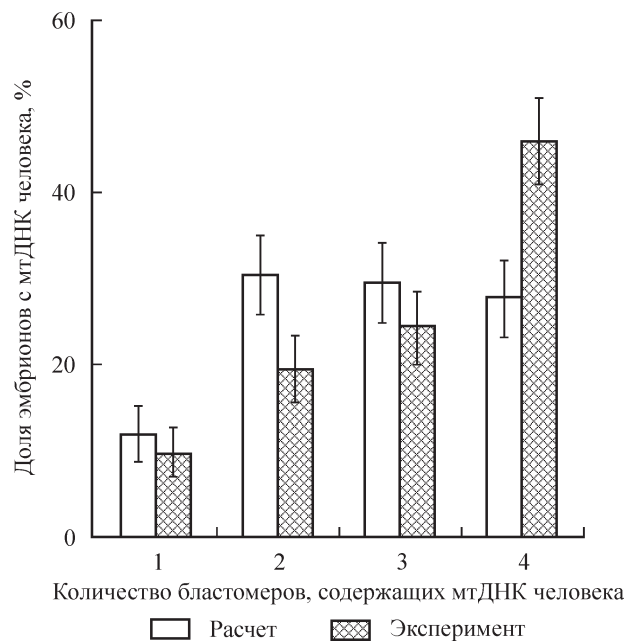
Первая — агрегация митохондрий в кластеры при делении зиготы. Этот механизм часто рассматривается как основной при сегрегации мтДНК в ряду поколений клеток. Вероятнее всего, сегрегация мтДНК в ряду делящихся бластомеров происходит по принципу «бутылочного горлышка» в процессе созревания ооцитов, когда значительная часть копий митохондриального генома не переходит из материнской клетки в дочернюю (Poulton, Marchington, 1996). При этом вводится понятие «единицы сегрегации», величина которой достоверно не установлена, т. е. по разным данным колеблется от 5—10 копий митохондриального генома до десятков молекул мтДНК, объединенных в кластеры, называемые нуклеоидами (Howell, 1999). Сегрегация по механизму «бутылочного горлышка» описана не только для ооцитов, но и в ряду клеточных поколений культуры фибробластов (Matthews et al., 1995).

Предположим, что механизм «бутылочного горлышка» является единственной причиной наблюдаемого распределения чужеродной мтДНК по бластомерам, и будем рассматривать вероятность попадания каждой единицы сегрегации в один из них как вероятность независимого события. Тогда при 2 единицах сегрегации вероятность того, что лишь 1 из 2 бластомеров получит мтДНК человека, составит 50 %, а для 3 единиц — 25 %. В наших опытах эта доля составила 34.6 ± 3.8 %, что позволяет предположить наличие 2—3 единиц сегрегации в привнесенном количестве митохондрий и соответственно значительное количество митохондрий (более 10^2), входящих в каждую такую единицу.

Помимо сказанного нельзя исключить, что независимо от агрегации митохондрий и(или) объединения копий митохондриального генома в нуклеоиды существует минимальная пороговая концентрация чужеродной мтДНК, необходимая для ее закрепления в дочерней клетке (Howell, 1999).

Второй причиной такой сегрегации митохондрий может быть тот факт, что промежуток времени между инъекцией митохондрий человека в зиготу мыши и первым дроблением зародыша оказывается недостаточным для «перемешивания» привнесенных митохондрий по всему объему клетки, по крайней мере для попадания достаточного количества митохондрий из перинуклеарного пространства мышинной зиготы, в которое производилась инъекция, в ту часть цитоплазмы, которая будет отделена при дроблении. При этом следует иметь в виду, что под «перемешиванием» мы подразумеваем не случайное (термодинамическое) перемещение частиц по клетке, а сложный комплекс процессов, включающий в себя связь митохондрий с цитоскелетом (Tourte et al., 1991; Penman, 1995; Hermann et al., 1997), тенденцию митохондрий, а возможно, и нуклеоидов к слианию (Nogawa et al., 1988; Smith, Alcivar, 1993; Howell, 1999), а также тенденцию соседних митохондрий к совместной сегрегации при делении клетки (Howell, 1996, 1999). Учитывать возможное влияние перемешивания мтДНК (привнесенной и хозяйской) не значит отрицать сам факт существования единиц сегрегации. В данном случае можно предполагать, что единиц сегрегации больше, чем 2—3, и соответственно меньшее число митохондрий входит в каждую из них.

Наконец, третьей причиной отсутствия чужеродной мтДНК в одном из бластомеров у части (34.6 ± 3.8 %) за-



Сравнение экспериментального распределения чужеродной мтДНК с расчетным в эмбрионах мыши на стадии 4 бластомеров.

родышей может быть процедура самой инъекции митохондрий. Нельзя исключить, что митохондрии человека остаются внутри вакуоли из плазматической мембраны, образовавшейся вследствие ее недостаточного прокола в момент инъекции. Такое допущение, хотя и кажется маловероятным, требует отдельного рассмотрения.

Для выбора одного из трех предложенных объяснений необходимо проанализировать распределение чужеродной мтДНК на следующей стадии дробления зародыша — стадии 4 бластомеров. Однако сначала рассмотрим возможные варианты, ожидаемые в случае справедливости каждого предположения о механизме распределения чужеродной мтДНК.

Если справедлива третья причина появления такой сегрегации и наблюдаемое отсутствие чужеродной мтДНК в 1 из 2 бластомеров у части (34.6 ± 3.8 %) зародышей объясняется тем, что инъецированные митохондрии человека остались внутри вакуолей, то такая же доля эмбрионов, содержащих мтДНК человека только в 1 бластомере, должна сохраниться и на стадии 4 бластомеров.

Для обнаружения возможных различий в распределении чужеродной мтДНК по 4 бластомерам в случае справедливости первой и второй причины нами была предложена следующая модель. Допустим, что для каждого из 2 бластомеров, несущих чужеродную мтДНК, вероятность передать ее обоим дочерним бластомерам составляет 65.4 %, а только 1 из 2 — 34.6 %, т. е. повторяется картина распределения при первом делении. В таком случае ожидаемое распределение чужеродной мтДНК на стадии 4 бластомеров будет следующим: только в 1 бластомере из 4 мтДНК человека должна быть обнаружена у 12.0 % зародышей, в 2 из 4 — у 30.5 % зародышей, в трех — у 29.6 % зародышей и во всех 4 — у 28.0 % зародышей. Следует отметить, что оценка такого распределения является наиболее «мягкой» оценкой для предположения, основывающегося на том, что единственной величиной, определяющей алгоритм распределения чужеродной мтДНК по дочерним клеткам при дроблении, является размер единицы сегрегации.

ции, и постулирующего соответственно наличие 2—3 единиц сегрегации в общем количестве митохондрий человека, привнесенных в зиготу мыши.

Основание для подобного утверждения содержится в полученном нами результате: по меньшей мере у $65.4 \pm 3.8\%$ зародышей изначально привнесенное количество мтДНК человека уже распределено между 2 бластомерами в ходе первого дробления. Кроме того, известно что репликации собственной мтДНК на стадии нескольких первых дроблений зародыша не происходит (Thundathil et al., 2005), и нельзя исключить, что и чужеродная мтДНК в этот период не реплицируется. Таким образом, в случае справедливости первого предположения можно ожидать совпадения экспериментально полученного распределения с модельным или некоторого отклонения в сторону большей доли зародышей с небольшим количеством бластомеров, несущих чужеродную мтДНК. Последнее отклонение возможно вследствие описанного выше «разведения» нескольких единиц сегрегации по 2 бластомерам в ходе первого дробления.

В случае справедливости второго предположения, напротив, следует рассчитывать на увеличение доли зародышей с большим количеством бластомеров, несущих чужеродную мтДНК. Такой эффект можно считать вероятным исходя, во-первых, из предположения о том, что промежутки времени между первым и вторым дроблениями зародыша оказываются достаточными для «перемешивания» единиц сегрегации, а во-вторых, из того, что больше чем 2—3 единицы сегрегации в привнесенном в зиготу количестве чужеродных митохондрий подразумевает большую, чем 65.4% , вероятность передачи чужеродной мтДНК обоим дочерним бластомерам при втором дроблении.

Из 102 эмбрионов, проанализированных на стадии 4 бластомеров, у 10 зародышей ($9.8 \pm 2.9\%$), мтДНК человека была обнаружена только в 1 бластомере, у 20 зародышей ($19.6 \pm 3.9\%$) — в 2 бластомерах из 4, у 25 зародышей ($24.5 \pm 4.3\%$) — в 3, у 47 зародышей ($46.1 \pm 4.9\%$) — во всех 4 бластомерах. Собственная мтДНК мыши, как и на предыдущей стадии, детектировалась во всех проанализированных бластомерах.

Поскольку ошибка доли зависит только от величины самой доли и от размера выборки, то для 102 эмбрионов ожидаемое модельное распределение приобретает следующий вид: только в 1 из 4 бластомеров мтДНК человека должна быть обнаружена у $12.0 \pm 3.2\%$ зародышей, в 2 из 4 — у $30.4 \pm 4.6\%$ зародышей, в 3 — у $29.6 \pm 4.5\%$ и во всех 4 — у $28.0 \pm 4.5\%$ зародышей.

Доля зародышей, у которых мтДНК человека была обнаружена только в 1 бластомере из 4, составляет $9.8 \pm 2.9\%$, что ниже доли, ожидаемой в случае справедливости третьего предположения ($34.6 \pm 3.8\%$), причем достоверность этого различия крайне велика ($\zeta = 5.17$, $p < 0.001$). Таким образом, третья гипотеза может быть отвергнута на очень высоком уровне значимости.

Для сравнения полученного экспериментального распределения чужеродной мтДНК на стадии 4 бластомеров с модельным мы использовали критерий χ^2 . Полученное значение критерия ($\chi^2 = 16.62$) говорит об очень высокой достоверности различия ($p < 0.001$) между экспериментальным и модельным распределениями. А большая доля именно зародышей, содержащих чужеродную мтДНК во всех 4 бластомерах (46.1 ± 4.9 против $28.0 \pm 4.5\%$ в модели $\zeta = 2.72$, $p < 0.01$), говорит в пользу справедливости второго предположения.

Кроме того, дополнительным косвенным подтверждением именно этого предположения являются результаты экспериментов, в которых на стадии 4 бластомеров анализировали трансмитохондриальные зародыши, полученные в результате инъекции митохондрий человека только в 1 из 2 бластомеров двухклеточного зародыша. В этом случае только 33 из 57 проанализированных эмбрионов (т. е. $57.9 \pm 6.5\%$) содержали чужеродную мтДНК в 2 бластомерах, а у 24 (т. е. у $42.1 \pm 6.5\%$) чужеродная мтДНК была обнаружена только в 1 бластомере, т. е. между инъекцией и последующим дроблением «перемешивания» не происходило.

Итак, можно сделать два важнейших вывода из проведенного исследования. Во-первых, согласно расчетам дочерние клетки при делении мышинного зародыша получают мтДНК в виде единиц сегрегации, число которых несомненно превышает 2—3, что согласуется с данными, полученными на других объектах (Ashley et al., 1989). Следует понимать, что это число было рассчитано применительно к привнесенному в зиготу мыши количеству митохондрий человека. Условия наших экспериментов не позволяют оценить общее число единиц сегрегации, т. е. таких, в которые попала только мтДНК мыши.

Во-вторых, можно утверждать, что процесс распределения мтДНК по всему объему цитоплазмы занимает значительное время, соразмерное с промежутком между дроблениями зародыша. Это справедливо по крайней мере для всех случаев, когда чужеродные митохондрии вводили в клетку извне (т. е. путем микроинъекции). Такое наблюдение согласуется с представлениями о механизмах перемещения митохондрий по цитоплазме, т. е. о необходимости участия в этом процессе цитоскелета (Tourte et al., 1991; Penman, 1995; Hermann et al., 1997) и специальных локомоторных белков — динаминов (Van der Blik, 1999; Hinshaw, 2000; Olichon et al., 2002).

Полученные сведения относятся к самым первым этапам работы сложного механизма наследования признаков, кодируемых мтДНК. Необходимо тщательное исследование особенностей распределения копий митохондриального генома на дальнейших стадиях дробления зародыша. Вполне вероятно, что использованный нами подход позволит получить более полное представление об этом механизме и об алгоритме распределения мтДНК, если таковой существует.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 06-04-49564 и 04-04-49157).

Список литературы

- Васильев В. Б. 2006. Генетические основы митохондриальных болезней. СПб.: Нестор-История. 146 с.
- Басс М. Г., Соколова В. А., Кустова М. Е., Кидготко О. В., Сорокин А. В., Васильев В. Б. 2005. Анализ эффективности получения трансмитохондриальных мышей путем микроинъекции митохондрий человека в зиготу мыши. Мед. акад. журн. 5 : 55—61.
- Гланц С. 1999. Медико-биологическая статистика. М.: Практика. 460 с.
- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Drouin J., Eperon I. C., Nierlich D. P., Roe B. A., Sanger F., Schreier P. H., Smith A. J., Staden R., Young I. G. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. Nature. 290 : 457—465.

- Ashley M. V., Laipis P. J., Hauswirth W. W. 1989. Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria. *Nucl. Acids Res.* 17 : 7325—7331.
- Bass M. G., Sokolova V. A., Kustova M. E., Grachyova E. V., Kidgotko O. V., Sorokin A. V., Vasilyev V. B. 2006. Analysis of efficiency of obtaining transmitochondrial mice by microinjections of human mitochondria into mouse zygote. *Biochim. biophys. acta.* 1757 : 679—685.
- Bibb M. J., van Etten R. A., Wright C. T., Walberg M. W., Clayton D. A. 1981. Sequence and gene organization of mouse mitochondrial DNA. *Cell.* 26 : 167—180.
- Hermann G. J., King E. J., Shaw J. M. 1997. The yeast gene, MDM20, is necessary for mitochondrial inheritance and organization of the actin cytoskeleton. *J. Cell Biol.* 137 : 141—153.
- Hinshaw J. E. 2000. Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Develop. Biol.* 16 : 483—519.
- Howell N. 1996. Mutational analysis of the human mitochondrial genome branches into the realm of bacterial genetics. *Amer. J. Hum. Genet.* 59 : 749—755.
- Howell N. 1999. Human mitochondrial diseases: answering questions and questioning answers. *Int. Rev. Cytol.* 186 : 49—116.
- Matthews P. M., Brown R. M., Morten K., Marchington D., Poulton J., Brown G. 1995. Intracellular heteroplasmy for disease-associated point mutations in mtDNA: implications for disease expression and evidence for mitotic segregation of heteroplasmic units of mtDNA. *Hum. Genet.* 96 : 261—268.
- Nagy A., Gertsenstein M., Vintersten K., Behringer R. 2003. Manipulating the mouse embryo. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 764 p.
- Nogawa T., Sung W. K., Jagiello G. M., Bowne W. 1988. A quantitative analysis of mitochondria during fetal mouse oogenesis. *J. Morphol.* 195 : 225—234.
- Olichon A., Emorine L. J., Descoins E., Pelloquin L., Bricheuse L., Gas N., Guillou E., Delettre C., Valette A., Hamel C. P., Duchemin B., Lenaers G., Belenguer P. 2002. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 523 : 171—176.
- Penman S. 1995. Rethinking cell structure. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 92 : 5251—5257.
- Poulton J., Marchington D. R. 1996. Prospects for DNA-based prenatal diagnosis of mitochondrial disorders. *Prenatal Diagnosis.* 16 : 1247—1256.
- Smith L. C., Alcivar A. A. 1993. Cytoplasmic inheritance and its effects on developments and performance. *J. Reprod. Fertil. (Suppl.)* 48 : 31—43.
- Sokolova V. A., Kustova M. E., Arbuzova N. I., Sorokin A. V., Moskaliyeva O. S., Bass M. G., Vasilyev V. B. 2004. Obtaining mice that carry human mitochondrial DNA transmitted to the progeny. *Mol. Reprod. Develop.* 68 : 299—307.
- Thundanthil J., Elison F., Smith L. 2005. Molecular control of mitochondrial function in preimplantation mouse embryos. *Mol. Reprod. Develop.* 71 : 405—413.
- Tourte M., Besse C., Mounolou J.-C., 1991. Cytochemical evidence of an organized microtubular cytoskeleton in *Xenopus laevis* oocytes: involvement in the segregation of mitochondrial populations. *Mol. Reprod. Develop.* 30 : 353—359.
- Van der Blik A. M. 1999. Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol.* 9 : 96—102.
- Vasilyev V. B., Sokolova V. A., Sorokin A. V., Bass M. G., Arbuzova N. I., Patkin E. L., Golubkov V. I., Dyban A. P., Gaitskhoki V. S. 1999. Persistence of human mitochondrial DNA throughout the development to the blastocyst of mouse zygotes microinjected with human mitochondria. *Zygote.* 7 : 279—283.

Поступила 21 IV 2008

DISTRIBUTION OF FOREIGN MITOCHONDRIAL DNA DURING THE FIRST SPLITTINGS OF THE TRANSMITOCHONDRIAL MOUSE EMBRYOS

M. E. Kustova, V. A. Sokolova, M. G. Bass, F. M. Zakharova, A. V. Sorokin, V. B. Vasilyev¹

Research Institute of Experimental Medicine RAMS, St. Petersburg;

¹ e-mail: vadim@mtdna.ru

Distribution of human mitochondrial DNA (mtDNA) among separate murine blastomeres was analyzed during the splitting of embryos in which the suspension of human mitochondria had been injected at the one- or two-cell stage. Human mtDNA was detected by PCR with species specific primers. The total amount of the two- and four-cell murine embryos analyzed in the study was 339. In all embryos examined the copies of human mitochondrial genome were revealed along with murine mtDNA, which indicated the phenomenon of an artificially modeled heteroplasmy. The foreign mtDNA was not ubiquitous among the blastomeres of transmitochondrial embryos. Mathematical analysis of the results showed that in the period between the injection of human mitochondria and the subsequent splitting no equal distribution of the human mtDNA occurred in the cytoplasm. These results also point at the presence of more than 2—3 segregation units of mtDNA in the entire pool of mitochondria (about $5 \cdot 10^2$) introduced into an embryo by microinjection.

Key words: mitochondria, mtDNA segregation, heteroplasmy, transgenic mice.