

人类线粒体 DNA 异质性研究进展 及其法医学应用

冉 鹏^{1,2}, 吴 谨¹, 张蓓蕾¹, 单华鑫³, 李英碧¹

(1. 四川大学华西基础医学与法医学院物证教研室, 成都 6100041;

2. 厦门市中心血站, 厦门 361004; 3. 宁波市公安局海曙分局刑侦大队技术中队, 宁波 315012)

摘要: 线粒体 DNA (mitochondrial DNA mtDNA) 的异质性自从被发现以来, 一直被遗传学、进化学、发育遗传学以及法医遗传学、分子生物学领域所重视。由于线粒体异质性的存在, 使得很多涉及疾病、进化、系统发育线粒体基因组与核基因组的相互作用关系、线粒体 DNA 复制机制以及法医学运用线粒体 DNA 进行实际案件评估的问题变得复杂化。此外线粒体 DNA 异质性的发生原因以及对线粒体异质性的检测方法标准化问题还没有一个统一的答案。针对线粒体 DNA 异质性带来的种种问题, 近年来国内外取得了不少研究进展。

关键词: 线粒体 DNA; 异质性; 复制

中图分类号: Q987 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3193 (2007) 04-0372-07

1 人类 mtDNA 的结构及其遗传特性

人类线粒体 DNA 几乎存在于各种组织、细胞中, 它是唯一分布于核外的人类遗传物质, 呈双链环状, 长度为 16569bp。1981 年 Anderson^[1] 完成了人类整个线粒体 DNA 16569bp 的测序工作, 并将线粒体 DNA 分成编码区和控制区, 其中编码区包括 37 个基因, 编码线粒体氧化磷酸化以及线粒体复制、转录所需要的各种成分; 控制区由 1 022bp (16024—16569bp 及 1—576bp) 组成, 包括一个复制起始点、两个转录起点及置换环 (displacement loop region D 环区), 其中 D 环区及复制起始点附近的 16024—16365, 73—340bp 以及 438—574bp 三个区域为多态高发区, 分别称为高变 1 区 (hypervariable region, HV₁), 高变 2 区 (hypervariable region, HV₂) 和高变 3 区 (hypervariable region, HV₃)。这三个区域的高度多态性使得个体间存在较高的差异性, 从而适合于法医学上作个人识别; 碱基序列的高突变率使得它能作为人类进化过程提供很好的参考资料。

线粒体 DNA 呈母系遗传^[2], 即在排除突变的前提下, 同一母系的个体线粒体 DNA 序列相同; 线粒体 DNA 呈单倍型遗传, 一般情况下不发生重组, 所以通过突变向多态性的稳定积累, 可以反应人类进化的历史。

mtDNA 广泛存在于各种细胞、组织 (包括某些角化的组织, 如指甲、毛发等) 中。线粒体

收稿日期: 2006-05-15; 定稿日期: 2007-05-25

基金项目: 四川省科技厅应用基础项目 (03JY029-089-2); 四川省科技厅科技攻关项目 (2006ZD9-007-4)。

作者简介: 冉鹏 (1979-), 男, 土家族, 重庆市人, 法医遗传学硕士。E-mail: ranpeng1979@163.com

DNA 比核 DNA 的片段短,拷贝数多,每个细胞中约含有 100—1 000 个线粒体,每个线粒体中又有 2—10 拷贝的 mtDNA^[3],因此对于法医学、考古学中的微量、陈旧、降解检材,特别是像毛发、骨骼、牙齿、指甲等的检验即使是缺乏核 DNA 的情况下仍然可以得到成功的检测。

2 mtDNA 异质性的基本概念

理论上,一个个体只带有一种类型的 mtDNA,体细胞中的所有 mtDNA 序列都是相同的;然而随着 DNA 测序技术的发展,对人类 mtDNA 进行测序分析发现在同一个体中会出现两种或两种以上类型的 mtDNA,即所谓的 mtDNA 异质性。这种异质性在人体的存在可以表现在三个不同的层面上^[4]:同一个体的不同组织存在不同类别的 mtDNA;同一组织的不同细胞中存在不同的 mtDNA;同一细胞不同线粒体内含有不同的 mtDNA。自发现线粒体 DNA 异质性以后^[1],研究者们主要针对线粒体编码区的异质性,认为编码区异质性核线粒体疾病的发生发展有重要的关系。研究者发现编码区的 mtDNA 异质性出现概率很低,只在相应的病人中出现,在正常个体很少出现;而后在控制区发现异质性的存在^[5-6],而且发生频率相对较高^[7]。根据异质性的表现形式,可以将其分为长度异质性(length heteroplasmy)和序列异质性(sequence heteroplasmy)两种类型。mtDNA 长度异质性表现为同一个体中出现了两种或者两种以上片段长度有差异的 mtDNA,多出现于线粒体高变区的多聚胞嘧啶^[8](C stretch)部位如 HV 16184—16193nt 和 HV 的 303—315nt,现在多认为是由于 16189nt 位点 T-C 的突变或者是 300nt 和 315nt C 碱基的插入而引起^[8]。序列异质性表现为同一个体中出现了两种或两种以上碱基序列不同的 mtDNA,这种碱基序列的不同可以出现在一个或者多个核苷酸位置,大多表现为一个碱基的不同,即点异质性(point heteroplasmy),同时出现两个或两个以上位置碱基序列不同的概率虽然小,但是仍然有报道^[9]。

线粒体异质性研究的是同一个体内出现的不同类型的 mtDNA 片段,这种异质性的出现可以为我们研究发育遗传学,进化学以及线粒体 DNA 复制、重组的发生提供很好的依据。它与遗传学上的多态性不同,但又有一定的联系。多态性是指在一个群体中,在某个基因座上出现了个体之间 DNA 序列差异,即等位基因的不同,而且这种等位基因能在群体中稳定遗传给子代,在遗传学上一般要求这种等位基因在群体中的分布频率达到 0.01 以上;而异质性研究的是一个个体内部不同组织、细胞以及不同线粒体之间的比较,其异质性 DNA 在各种组织、细胞或者线粒体中所占的比例是不恒定的。很多进化学研究者们发现两者在 D 环区都相对有较高的发生频率,推测线粒体异质性和群体多态性水平具有同步性。Stoneking^[10]通过对某一群体的子代线粒体 DNA 高变区新出现的生殖细胞突变位点、肿瘤组织中的体细胞突变位点以及出现的异质性位点和该群体中的多态性位点的比较研究验证这一观点,认为线粒体异质性热点和群体遗传学的高多态位点相吻合。

3 mtDNA 异质性形成的可能原因

mtDNA 异质性的发生机制至今还不是很清楚,Upholt 和 Dawid^[11](1977 年)观察到在 50 代卵母细胞分裂时,至少 20 代细胞的 mtDNA 从异质性向同质性转变;Hauswirth WW 和 Laipis PJ (1982)^[12]在研究牛线粒体 DNA 多态性时发现异质性线粒体 DNA 在卵母细胞和胚

胎早期发育阶段发生快速分离的现象,从而提出了线粒体 DNA 遗传的瓶颈理论^[12]。后来陆续由研究者对该理论进行更深入的验证^[13-14]。后来人们一般用这个理论来解释 mtDNA 异质性的形成原理。

瓶颈理论认为:一个卵母细胞内大约含有100 000个 mtDNA 分子,但只有一小部分(2~200个)可以传给子代,该部分 DNA 复制、扩增,构成子代的 mtDNA,这就是瓶颈效应^[15]。瓶颈的狭窄限制了下传的 mtDNA 的数量及种类。一般认为存在两个“瓶颈”对 mtDNA 遗传发生作用:早期的瓶颈效应发生在卵细胞形成期,由于成熟的卵细胞仅携带有卵母细胞随机的一小部分 mtDNA,一个具有 mtDNA 异质性的妇女,她所产生的不同的成熟卵细胞所包含的异质的 mtDNA 的数目、种类各不相同,这些通过“瓶颈”的 mtDNA 构成了下一代 mtDNA 的种群类型,表现为同一母系的后代之间、母亲和子代之间 mtDNA 出现差异;晚期瓶颈效应发生在卵裂期,携带有异质性的受精卵在卵裂时,mtDNA 发生随机分配,从而造成不同胚层细胞质中的 mtDNA 出现差异,从而表现为个体 mtDNA 的组织差异性。

瓶颈理论能够解释很多关于 mtDNA 异质性的问题,但 Marianne 等^[16]在一个患有线粒体疾病的病人骨骼肌中发现了来自父亲 mtDNA 的单倍型,与母亲的单倍型不同,而其血液 mtDNA 的单倍型与母亲单倍型相同;这种现象的出现很可能预示着父亲 mtDNA 在胚胎发育早期和桑椹胚前期,在细胞质中依然存在,从而构成了异质性。另外还发现了该患者在来自父亲 mtDNA 的遗传背景上发生了 2bp 缺失的突变,因此在患者骨骼肌中检测到了线粒体 DNA 的异质性。从这个例子中我们可以推测父亲 mtDNA 并不是在受精后就完全消失,而后才慢慢消失;异质性不仅只通过具有异质性的母亲 mtDNA 遗传到子代而形成,而且还可以通过个体体细胞的突变而产生新的 mtDNA 群,如果这种突变不产生疾病,而且通过选择在群体中获得了稳定遗传,就形成了 mtDNA 的多态。

4 mtDNA 异质性分布和遗传特点

不少学者为了证实 mtDNA 异质性形成的“瓶颈”理论假设,在同一个体的不同组织进行了异质性分布的检测。他们^[17-19]发现在毛发中 mtDNA 存在较高的异质性,不同毛发之间(长在同一小范围皮肤内的和不同部位皮肤上的)^[17]、同一毛发的不同节段都存在 mtDNA 异质性,而在血液和口腔脱落上皮细胞中检测到的 mtDNA 异质性水平就比较低。毛发发育过程中的瓶颈效应、毛发滤泡的克隆性、毛干细胞角化时对大量能量需求的特点^[20]和血液、口腔脱落上皮细胞多细胞起源的特点可能是出现这两类 mtDNA 异质性显著差异的原因^[21]。另外 Jazin 等^[22]在同一个体脑组织的不同部位发现了 mtDNA 的高度异质性,并且异质性呈现不同比例的变化。

mtDNA 呈母系遗传,子代 mtDNA 理论上应和其母亲具有相同的序列,但由于 mtDNA 异质性的存在,使得子代 mtDNA 和母亲 mtDNA 序列出现差异。虽然母亲 mtDNA 异质性会传给下一代,但是 Kazumasa Sekiguchi^[23]研究了三代母系亲属共 13 个个体 mtDNA 异质性的传递规律,发现虽然母亲 mtDNA 异质性可以传递给子代,但是子代个体之间以及代与代之间的异质性水平呈现很大差异,没有规律性。而且还发现在 mtDNA 异质性传到第三代时,线粒体异质性出现了同质性的转变。这与 Ashley 等以及牛 mtDNA 异质性在经过两代或三代的传递,就呈现同质性的转变是一致的。

5 mtDNA 异质性筛查和定量方法

(1) 变性高效液相色谱技术 (Denaturing High-performance Liquid Chromatography DHPLC): 在 DNA 部分变性的温度条件下, 存在序列差异的 PCR 产物会错配形成异源双链, 异源双链和同源双链的融解温度 (melting temperature, T_m) 的差异使色谱固定相保留它们的能力有所不同, 根据在分析柱上的保留时间可以分辨同源双链和异源双链, 从而敏感和准确地发现 DNA 变异型。Yvette P. Conley 等^[24] 运用该方法成功的对脑脊液中的线粒体 DNA 异质性进行检测并通过同源双链的峰高进行不同类型 mtDNA 的相对定量, 结果显示, 该方法灵敏度高, 可以检测 99.99:0.01 两者混合的样本, 而且该技术具有自动化、快速、检出率高、检出 DNA 片段大小范围广等优点, 可以作为目前 mtDNA 异质性筛查和定量的首选方法。

(2) 基于 VentR (*exo*⁻) DNA 聚合酶的 RFLP 分析^[25]: 利用 VentR (*exo*⁻) DNA 聚合酶高特异性, 避免非特异性产物的扩增。引物用荧光标记, 获得包括突变位置的特异 PCR 产物; 然后利用限制酶切, 将酶切产物在 ABI377 全自动测序仪上电泳, 用 GENESCAN 软件对不同产物的峰高进行初步定量, 根据一定的校正公式, 计算出突变型和野生型量的比值。该方法具有准确性高、自动化等优点, 可以作为临床检测异质性水平高低的首选方法。

(3) 单链构象多态性分析 (Single Strand Conformation Polymorphism SSCP): 在非变性条件下, 单链 DNA 可形成依赖于碱基组成特有的二级结构, DNA 链上单个碱基的改变可引起其二级结构的改变, 从而改变 DNA 链在非变性胶中的电泳迁移率。用 SSCP 检测线粒体 DNA 异质性, 首先要设计引物对某个区段进行扩增, 然后在一定条件下使得 PCR 产物变性, 在非变性的聚丙烯酰胺凝胶上电泳分型, 判断结果。该方法可检测出大约 80%—90% 的碱基改变, 能检测出高于 10% 含量的异质性 DNA^[26]。此方法简便, 成本低, 但是要求分型的 DNA 片段小于 250 个碱基才具有较高的检测灵敏度, 而且重复性欠佳。

(4) 变性梯度凝胶电泳 (Denaturing Gradient Gel Electrophoresis DDGE): 100—1 000bp 的双链 DNA (包括 2—5 个具有特定解链温度的碱基结构域) 在温度渐增或变性剂浓度渐增的凝胶体系中电泳, 当 DNA 分子从双螺旋型变成局部变性型时 (即结构域解链时) 电泳迁移率会下降。两条没有碱基错配的双链 (同源双链) 之间, 1bp 的碱基差异就可导致 T_m 值变化 1^o。而含错配碱基的异源双链将大大降低具有特定解链温度的结构域的稳定性, 导致同源双链和异源双链的 T_m 值相差可达 6^o。可将含有异质 mtDNA 和正常 mtDNA 的异源双链与仅含正常 DNA 的同源双链区分开。此方法灵敏度高, 但试验重复性相对较差, 可以作为异质性筛出的方法。

(5) 测序: 目前对 mtDNA 测序一般采用荧光标记的循环测序法, 其原理主要是 Sanger 双脱氧末端终止法、循环测序和荧光标记三种技术的结合。若在某个位置次峰峰高是主峰峰高的 40% 以上^[27], 且正、反向测序都出现同样结果时, 表明有一个碱基变异的异质性 mtDNA 的存在。测序虽然能够直接检测碱基组成, 但其灵敏度有限, 一般含量高于 30% 的异质 mtDNA 才能被检测出来^[28]。

其他还有序列特异性寡核苷酸探针 (SSO)、融解曲线分析、基质辅助激光解吸电离飞行时间质谱 (Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry, MALDI-TOF-MS), DNA 芯片 (DNA chip) 等技术, 都可以用于 mtDNA 异质性检测。

6 mtDNA 异质性对法医学的影响

mtDNA 异质性的存在,给法医学个人识别、亲子鉴定带来了不确定性,在实际案件中应进行相应的评价。国际法医遗传学会(International Society for Forensic Genetics, ISFG)规定,在遇到两个样本出现一个碱基不同,而且这个碱基位置被公认是异质性热点,则不能排除;当遇到两个碱基位置不同时,如果两个位置都是异质性热点,则不能排除,否则为不能判断。当出现三个位置的不同时,目前还没有群体数据显示同个体异质性同时在三个位置出现的情况,在排除污染、细胞核假基因扩增产物的情况下,并按照国际法医遗传学会 mtDNA 标准操作方法执行的,可以作出排除结论。因此,要对样本做出相应准确可靠的判断,首先要了解群体中异质性的分布情况,熟悉各种异质性出现的概率和相应位置。这就要求对群体进行异质性调查,建立相应的异质性数据库,从而为线粒体 DNA 在法医学上的应用提供有效保证。

在异质性对法医学个人识别带来不确定性的同时,它在某些时候可以带来认定或者排除的确定性。沙皇 Nicholas 遗骸的认定^[31]就是从沙皇兄弟的遗骸中也检测出有同样的异质性后才被确证,而此前从在世的沙皇母系后裔中并未检测到同样的 mtDNA HV 异质性。

对法医工作者来说,mtDNA 异质性的检出还应避免由于其他非正常因素如污染、PCR 扩增模板量过大、循环次数太多、细胞核假基因的扩增^[29]、读写错误等引起的假象。

7 mtDNA 异质性存在的问题和展望

(1) 检测 mtDNA 的异质性,在很多领域有重要的意义,目前尚未有标准化的方法来检测 mtDNA 异质性,需要开发一种标准化的检测方法作为金标准。

(2) mtDNA 异质性的发生机制目前还不清楚,造成异质性的分子机理和造成高变区多态性的分子机理有什么联系,尚需进一步研究。

(3) 异质性在人群中发生的概率有多大,以及它的变化形式、变化范围是什么?它的形成与什么因素有关?

(4) mtDNA 异质性的形成与突变有什么关系,它与父亲 mtDNA 遗传有没有关系, Kraysberg 等^[30]证实人类 mtDNA 存在来自异源 mtDNA(父亲和母亲)的重组子,这些是否与异质性有关?

参考文献:

- [1] Anderson S, Bankier AT, Barrel BC, *et al.* Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, 1981, 290: 457-465.
- [2] Giles RE, Blane H, Cann HM, *et al.* Maternal inheritance of human mitochondrial DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1980, 77: 6715-6719.
- [3] Donald R. Mitochondrial and disease[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1995, 638-644.
- [4] Linch CA, Whiting DA, Holland MM. Human hair histogenesis for the mitochondrial DNA forensic scientist [J]. *J Forensic Sci*, 2001, 46(4): 884.
- [5] Gill P, Ivanov PL, Klinton C, *et al.* Identification of the Romanov family by DNA analysis [J]. *Nature Genetics*, 1994, 6: 130-

135.

- [6] Comas D , Pabbo S , Bertranpetit J . Heteroplasmy in the control region of human mitochondrial DNA [J] . *Genome Res* , 1995 , 5 : 89-90 .
- [7] Howell N , Kubacka I , Mackey DA . How rapidly does the human mitochondrial genome evolve [J] . *Am J Hum Genet* , 1996 , 59 : 501-509 .
- [8] Michikawa Y , Mazzucchelli F , Bresolin N , *et al.* Age dependent large accumulation of point mutations in the human mtDNA control region for replication [J] . *Science* , 1999 , 286 : 174 .
- [9] Parsons TJ , Muniac DS , Sullivan K , *et al.* A high observed substitution rate in human mitochondrial DNA control region [J] . *Nat Genet* , 1997 , 15 : 363-368 .
- [10] Stoneking M . Hypervariable sites in the mtDNA control region are mutational hotspots [J] . *Am J Hum Genet* , 2000 , 57 : 1029-1032 .
- [11] Upholt WB , Dawid IB . Mapping of mitochondrial DNA of individual sheep and goats : rapid evolution in the D-loop region [J] . *Cell* , 1977 , 11 : 571-583 .
- [12] Hauswirth WW , Laipis PJ . Mitochondria DNA polymorphism in a metal lineage of Holsteincows [J] . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1982 , 79 : 4686-4690 .
- [13] Ashley MV , Laipis PJ , Hauswirth WW . Rapid segregation of heteroplasmic bovine mitochondria [J] . *Nucleic Acids Res* , 1989 , 17 : 7325-7331 .
- [14] Koehler CM , Lindberg CL , Brown DR , *et al.* Replacement of bovine mitochondria DNA by a sequence variant within one generation [J] . *Genetics* , 1991 , 129 : 247-255 .
- [15] Jenuth JP , Peterson AC , Shoubridge EA . Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice [J] . *Nature Genetics* , 1997 , 16 : 93-95 .
- [16] Schwarts M , Vissing J . Paternal inheritance of mitochondrial DNA [J] . *The New England Journal of Medicine* , 2002 , 347 : 576-580 .
- [17] Bendall KE , Macaulay VA , Sykes B . Variable levels of a heteroplasmic point mutation in individual hair roots [J] . *Am J Hum Genet* , 1997 , 61 : 1303-1308 .
- [18] Sullivan KM , Allistor Greiner R , Archanpong FIA , *et al.* A single difference in mtDNA control region sequence observed between hair shaft and reference samples from a single donor [A] . in : *Proceedings from the 17th International Symposium on Human Identification* [C] . Promega Corporation , Scottsdale , AZ , 1996 , 126-129 .
- [19] Calloway CD , Reynolds RL , Herrin CL , *et al.* The frequency of heteroplasmy in the HV region of mtDNA differs across tissue types and increases with age [J] . *Am J Hum Genet* , 2000 , 66 : 1384-1397 .
- [20] Tully G , Barritt SM , Bender K , *et al.* Results of a collaborative study of the EDNAP group regarding mitochondrial DNA heteroplasmy and segregation in hair shafts [J] . *Forensic Sci Int* , 2004 , 140 : 1-11 .
- [21] Alonso A , Salas A , Albarran C , *et al.* Results of the 1999—2000 collaborative exercise and proficiency testing program on mitochondrial DNA of the GEP-ISFG : an inter-laboratory study of the observed variability in the heteroplasmy level of hair from the same donor [J] . *Forensic Sci Int* , 2002 , 125 : 1-7 .
- [22] Jazin EE , Cavelier L , Eriksson Y , *et al.* Human brain contains high levels of heteroplasmy in the noncoding regions of mitochondrial DNA [J] . *Proc Natl Acad Sci USA* , 1996 , 93 (22) : 12382-12387 .
- [23] Sekiguchi K , Kasai K , Levin BC . Inter- and intrageneration transmission of a human mitochondrial DNA heteroplasmy among 13 maternally-related individuals and differences between and within tissues in two family [J] . *Mitochondrion* , 2003 , 2 : 401-414 .
- [24] Conley YP , Brockway H , Beatty M , *et al.* Qualitative and quantitative detection of mitochondrial heteroplasmy in cerebrospinal fluid using denaturing high performance liquid chromatography [J] . *Brain Research Protocols* , 2003 , 12 : 99-103 .
- [25] Jacobi FK , Meyer J , Pusch CM , *et al.* Quantitation of heteroplasmy in mitochondrial DNA mutations by primer extension using VentR (*exo*-) DNA polymerase and RFLP analysis [J] . *Mutation Research* , 2001 , 478 : 141-151 .
- [26] Nollau P , Wagener C . Methods for detection of point mutations : performance and quality assessment [J] . *Clinical chemistry* , 1997 , 43 : 1114-1128 .
- [27] Huhne J , Preiffer H , Brinkmann B . Heteroplasmic substitutions in the mitochondrial DNA control region in mother and child

samples[J]. *Int J Legal Med*,1999 ,112(1) : 27-30.

- [28] 蒋琼橙,伍新尧. 人类线粒体 DNA 异质性及其与法医学的关系. *中国法医学杂志*,2001 ,17(1) :54-56.
- [29] Parfait B, Rustin P, Munnich A, *et al*. Coamplification of Nuclear Pseudogenes and assessment of heteroplasmy of mitochondrial DNA mutations [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,1998 , 247 :57-59.
- [30] Kraysberg Y,Schwartz M,Timothy A , *et al*. Recombination of Human Mitochondrial DNA[J]. *Science* ,2004 ,304 :981.

Proceedings of Human Mitochondrial DNA Heteroplasmy and its Applications to Forensic Medicine

RAN Peng^{1,2} , WU Jin¹ , ZHANG Bei-lei¹ , SHAN Hua-xin³ , LI Ying-bi¹

(1. *West China School of Preclinical and Forensic Medicine , Sichuan University , Chengdu 610041 ;*
2. *Xiamen Blood Center ,Xiamen 361003 ;* 3. *Haishu Public Security Bureau , Ningbo 315012*)

Abstract : The phenomenon of mitochondrial DNA (mtDNA) heteroplasmy has been greatly regarded in a variety of research fields including genetics , evolution , developmental genetics , forensic genetics and molecular biology. Because of the presence of mtDNA heteroplasmy and therefore a need to examine both the mitochondrial genome and the nuclear genome , studies of disease , evolution and phylogenesis are complicated. In addition , the mechanism of mtDNA replication and the application of mtDNA analysis to forensic practice are also significant developments in this type of research. Although there is no agreement about the mechanism for mtDNA heteroplasmy formation or for the standard method of how to determine mtDNA heteroplasmy , much progress has been made and this paper provides a current view on this research topic.

Key words : Mitochondrial DNA ; Heteroplasmy ; Replication