

## РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ЧУЖЕРОДНОЙ мтДНК, ПЕРЕДАВАЕМОЙ ПО ОТЦОВСКОЙ ЛИНИИ, В РАННИХ ЗАРОДЫШАХ МЫШЕЙ

© *M. E. Кустова<sup>1</sup>, O. B. Кидготко<sup>1</sup>, B. A. Соколова<sup>1</sup>,  
M. Г. Басс<sup>1</sup>, Ф. М. Захарова<sup>1, 2</sup>, В. Б. Васильев<sup>1, 2</sup>*

<sup>1</sup> Институт экспериментальной медицины СЗО РАМН, Санкт-Петербург,  
<sup>и 2</sup> Санкт-Петербургский государственный университет; электронный адрес: vadim@biokemis.ru

В работе исследовали передачу чужеродной мтДНК по отцовской линии от самцов поколения F0, а также распределение этой мтДНК у их потомков на ранних стадиях развития. Показано, что самцы мышей поколения F0, полученных в результате инъекции митохондрий человека в зиготу мыши, передают чужеродную мтДНК следующим поколениям. Вероятно, среди исследуемых самцов существуют индивидуальные особенности передачи чужеродной мтДНК потомству. Распределение по бластомерам зародышей чужеродной мтДНК, передаваемой по отцовской линии, отличается от распределения чужеродной мтДНК, наблюдаемого в случае материнского наследования.

**Ключевые слова:** трансмитохондриальные мыши, отцовское наследование мтДНК, раннее развитие.

**Принятые сокращения:** ТМ+ — трансмитохондриальные мыши.

Постулат о материнском наследовании митохондриальной ДНК (мтДНК) у млекопитающих основан на наблюдавшихся фактах передачи развивающемуся организму генома митохондрий яйцеклетки, тогда как мтДНК сперматозоида элиминировалась на ранних стадиях дробления зародыша (Cummins, 2000; Poulton, Marchington, 2002; Sato, Sato, 2013). В то же время точно известно, что у ряда млекопитающих, включая мышей, в момент оплодотворения отцовские митохондрии проникают в ооцит в составе сперматозоида и временно сосуществуют в зиготе с материнскими митохондриями (Luo et al., 2013). Однако впоследствии отцовские митохондрии и их ДНК элиминируются и, как правило, не передаются потомству (Luo et al., 2013). В литературе обсуждаются различные возможные механизмы, предотвращающие влияние отцовской мтДНК на развитие организма. Одним из них является простое разведение нескольких копий мтДНК сперматозоида среди 100 000 или более копий мтДНК ооцита, что делает влияние отцовской мтДНК крайне затруднительным (Cummins, 2000; Williams, 2002). У млекопитающих одним из вероятных процессов, вовлеченных в элиминацию отцовских митохондрий, считают опосредованную убиквитином деградацию отцовских митохондриальных структур протеасомами или лизосомами (Sato, Sato, 2013). Эксперименты на межвидовых гибридах мышей позволили предположить существование видоспецифичного механизма, действующего не на уровне мтДНК, а на уровне белков митохондрий и позволяющего различать собственные и чужеродные ядерно-кодируемые белки митохондрий в срединной части сперматозоида (Kaneda et al., 1995). Одной из возможных мишней такого ви-

доспецифического механизма является белок внутренней мембранный митохондрий прохихбитин. В убиквитинированной форме в зиготе он распознается механизмом протеолитической деградации, зависимым от убиквитина и протеасом, и деградация отцовских митохондрий начинается с воздействия протеолитическими ферментами (Thompson et al., 2003).

В недавних исследованиях показано, что у *Caenorhabditis elegans* отцовские митохондрии и их фрагменты после оплодотворения поглощаются аутофагосомами, которые сливаются с лизосомами, где происходит их деградация (Sato, Sato, 2011, 2012; Zhou et al., 2011). Считается, что механизм элиминации отцовских митохондрий эволюционно консервативен, поэтому было высказано предположение о том, что сходный процесс запускается также в ранних зародышах мышей (Al Rawi et al., 2011). Однако данная гипотеза опровергается работой группы исследователей, показавших, что у мышей аутофагия отцовских митохондрий в ранних зародышах не происходит (Luo et al., 2013). В своей работе авторы использовали две трансгенные линии мышей одного вида. У одной линии красным флуоресцентным белком были мечены аутофагосомы, а у другой — митохондрии. Оказалось, что митохондрии сперматозоидов не поглощались лизосомами после оплодотворения, а сохранялись при делении бластомеров до стадии морулы, но при этом неравномерно распределялись по бластомерам (до 4-клеточной стадии они находились только в одном бластомере). Было показано, что в наиболее подвижных сперматозоидах, достигающих яйцевода, элиминация мтДНК происходит еще до оплодотворения. Иногда часть сперматозоидов сохраняет

мтДНК, и если такой сперматозоид все-таки проникает в ооцит, то мтДНК не элиминируется и может быть обнаружена у новорожденных мышей (Luo et al., 2013).

В литературе накапливается все больше экспериментальных данных, свидетельствующих в пользу того, что механизмы элиминации отцовской мтДНК, проникшей в яйцеклетку из сперматозоида, действуют не столь жестко, как это до сих пор считалось. Отцовское наследование мтДНК экспериментально получено у млекопитающих — мышей (Gyllensten et al., 1991; Shitara et al., 1998, 2000), крупного рогатого скота (Steinborn et al., 1998), овец (Zhao et al., 2004) и низших приматов (John, Schatten, 2004). Описан случай обнаружения у пациента с мышечной патологией мутации мтДНК, которая была унаследована им от отца и выявлялась только в клетках мышечной ткани, в то время как в клетках крови присутствовала нормальная мтДНК, унаследованная от матери (Schwartz, Vissing, 2003).

В предыдущих работах нами было показано, что зигота мыши с введенными чужеродными митохондриями может служить моделью для изучения распределения чужеродной (мутантной) мтДНК по бластомерам ранних зародышей и органам взрослых особей (Sokolova et al., 2004; Bass et al., 2006, 2010).

Ранее нами были получены трансмитохондриальные мыши, которые наряду с мтДНК мыши несли мтДНК человека (Sokolova et al., 2004; Bass et al., 2006, 2010), которая передавалась потомству по материнской линии вплоть до четвертого поколения (Bass et al., 2010).

Используя одну из полученных линий трансмитохондриальных (TM+) мышей, мы показали передачу мтДНК человека по отцовской линии в нескольких поколениях животных (Kidgотко et al., 2013). Важно отметить, что все самцы этой линии являлись потомками одной трансмитохондриальной самки из поколения F2 (Kidgотко et al., 2013), что позволяет предположить действие «эффекта основателя», т. е. преимущественное попадание чужеродной мтДНК в определенные органы мышей-потомков (в данном случае в семенники самцов), заданное самкой-основательницей. Однако оставалось неясным, когда возникает «эффект основателя» и когда происходит асимметричное распределение отцовской мтДНК по бластомерам, что впоследствии приводит к ее неравномерному распределению по органам и тканям.

Для получения ответа на эти вопросы мы исследовали передачу чужеродной мтДНК по отцовской линии от самцов поколения F0, а также распределение этой мтДНК у их потомков поколений F1 и F2 на ранних стадиях развития (от зиготы до 8-клеточной стадии).

## Материал и методика

**Выделение митохондрий.** Выделение митохондрий человека из замороженной культуры клеток НерГ2 и анализ их функциональной активности проводили, как описано ранее (Sokolova et al., 2004).

**Получение трансмитохондриальных самцов мыши и определение у них носительства мтДНК человека.** В работе использовали мышей-гибридов F1 CBA × C57BL (Рапполово, Россия). Работу с зародышами мышей (получение зигот и культивирование зародышей *in vitro*) осуществляли по методу, описанному ранее (Vasilyev et al., 1999). Микроинъекции митохондрий человека и трансплантацию зигот псевдобеременным

самкам осуществляли согласно разработанному протоколу (Vasilyev et al., 1999; Sokolova et al., 2004). В полученном потомстве исследовали самцов на носительство мтДНК человека.

Для определения того, является ли самец трансмитохондриальным, самцов скрещивали с самками-гибридами F1 CBA × C57BL и полученные зиготы анализировали на присутствие мтДНК человека. Помимо этого, из матки мыши извлекали сперму, которую также анализировали на присутствие мтДНК человека. В случае обнаружения в зиготах или (и) в сперме мтДНК человека самцов рассматривали как трансмитохондриальных и снова скрещивали с самками-гибридами. Полученных зародышей культивировали до 8-клеточной стадии (3-й день после оплодотворения), после чего разделяли на бластомеры для анализа на присутствие в них мтДНК человека. Из-за асинхронного деления зародышей в культуре наряду с 8-клеточными зародышами присутствовали и эмбрионы с большим или меньшим числом бластомеров, которых также подвергали дальнейшему анализу на присутствие отцовской мтДНК.

ПЦР на ранних зародышах мыши проводили, как описано ранее (Sokolova et al., 2004), с некоторыми модификациями. Зиготу или отдельный бластомер помещали в пробирку для ПЦР объемом 500 мкл в 20 мкл однократного стандартного буфера для Таq-полимеразы (Медиген, Россия), содержащего 20 мкМ дитиотреитола, 1.7 мкМ додецилсульфата натрия и 0.05 мг/мл протеиназы K (Медиген, Россия), а также MgCl<sub>2</sub>, добавленный до необходимой концентрации (в данном случае до 1.5 мМ). Образцы инкубировали на водяной бане при 55 °C в течение 1 ч, а затем останавливали реакцию путем инкубации при 85 °C в течение 20 мин. Затем в реакционную смесь добавляли смесь дезоксинуклеотидтрифосфатов (Медиген, Россия), праймеры (Медиген, Россия), соответствующий объем однократного буфера для ПЦР и MgCl<sub>2</sub> до необходимой концентрации (в объеме 10 мкл) и проводили ПЦР, как описано ранее (Sokolova et al., 2004).

Видоспецифичные праймеры были сконструированы ранее (Vasilyev et al., 1999). Были выбраны сайт мтДНК человека 13959-13976 (Anderson et al., 1981) и сайт мтДНК мыши 13437-13455 (Bibb et al., 1981) как негомологичные последовательности, подходящие для дискриминантного анализа.

Соответствующие 5'-праймеры человека (А) и мыши (Б) представляли собой следующие последовательности:

A 5'-CCTTCTTACGAGCCAAAA-3',  
B 5'-ACTCTTCACACAAACATAA -3'.

Для конструирования 3'-праймеров были выбраны сайт мтДНК человека 14190-14207 и сайт мтДНК мыши 13584-13601. Эти две последовательности обладают высокой степенью гомологии (15 пар оснований из 18 совпадают). Соответствующие 3'-праймеры человека (А) и мыши (Б) представляли собой следующие последовательности:

A 5'-CTGGTTGACCATTGTTG-3',  
B 5'-CTGGGTGATCTTGTTG-3'.

**Выделение ДНК для контроля.** Ядерную (Bell et al., 1981) и митохондриальную (Tortoroni et al., 1992) ДНК человека выделяли из клеток НерГ2 и использовали в качестве контроля. Суммарную ДНК мыши для использо-

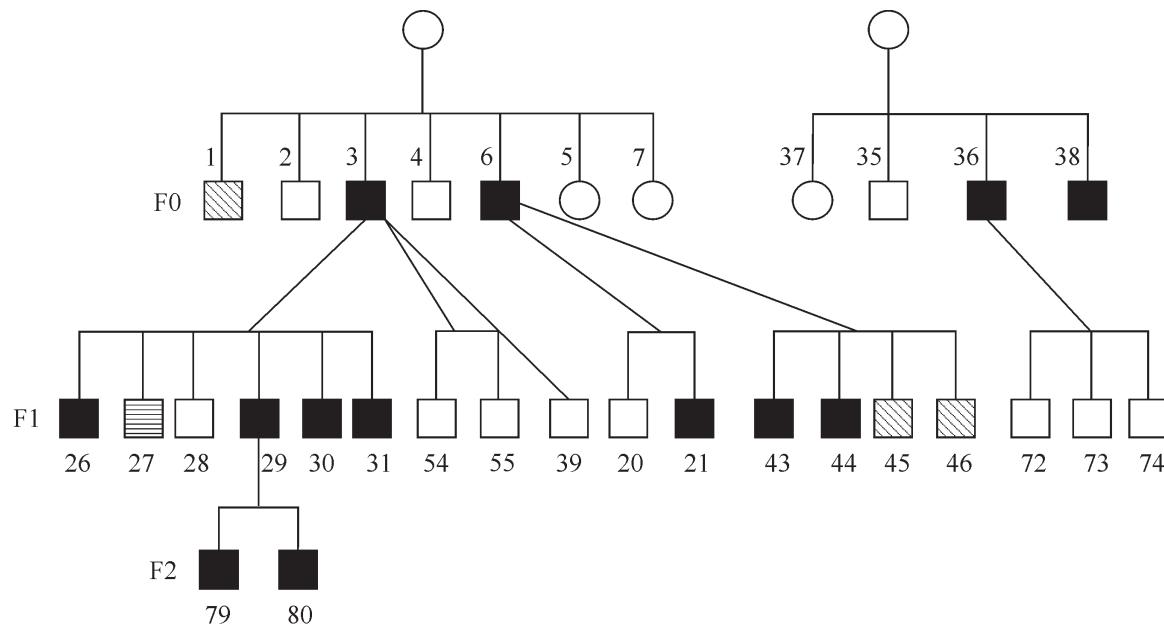


Рис. 1. Родословная мышей от скрещивания самцов, полученных из зигот, инъецированных mtДНК человека, с самками-гибридами F1 CBA × C57BL.

Белый квадрат — самец, белый кружок — самка, черный квадрат — самцы, в потомстве которых на одноклеточной стадии обнаружена mtДНК человека, квадрат с горизонтальной штриховкой — самцы, от которых пока не удалось получить одноклеточные зародыши, квадрат с косой штриховкой — умершие (необследованные) самцы.

зования в качестве контроля выделяли и очищали из печени животных (Sambrook et al., 1989).

Статистический анализ данных. Сравнение экспериментальных данных проводили с помощью критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса и с помощью точного двухстороннего критерия Фишера.

Использованные реактивы: Таq-полимераза, дитиотреитол, додецилсульфат натрия, протеиназа K,  $MgCl_2$ , дезоксинуклеотидтрифосфаты и праймеры (Медиген, Россия).

## Результаты и обсуждение

В результате трансплантации зигот, в которые были инъецированы митохондрии человека из клеток НерГ2 в яйцевод самок было получено потомство — 8 самцов и 3 самки. Всех этих самцов F0 скрещивали с самками-гибридами CBA × C57BL и получали от них потомство F1. Самцов из этого поколения скрещивали с такими же самками. В результате размножения потомков самцов F0 было получено два поколения трансмитохондриальных самцов (F1 и F2). Родословная мышей приведена на рис. 1.

Чужеродная mtДНК обнаруживалась как в одноклеточных, так и в многоклеточных зародышах, полученных от скрещивания самок с трансмитохондриальными самцами. Пример обнаружения mtДНК человека в одноклеточных зародышах (от самца F0 № 3) приведен на рис. 2. Как было показано ранее, в подобранных нами условиях ПЦР используемые праймеры позволяют определить от 5—6 копий mtДНК (Kidgotko et al., 2013), т. е. вероятность обнаружения mtДНК человека в одноклеточном зародыше достаточно высока.

Число одноклеточных зародышей с mtДНК человека, полученных от скрещивания самок с TM+-самцами поколения F0—F2, приведено в табл. 1.

Из 7 самцов F0 (самец F0 № 1 умер в раннем возрасте и не был проанализирован) mtДНК человека была обнаружена в одноклеточных зародышах от 4 самцов, т. е. половины из них, что согласуется с данными, полученными нами ранее (Kidgotko et al., 2013).

Обнаружение mtДНК человека в одноклеточных зародышах, полученных в результате скрещивания с предположительно TM+-самцами, означает, что в семенниках этих самцов обязательно должно присутствовать mtДНК человека. В полученной нами ранее линии трансмитохондриальных мышей с отцовским наследованием mtДНК человека (Kidgotko et al., 2013) семенники являлись одной из предпочтительных мишней при распределении чужеродной mtДНК по органам животного.

Были получены и проанализированы многоклеточные зародыши от четырех самцов F0 — № 3, 6, 38 и 38 и двух самцов F1 — № 29 (потомка самца F0 № 3) и № 44 (потомка самца F0 № 6). Результаты анализа многоклеточных зародышей представлены в табл. 2.

Из данных табл. 2 видно, что mtДНК обнаруживается не только на 8-клеточной, но и на более поздних стадиях развития, причем во многих случаях она была найдена в нескольких бластомерах. Статистический анализ частоты встречаемости mtДНК человека в многоклеточных зародышах (стадия 2—17 бластомеров), полученных при скрещивании TM+-самцов поколения F0 с самками-гибридами F1 CBA × C57BL, показал, что достаточно большое число зародышей содержало чужеродную mtДНК хотя бы в одном из бластомеров. Доля таких зародышей варьировала от  $46.2 \pm 13.8\%$  (6 трансгенных зародышей из 13) в потомстве самца F0 № 38 до  $73.3 \pm 5.7\%$  (44 трансгенных зародыша из 60) в потомстве самца F0 № 3.

При этом стоит отметить, что указанная выше доля трансгенных зародышей в потомстве самца F0 № 3 ( $73.3 \pm 5.7\%$ ) достоверно отличается от доли трансгенных зародышей в потомстве самца F0 № 36 ( $46.2 \pm 9.8\%$ ,

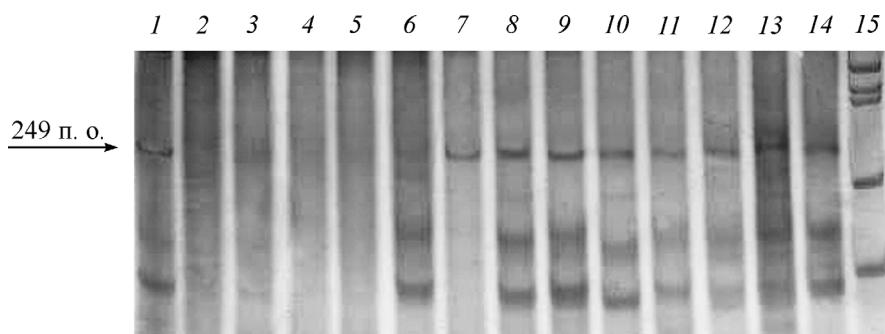


Рис. 2. Выявление участка последовательности mtДНК человека с помощью ПЦР с праймерами, специфичными для mtДНК человека, в одноклеточных зародышах и сперме от самца № 3 F0.

Дорожка 1 — положительный контроль (mtДНК человека, выделенная из клеток HepG2), дорожка 2 — отрицательный контроль (зародыш, полученный от гормонально стимулированной самки, оплодотворенной самцом дикого типа), дорожки 3—6 — одноклеточные зародыши, полученные от скрещивания самца № 3 с гормонально стимулированной самкой, дорожки 7—14 — образцы спермы самца № 3, дорожка 15 — маркер молекулярной массы. Продукт ПЦР, специфичный для mtДНК человека, указан стрелкой (249 п. о.).

или 12 трансгенных зародышей из 26). Сравнение экспериментальных данных при помощи критерия  $\chi^2$  с поправкой Йетса показывает достоверное различие ( $\chi^2 = 4.76$ ,  $P = 0.029$ ). Сходные результаты дают и применение точного двухстороннего критерия Фишера ( $P = 0.026$ ). Отсутствие достоверного отличия доли трансгенных зародышей в потомстве самца F0 № 3 ( $73.3 \pm 5.7\%$ ) от доли трансгенных зародышей в потомстве самца F0 № 3 ( $46.2 \pm 13.8\%$ ) и самца F0 № 6 ( $52.6 \pm 11.5\%$ , или 10 трансгенных зародышей из 19), скорее всего, объясня-

ется небольшим количеством проанализированных зародышей, полученных от двух последних самцов (значения критериев близки к пороговым).

Таким образом, можно предположить, что у самцов мышей имеются индивидуальные особенности передачи mtДНК потомству. Во всяком случае, это справедливо для наблюдавшейся в наших опытах передачи чужеродной mtДНК от самца F0 № 3 его потомству.

При анализе частоты встречаемости mtДНК человека в многоклеточных зародышах, полученных при скрещи-

Таблица 1

**Выявление mtДНК человека в одноклеточных зародышах от самок, оплодотворенных предположительно трансмитохондриальными самцами**

Поколение	Номер самца	Число одноклеточных зародышей	Из них несущие mtДНК человека	Присутствие mtДНК человека в сперме
F0	F0 № 2	19	0	Сперма не получена
	F0 № 3	6	2	+
	F0 № 4	19	0	—
	F0 № 6	16	0	+
	F0 № 35	30	0	—
	F0 № 36	38	15	+
F1 от самца № 3	F0 № 38	14	1	+
	F1 № 26	11	1	+
	F1 № 28	16	0	Сперма не получена
	F1 № 29	27	7	+
	F1 № 30	16	6	+
	F1 № 31	14	4	+
	F1 № 39	18	0	—
	F1 № 54	40	0	Сперма не получена
	F1 № 55	20	0	То же
	F2 № 79	21	1	» »
F2 от самца № 3 (потомки самца № 29)	F2 № 80	37 <sup>a</sup>	3	» »
	F1 № 20	24	0	» »
F1 от самца № 6	F1 № 21	13	1	+
	F2 № 44	8	2	Сперма не получена

Примечание. <sup>a</sup> Зародыши анализировали на 2-клеточной стадии.

Таблица 2

**Выявление mtДНК человека в бластомерах многоклеточных зародышей от самок, оплодотворенных предположительно трансмитохондриальными самцами**

Поколение и номер самца	Стадия развития зародыша	Количество зародышей	Количество зародышей, содержащих mtДНК человека TM+	Количество бластомеров TM+ в зародыше	
				количество бластомеров TM+	количество зародышей
F0 № 3	3-клеточная	4	2	1	2
		9	5	3	2
				2	2
	5-клеточная	3	0	0	0
		7	6	3	2
				2	4
	7-клеточная	7	4	7	1
				5	1
				3	2
	8-клеточная	23	20	8	3
				7	4
				6	4
				5	3
				4	3
				3	3
				2	1
				1	0
		3	3	6	3
		3	3	9	1
F1 № 29	10-клеточная			5	1
				4	1
		1	1	2	1
	Vсего	60	44		
	4-клеточная	2	1	1	1
F0 № 6	5-клеточная	1	0	0	0
	7-клеточная	2	0	0	0
	8-клеточная	5	1	4	1
	4-клеточная	1	1	1	1
F1 № 44	5-клеточная	2	1	2	1
	6-клеточная	1	1	4	1
	7-клеточная	2	2	4	1
				3	1
	8-клеточная	10	3	3	1
	12-клеточная			2	2
	14-клеточная	1	0	0	0
	16-клеточная	1	1	1	1
	8-клеточная	1	1	4	1
	9-клеточная	2	0	0	0
F0 № 36	10-клеточная	1	0	0	0
	13-клеточная	3	1	2	1
	15-клеточная	1	1	5	1
	2-клеточная	3	0	0	0
	4-клеточная	1	0	0	0
F0 № 36	5-клеточная	3	0	0	0
	6-клеточная	1	0	0	0

Таблица 2 (продолжение)

Поколение и номер самца	Стадия развития зародыша	Количество зародышей	Количество зародышей, содержащих mtДНК человека TM+	Количество бластомеров TM+ в зародыше	
				количество бластомеров TM+	количество зародышей
F0 № 38	7-клеточная 8-клеточная	3	0	0	0
		4	1	1	1
		13	10	6	1
				3	2
				2	1
	12-клеточная			1	6
		1	0	0	0
				1	1
	14-клеточная	1	1	3	1
				1	1
	8-клеточная	4	2	3	1
				1	1
	9-клеточная	1	0	0	0
	10-клеточная	4	2	2	1
				1	1
	13-клеточная	1	1	2	1
	15-клеточная	3	1	1	1

вании с самками трансмитохондриальных самцов поколения F1 (а именно самца F1 № 29, потомка самца F0 № 3, и самца F1 № 44, потомка самца F0 № 6), в обоих случаях доля трансгенных зародышей составила  $20.0 \pm 12.7\%$  (2 трансгенных зародыша из 10). Было показано, что доля трансгенных зародышей в потомстве самца F0 № 3 ( $73.3 \pm 5.7\%$ ) достоверно отличается от доли трансгенных зародышей в потомстве его сына, самца F1 № 29 ( $20.0 \pm 12.7\%$ ). Достоверность различия показывают на весьма высоком уровне значимости как критерий  $\chi^2$  с поправкой Йетса ( $\chi^2 = 8.58, P = 0.003$ ), так и точный двухсторонний критерий Фишера ( $P = 0.002$ ). Отсутствие достоверных различий между долей трансгенных зародышей в потомстве самца F0 № 6 ( $52.6 \pm 11.5\%$ ) и долей трансгенных зародышей в потомстве его сына, самца F1 № 44 ( $20.0 \pm 12.7\%$ ), также, скорее всего, объясняется небольшим количеством проанализированных зародышей (полученные значения критериев также близки к пороговым).

Наши результаты позволяют высказать предварительное предположение о снижении доли трансгенных зародышей во втором поколении, но это предположение требует проверки в дальнейших исследованиях.

Был проведен анализ распределения mtДНК человека по бластомерам на стадии 8-клеточного зародыша у 20 эмбрионов, полученных при скрещивании TM+-самца F0 № 3 с самками-гибридами F1 CBA × C57BL. Было обнаружено, что количество бластомеров, содержащих mtДНК человека, различалось у исследованных зародышей (табл. 2). В частности, были найдены 3 зародыша, содержащие чужеродную mtДНК во всех восьми бластомерах. Собственная mtДНК мыши обнаруживалась во всех проанализированных бластомерах. Такое распределение наследуемой mtДНК человека заметно отличается от распределения, наблюдавшегося нами ранее в бластомерах 8-клеточных зародышей, полученных из зигот после инъекции в них митохондрий человека (Sokolova et al., 2004; Bass et al., 2006, 2010). В той серии экспериментов нами было полу-

чено бимодальное распределение с двумя предпочтительными значениями: чаще всего mtДНК человека содержалась в одном либо в трех бластомерах из восьми. Картина распределения, полученная при отцовском наследовании в потомстве самца F0 № 3, выглядит иначе, хотя объем выборки не позволяет доказать достоверность различия распределений. Тем не менее очевидно, что обнаружение mtДНК человека в двух бластомерах 8-клеточного зародыша при отцовском наследовании являлось весьма редким событием, а зародышей с чужеродной mtДНК в одном бластомере не было вообще (табл. 2). С примерно равной частотой mtДНК человека выявлялась в 3—8 бластомерах 8-клеточных зародышей.

Таким образом, нами показано, что самцы мышей, полученных в результате инъекции митохондрий человека в зиготу мыши, передают полученную чужеродную mtДНК последующим поколениям, так же как и самцы, рожденные от трансмитохондриальной самки (Kidgотко et al., 2013). Сам факт присутствия отцовской mtДНК, по крайней мере в первом поколении мышей при межвидовом скрещивании (Gyllensten et al., 1991; Kaneda et al., 1995; Shitara et al., 1998), уже не вызывает сомнений. Однако относительно нахождения отцовской mtДНК в зародышах и взрослых особях при внутривидовом скрещивании мнения исследователей расходятся. Шитара и соавторы (Shitara et al., 1998) полагают, что обнаружение отцовской mtДНК у зародышей при внутривидовом скрещивании является артефактом. Работа Луо с соавторами (Luo et al., 2013) и наши собственные исследования (Kidgотко et al., 2013) показывают наличие отцовской mtДНК у некоторых ранних зародышей, у новорожденных и даже взрослых мышей. Более того, нами была обнаружена передача отцовской mtДНК потомкам на протяжении четырех поколений мышей (Kidgотко et al., 2013). Отсутствие элиминации отцовской mtДНК в наших экспериментах частично можно объяснить исходя из гипотезы японских исследователей (Shitara et al., 1998). Она сво-

дится к тому, что видоспецифические цитоплазматические факторы в зиготе, которые участвуют в элиминации отцовской mtДНК, при межвидовом скрещивании могут не узнавать чужеродную mtДНК, принесенную сперматозоидом, в результате чего она остается в зародыше.

Сам механизм и время элиминации отцовской mtДНК до сих пор остаются неясными. Высказывалось мнение о том, что это активный процесс, который происходит после оплодотворения, и в нем задействованы видоспецифические цитоплазматические факторы, способствующие удалению отцовской mtДНК из зародыша (Shitara et al., 1998). Согласно другой точке зрения, элиминация отцовской mtДНК является пассивным процессом и может включать в себя два механизма. Первый — элиминация mtДНК из сперматозоида до оплодотворения (Chan, Schon, 2012). Второй — неравномерное распределение отцовских митохондрий в ранних зародышах (Luo et al., 2013). В пользу первого механизма, по мнению авторов, свидетельствует тот факт, что большинство сперматозоидов, извлеченных из яйцевода мыши, не содержат mtДНК. Кроме этого, подвижные сперматозоиды, находящиеся в яйцеводе, имели всего лишь 1.29 копий mtДНК на сперматозоид, а менее подвижные 45.93. Вторая гипотеза о возможном механизме элиминации отцовской mtДНК основана на том, что митохондрии сперматозоида плотно упакованы (Sutovsky et al., 1997), и когда после оплодотворения в течение 1—4-клеточной стадии начинается их дезагрегация, митохондрии продолжают оставаться в одном и том же бластомере.

После 8-клеточной стадии митохондрии могут распределяться по нескольким бластомерам, потомкам того бластомера, где они находились изначально. Поскольку, по некоторым данным, судьба бластомеров, два из которых образуют оболочки зародыша, а из двух других образуется впоследствии взрослый организм, предопределется уже на 4-клеточной стадии (Tarkowski et al., 2001; Piotrowska-Nitsche et al., 2005), существует вероятность попадания отцовских митохондрий в бластомер, который будет участвовать в образовании зародышевых оболочек, а не организма.

В наших исследованиях при анализе спермы TM+-самцов из матки самок выявлялась mtДНК как человека, так и мыши. В трансмитохондриальных зародышах, достигших в развитии стадии трех и четырех клеток, mtДНК человека, наследуемая от отца, не была сосредоточена исключительно в одном бластомере, а обнаруживалась у части зародышей также в двух и трех бластомерах.

Наши данные показывают, что сперматозоиды TM+-самцов могут не только содержать mtДНК (по крайней мере гетерологичную mtДНК) в митохондриях, но и при оплодотворении эта mtДНК не подвергается элиминации, а передается потомству. Поэтому можно предположить, что в норме процесс элиминации отцовской mtДНК происходит не на уровне митохондрий, а на уровне mtДНК до момента оплодотворения.

Таким образом, согласно нашим данным, самцы мышей поколения F0, полученных в результате инъекции митохондрий человека в зиготу мыши, передают чужеродную mtДНК последующим поколениям. Вероятно, существуют индивидуальные особенности передачи чужеродной mtДНК потомству. Кроме того, распределение чужеродной mtДНК, передаваемой по отцовской линии, по бластомерам зародышей отличается от распределения чужеродной mtДНК, которая наблюдается в случае материнского наследования.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проекты 12-04-00831а, 14-04-01808а и 13-04-01789а).

### Список литературы

- Al Rawi S., Louvet-Vallee S., Djeddi A., Sachse M., Culetto E., Hajjar C., Boyd L., Legouis R., Galy V. 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*. 334 : 1144—1147.
- Anderson S., Bankier A. T., Barrell B. G., de Brujin 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.
- Bass M. G., Sokolova V. A., Kustova M. E., Grachyova E. V., Kidgotko O. V., Sorokin A. V., Vasilev V. B. 2006. Assaying the probabilities of obtaining maternally inherited heteroplasmy as the basis for modeling OXPHOS diseases in animals. *Biochim. biophys. acta*. 1757 : 679—685.
- Bass M. G., Sokolova V. A., Kustova M. E., Kidgotko O. V., Zakharov F. M., Vasilev V. B. 2010. Transmitochondrial mice in studying mtDNA distribution and transmission. In: *Horizons in DNA research*. 1 : 151—170.
- Bell G. I., Karam J. H., Rutter W. J. 1981. Polymorphic DNA region adjacent to the 5' end of the human insulin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 78 : 5759—5763.
- 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.
- Chan D. C., Schon E. A. 2012. Eliminating mitochondrial DNA from sperm. *Develop. Cell*. 22 : 469—470.
- Cummins J. M. 2000. Fertilization and elimination of the paternal mitochondrial genome. *Hum. Reprod.* 15 : 92—101.
- Gyllensten U., Wharton D., Josefsson A., Wilson A. C. 1991. Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*. 352 : 255—257.
- John J. C., Schatten G. 2004. Paternal mitochondrial DNA transmission during nonhuman primate nuclear transfer. *Genetics*. 167 : 897—905.
- Kaneda H., Hayashi J.-I., Takahama S., Taya C., Lindahl K. F., Yonekawa H. 1995. Elimination of paternal mitochondrial DNA in interspecific crosses during early mouse embryogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 92 : 4542—4546.
- Kidgotko O. V., Kustova M. Y., Sokolova V. A., Bass M. G., Vasilev V. B. 2013. Transmission of human mitochondrial DNA along the paternal lineage in transmitochondrial mice. *Mitochondrion*. 13 : 330—336.
- Luo S. M., Ge Z. J., Wang Z. W., Jiang Z. Z., Wang Z. B., Ouyang Y. C., Hou Y., Schatten H., Sun Q. Y. 2013. Unique insights into maternal mitochondrial inheritance in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 110 : 13 038—13 043.
- Piotrowska-Nitsche K., Perea-Gomez A., Haraguchi S., Zernicka-Goetz M. 2005. Four-cell stage mouse blastomeres have different developmental properties. *Development*. 132 : 479—490.
- Poulton J., Marchington D. R. 2002. Segregation of mitochondrial DNA (mtDNA) in human oocytes and in animal models of mtDNA disease: clinical implications. *Reproduction*. 123 : 751—755.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. New York: Cold Spring Harbor Lab. Press. 2 : 916—919.
- Sato M., Sato K. 2011. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science*. 334 : 1141—1144.
- Sato M., Sato K. 2012. Maternal inheritance of mitochondrial DNA: degradation of paternal mitochondria by allogeneic organelle autophagy, allophagy. *Autophagy*. 8 : 424—425.
- Sato M., Sato K. 2013. Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochim. biophys. acta*. 1833 : 1979—1984.

- Schwartz M., Vissing J. 2003. New patterns of inheritance in mitochondrial disease. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 310 : 247—251.
- Shitara H., Hayashi J.-I., Takahama S., Kaneda H., Yonekawa H. 1998. Maternal inheritance of mouse mtDNA in interspecific hybrids: segregation of the leaked paternal mtDNA followed by the prevention of subsequent paternal leakage. *Genetics*. 148 : 851—857.
- Shitara H., Kaneda H., Sato A., Inoye K., Ogura A., Yonekawa H., Hayashi J.-I. 2000. Selective and continuous elimination of mitochondria microinjected into mouse eggs from spermatids, but not from liver cells, occurs throughout embryogenesis. *Genetics*. 156 : 1277—1284.
- Sokolova V. A., Kustova M. E., Arbuzova N. I., Sorokin A. V., Moskaliova 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.
- Steinborn R., Zakhartchenko V., Jelyazkov J., Klein D., Wolf E., Muller M., Brem G. 1998. Composition of parental mitochondrial DNA in cloned bovine embryos. *FEBS Lett.* 426 : 352—356.
- Sutovsky P., Tengowski M. W., Navara C. S., Zoran S. S., Schatten G. 1997. Mitochondrial sheath movement and detachment in mammalian, but not nonmammalian, sperm induced by disulfide bond reduction. *Mol. Reprod. Develop.* 47 : 79—86.
- Tarkowski A. K., Ozdzenski W., Czolowska R. 2001. How many blastomeres of the 4-cell embryo contribute cells to the mouse body? *Int. J. Develop. Biol.* 45 : 811—816.
- Thompson W. E., Ramalho-Santos J., Sutovsky P. 2003. Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol. Reprod.* 69 : 254—260.
- Torroni A., Schurr T. G., Yang C. C., Szathmary E. J. E., Williams R. C., Schanfield M. S., Troup G. A. 1992. Native american mitochondrial DNA analysis indicates that the amerind of the native populations were founded by two independent migrations. *Genetics*. 130 : 153—162.
- 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.
- Williams S. R. 2002. Another surprise from the mitochondrial genome. *N. Engl. J. Med.* 347 : 609—611.
- Zhao X., Li N., Guo W., Hu X., Liu Z., Gong G., Wang A., Feng J., Wu C. 2004. Further evidence for paternal inheritance of mitochondrial DNA in the sheep (*Ovis aries*). *Heredity*. 93 : 399—403.
- Zhou Q., Li H., Xue D. 2011. Elimination of paternal mitochondria through the lysosomal degradation pathway in *C. elegans*. *Cell Res.* 12 : 1662—1669.

Поступила 4 VIII 2014

## DISTRIBUTION IN EARLY MOUSE EMBRYOS OF FOREIGN mtDNA TRANSMITTED ALONG THE PATERNAL LINEAGE

M. E. Kustova,<sup>1</sup> O. V. Kidgotko,<sup>1</sup> V. A. Sokolova,<sup>1</sup> M. G. Bass,<sup>1</sup> F. M. Zakharova,<sup>1, 2</sup> V. B. Vasilyev<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup> Institute for Experimental Medicine, St. Petersburg and <sup>2</sup> St. Petersburg State University; e-mail: vadim@biokemis.ru

Transmission of foreign mtDNA along the paternal lineage founded by male mice (F0), and distribution of that mtDNA in their progeny at early stages of prenatal development were studied. Transmitochondrial males of F0 obtained after injection of human mitochondria into mouse zygotes has been shown to transmit foreign mtDNA to subsequent generations. Individual peculiarities among the males studied, concerning transmission of foreign mtDNA to the progeny, are likely to exist. Besides, the distribution of human mtDNA among blastomeres of transmitochondrial embryos under study differed from that observed in previous investigation of its inheritance along the maternal lineage.

**Key words:** transmitochondrial mice, mtDNA paternal inheritance, neonatal development.