

文章编号: 1004-0374(2012)02-0185-06

线粒体相关的疾病治疗及干预策略

郑斌娇¹, 梁敏¹, 薛凌¹, 郑静¹, 张婷¹, 龚莎莎¹, 方芳¹, 吕建新¹, 管敏鑫^{1,2*}

(1 温州医学院, Attardi线粒体生物医学研究院和浙江省医学遗传学重点实验室, 温州 325035; 2 浙江大学生命科学院, 杭州 310058)

摘要: 线粒体疾病是一种累及不同的组织和器官的复杂异质性疾病, 由核基因或线粒体基因的遗传缺陷导致, 同时也受环境因素的影响。近十年来, 有关线粒体疾病的诊断及发生机制的研究进展迅速, 而疾病的治疗方法却研究较少。着重介绍线粒体疾病的相关治疗方法和干预策略。

关键词: 线粒体疾病; 基因治疗; 氧化磷酸化缺陷; 异质性

中图分类号: R589; R363 **文献标志码:** A

Therapeutic and tampering approaches for mitochondrial associated diseases

ZHENG Bin-Jiao¹, LIANG Min¹, XUE Ling¹, ZHENG Jing¹, ZHANG Ting¹,
GONG Sha-Sha¹, FANG Fang¹, LÜ Jian-Xin¹, GUAN Min-Xin^{1,2*}

(1 Attardi Institute of Mitochondrial Biomedicine and Zhejiang Provincial Key Laboratory of Medical Genetics, Wenzhou Medical College, Wenzhou 325035, China; 2 College of Life Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: As heterogeneous disorders, mitochondrial diseases can affect various tissues and organs. They can be caused by genetic defects (nuclear and mitochondrial DNA) or environmental factors. Last decades, substantial progress has been made among the diagnosis and pathogenesis of mitochondrial diseases. However, there have been not many reports about development of therapies approaches for these disorders. In this review article, we will discuss emerging therapeutic and intervention strategies of mitochondrial diseases.

Key words: mitochondrial diseases; gene therapy; oxidative phosphorylation defects; heteroplasmy

线粒体疾病是指线粒体基因组 (mitochondrial DNA, mtDNA) 和 (或) 核基因组 (nuclear DNA, nDNA) 突变导致氧化磷酸化 (oxidative phosphorylation system, OXPHOS) 功能缺陷而引起的疾病。mtDNA 突变通常是异质性的, 即野生型和突变型 mtDNA 分子共存, 当突变型 mtDNA 的数量超过一定的阈值 (阈值效应) 时个体表现为线粒体疾病。近年来, 几种能够校正线粒体原始缺陷的治疗策略得到了长足的发展, 且已在不同的细胞和动物模型中开展试验。本综述将对这些治疗和干预策略进行深入探讨。

1 改变突变异质性程度

异质性 mtDNA 突变致病的阈值水平相对较高, 大多在 80%~90%, 所以只要降低受累组织的突

变负荷就可以达到治疗效果, 即通过将突变型 mtDNA 转变成野生型 mtDNA。这样不仅使突变的 mtDNA 比率选择性地下降, 而且野生型 mtDNA 的比率也可以升高。

1.1 线粒体靶向限制性内切酶改变突变异质性

限制性内切酶 (restriction enzyme, RE) 能在特

收稿日期: 2011-07-19; 修回日期: 2011-10-13

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (“973”项目)(2004CCA02200); 浙江省医药卫生科学研究基金项目(2006A100); 浙江省“钱江人才计划”择优资助项目(2006R10021); 浙江省重大科技专项社会发展项目(2007C13021); 浙江省研究生创新科研项目(YK2010084)

*通信作者: E-mail: gminxin88@gmail.com

异性限制位点选择性地剪切 DNA 双链。某些 mtDNA 突变会产生一个新的限制性酶切位点，线粒体靶向 RE 可以识别这个位点，并对突变的 mtDNA 进行降解，使得剩余的野生型 mtDNA 比率相对升高，从而降低细胞中突变 mtDNA 的比例，造成异质程度改变^[1]。线粒体靶向 RE 最初用于异源线粒体的杂合细胞。因大鼠 mtDNA 缺乏 *PstI* 位点^[2]，线粒体 *PstI* RE(mito-*PstI*) 的表达能够改变同时含有小鼠和大鼠融合细胞的 mtDNA 异质性。含两种鼠类 mtDNA 单体型 (BALB 和 NZB) 的无症状小鼠模型^[5] 的体外和体内试验表明，用重组病毒载体定位于线粒体的 REs 表达可以有效地改变 mtDNA 异质性。这两种 mtDNA 单体型能够通过 RE *ApaLI* 区分，它能识别 BALB mtDNA 的一个位点，而不能识别 NZB mtDNA 中的位点。正因为只有 BALB mtDNA 突变体含有 *ApaLI* 特异性酶切位点^[3]，异质小鼠局部注射编码线粒体靶向 *ApaLI* RE(mito-*ApaLI*) 的重组腺病毒后，肌肉和脑部显示快速、定向且彻底的 mtDNA 异质性改变。mtDNA 异质性改变的程度和效率依赖于未被剪切的 mtDNA 数量。因为 *ApaLI* 只剪切 BALB mtDNA，余下的 NZB mtDNA 继续复制以维持正常 mtDNA 拷贝数，因此没有观察到明显的 mtDNA 耗损^[4]。线粒体靶向 REs 可以作为异质性改变的策略，但是主要的局限是合适的限制性位点的临床相关突变极少。

1.2 线粒体靶向锌指核酸酶改变突变异质性

锌指核酸酶 (zinc-finger nucleases, ZFNs) 是一类重组的内切核酸酶，作为一个高效的核基因修饰工具^[5]，ZFNs 能通过断裂双链诱导同源重组^[6] 或非同源末端连接^[7] 来实现基因修饰。

ZFNs 由 3~9 个串联的锌指 DNA 结合结构域和非特异性 *FokI* 内切酶结构域组成。锌指对 DNA 的剪切需要通过 *FokI* 的二聚化作用决定 ZFNs 不同的结构形式。最常用的功能形式是异二聚体^[8]。Minczuk 等^[9] 最先发现 ZFNs 可作用于线粒体，并成功将单体锌指甲基化酶定位到线粒体，证明 mtDNA 特异性甲基化作用位点。随后，又将单体 ZFN 导入到携带 85% T8993G 突变负荷的突变体中^[10]。ZFNs 在含有 T8993G 突变的线粒体中短暂表达，导致野生型 mtDNA 比率稳定上升，48 h 后只出现轻微的 mtDNA 拷贝数减少。相反，针对 D-loop 野生型序列，ZFNs 的表达并没有改变 T8993G 的突变负荷，2 d 后却出现严重的 mtDNA 拷贝数降低。这表明，T8993G 水平的下降是由于突变特异

性的 ZFNs 具有类似线粒体靶向 RE 的清除作用。

1.3 野生型 mtDNA 的富集改变突变异质性

特异性抑制突变 mtDNA 的量并富集野生型 mtDNA 有两种方法：生酮饮食和卫星细胞的激活。生酮饮食是指将携带大片段 mtDNA 缺失的细胞系置于酮体下，使得野生型 mtDNA 比率升高^[11]。生酮饮食已用于治疗由线粒体缺陷引起的癫痫^[12]，还可以用于治疗因 mtDNA 缺失的积累导致线粒体解旋酶缺陷的小鼠，改变其 OXPHOS 水平，改善与线粒体解旋酶功能相关的线粒体肌病的表型。然而，生酮饮食并不影响线粒体数量和质量^[13]。卫星细胞是骨骼肌未分化的肌源性细胞^[14]。它们可以被机械性或化学性外伤诱导激活，可以取代或修复受损的肌肉纤维^[15]。在线粒体疾病的背景下，卫星细胞的突变负荷比成熟的肌肉纤维低^[16]。激活后由于低突变负荷改变了异质性，加入肌肉组织的成熟卫星细胞更偏向野生型基因组。

2 野生型 mtDNA 替代突变型 mtDNA

不均等细胞分裂导致卵细胞具有不同的突变负荷，这一比率的差异理论上可以导致下一代不同程度的线粒体功能障碍。mtDNA 突变通过母系成员传递，不管这些母系成员是否表现线粒体疾病症状，只要携带了 mtDNA 突变就会遗传给下一代。因此，用野生型 mtDNA 替代突变型 mtDNA 是防止由 mtDNA 突变引起的母系遗传线粒体疾病最好的治疗方法。进行这种替换有两个方案：原核转移和胞质转移。

2.1 原核转移

原核转移是指将携带 mtDNA 突变的受精卵体外除去胞质 (含大多数的线粒体)，然后将细胞核转移到一个含有野生型 mtDNA 的无核卵细胞，并将其植入母体子宫^[17-18]。最近这项技术在猴子中试验成功：一个 nDNA 供体和另一个 mtDNA 供体的胚胎卵细胞发育成了一只健康的猴子^[19-20]。这项技术有望用于预防与线粒体基因突变相关的母系遗传疾病，但从伦理上讲是有争议的。

2.2 胞质转移

胞质转移是指将胞质中正常的线粒体转移到卵母细胞中，这样可以使缺陷的 mtDNA 比例降低。胞质转移曾用于提高辅助生殖的成功率，如今这项技术也用于线粒体疾病患者的治疗。但是通过这种技术出生的一些婴儿，他们的 mtDNA 来自母体卵细胞，仍然有低水平的异质性^[17-18]。小鼠模型实验提示，能够用这种技术转移的 mtDNA 数量少于总

mtDNA 的 1/3, 这也解释了为什么在子代观察到的治疗效果并不明显^[21]。所以这种技术可能对 mtDNA 突变患者的治疗价值不高。

3 替换缺陷的线粒体基因和蛋白质

3.1 线粒体tRNA导入

绝大多数 mtDNA 突变发生在线粒体 tRNA 上。虽然 tRNA 导入到线粒体在酵母中已经实现, 但对哺乳动物仍是一个挑战^[22]。酵母 tRNA^{Lys} 能被成功导入到携带肌阵挛性癫痫伴碎红纤维病 (myoclonic epilepsy with ragged red fibers, MERRF) 突变患者细胞中, 导入的酵母 tRNA^{Lys} 可以部分恢复线粒体翻译和 OXPHOS 功能^[23]。但是这一方法的缺陷在于效率低, 不稳定且转染载体有毒性。另一个方法是用利什曼原虫 RNA 导入复合体 (RNA import complex, RIC)。这种复合体能够进入人类细胞, 成功诱导 tRNA^{Lys} 导入并恢复 MERRF 细胞的线粒体翻译和 OXPHOS 活性。其他的胞质 tRNA 也可以通过这种方法导入到线粒体, 用于相应 RNA 突变的修复^[24]。利什曼原虫 RIC 还能把反义 RNA 导入线粒体基质, 从而减少蛋白质合成和降解靶 RNA^[25]。

3.2 提高线粒体tRNA的稳定性

tRNA 突变降低氨酰化 tRNA 水平, 导致线粒体翻译和呼吸链缺陷^[26-29]。tRNA 合成酶的过表达可缓解携带 tRNA 突变的细胞株呼吸链缺陷。虽然 tRNA 合成酶过表达的细胞增加了 tRNA^{Leu(UUR)} 的稳定性, 但蛋白合成率却与亲本突变细胞基本一致^[30-31]。

3.3 蛋白质转导/蛋白质转染

由于 mtDNA 编码的线粒体蛋白是疏水性的, 这给外源蛋白的导入带来一定的难度, 蛋白质转导则是一种忽略蛋白质自身特性的新型导入方法, 具有细胞渗透性质的蛋白质转导结构域的发现为克服上述问题提供了可能性^[32]。最常用的蛋白质转导结构域是 TAT, 它是 HIV 上较大的短阳性肽, 能够穿过细胞膜^[33-34]。TAT 融合蛋白耦合细胞核定位信号 (nuclear localization signal, NLS) 或线粒体靶向序列 (mitochondrial targeting sequence, MTS) 能够转导进入细胞并定位保留在亚细胞相应区域^[35]。线粒体成功靶向导入的报道见于 TAT 介导的硫辛酰胺脱氢酶 (lipoamide dehydrogenase, LAD), 利用固有的 MTS 恢复了 LAD 缺陷患者细胞内线粒体丙酮酸脱氢酶复合体的活性^[36]。蛋白质转导的优势在于跨膜转运不依赖 TIM 和 TOM 复合体^[37], 而劣势在于这是一种短暂的修复作用。

近几年, James 团队利用蛋白质转导原理改进了线粒体蛋白质转导的方法, 称为蛋白质转染。他们利用融合蛋白转导结构域和线粒体定位信号构建成一个线粒体转导结构域 (mitochondrial transduction domain, MTD)。融合的 MTD 不会干扰线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 结合 DNA 的能力。最后 MTD-TFAM 可以跨膜转运并定位于线粒体^[38]。

3.4 线粒体基因的异位表达

mtDNA 基因的核表达就是一种异位表达。异位表达的实现需要线粒体密码子变成通用的遗传密码。此外, 剪切后的线粒体靶向序列需加到前体蛋白上。异位表达首先在酵母中研究成功, 第一个异位表达基因是 *ATP8*, 它融合线粒体靶向序列后转入细胞核并在核中表达。新合成蛋白表达成功后, 导入并组装进复合体 V, 恢复了酵母 *ATP8* 基因敲除的细胞功能^[39]。

4 清除毒性中间体

OXPHOS 缺陷造成的电子流阻滞能引起醌类和 NADH/NAD 的过量削减, 从而导致 OXPHOS 代谢通路各阶段中间产物的积累。其中一些中间产物是有毒性的, 是产生线粒体疾病症状的主要原因之一。因此, 清除这些毒性中间体是防止疾病发生的关键, 是针对 OXPHOS 缺陷理想的治疗和干预策略。

4.1 乳酸缓冲

乳酸中毒是典型的线粒体疾病症状。因为 OXPHOS 的阻滞, 丙酮酸盐被进一步代谢形成乳酸, 并在血液中堆积导致酸中毒。降低血清中的乳酸有几种方法, 如用重碳酸盐缓冲液或用二氯乙酸对患者进行治疗^[40], 但二氯乙酸的治疗会导致严重的神经毒性。

4.2 清除核苷

线粒体神经胃肠型脑肌病 (mitochondrial gastrointestinal encephalopathy, MNGIE) 属多系统疾病, 患者常表现为严重的胃肠道功能障碍伴外周神经变性及脑白质异常等, 主要由胸腺磷酸化酶 (thymidine phosphorylase, TP) 缺陷导致^[41]。TP 活力降低可引起血液中脱氧胸苷和脱氧尿苷水平上升^[42]。目前, 清除血液中的核苷有三个方法: 血液透析^[43]、异源干细胞移植和血小板灌注^[41-42]。

4.3 抗氧化剂的使用

OXPHOS 缺陷可能导致活性氧产量增加, 并

损伤蛋白、脂质和 mtDNA^[44-45]。氧化应激被证实不仅在线粒体疾病中出现,还出现在许多神经退行性疾病,如 Friedreich 共济失调、亨廷顿病、肌萎缩侧索硬化症和帕金森病等^[46-47]。为了清除 ROS,线粒体疾病的治疗引入了抗氧化剂^[48]。醌类就是近几年一类迅猛发展且作用突出的抗氧化剂,如 CoQ10(辅酶 Q10)、艾地苯醌、MitoQ 等。醌类在呼吸链中具有双重作用。它是复合体 I / II 和复合体 III 的电子传递载体;同时,也是强有力的 ROS 清除剂。作为电子载体,醌能够完全恢复醌缺陷造成的电子传递障碍。作为 ROS 清除剂,醌适用于于大多数的线粒体疾病。给不同的线粒体疾病患者补充 CoQ10 可以增加 ATP 合成^[49]。但 CoQ10 是亲脂性的,所以进入细胞和线粒体就很困难^[49]。艾地苯醌是 CoQ10 的一种人工合成形式,可以有效地通过血脑屏障,且生物利用率较高^[50-51]。MitoQ 是醌类的新成员,定位于线粒体,它通过结合亲脂阳离子如三苯基磷 (triphenylphosphonium, TPP)^[52], 特异性定位于线粒体。由于线粒体的高膜电位,亲脂阳离子不需特殊的机制就可以跨过磷脂分子层,并在线粒体内聚集^[53]。其中部分醌保护氧化应激,同时另一部分作为电子载体发挥作用。MitoQ 在分离的线粒体、细胞、动物和人体中广泛研究^[52]。这些研究揭示 MitoQ 可以防止脂质过氧化,对抗缺血-再灌注诱导的呼吸控制率下降,对复合体 I 损伤和顺乌头酸酶活性下降有一定的保护作用^[54]。

5 其他

OXPHOS 缺陷导致的 ATP 供能危机也被认为是线粒体疾病的主要致病机制之一。优化细胞 ATP 供给目前已成为该领域的研究热点,即在底物水平磷酸化或氧化磷酸化水平上提高 ATP 合成。此外,采用取代酶绕过缺陷的 OXPHOS 酶的方法也可防止电子传递阻滞及醌和 NADH/NAD 的过量减少并阻止 ROS 产生和细胞代谢障碍。至今在哺乳动物中发现两种取代酶:鱼藤酮不敏感的 NADH 脱氢酶 (NDi-1)^[55-56] 和氰化物不敏感的取代氧化酶 (AOX)^[57-59]。两种酶都可以参与电子传递。

6 展望

过去的十年里有关线粒体疾病发病机制的研究得到了飞速的发展,然而合适的治疗和干预策略却停滞不前。最近几年旨在改善线粒体缺陷,影响遗传、代谢和生物合成的实验方法前景可观。这些方

法彼此互补,可能通过联合作用控制线粒体障碍带来的影响。细胞和动物模型以及一些临床试验的研究将有助于揭示这些方法在治疗和干预线粒体疾病方面的应用前景。

[参 考 文 献]

- [1] Jenuth JP, Peterson AC, Shoubridge EA. Tissue-specific selection for different mtDNA genotypes in heteroplasmic mice. *Nat Genet*, 1997, 16: 93-5
- [2] Srivastava S, Moraes CT. Manipulating mitochondrial DNA heteroplasmy by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Hum Mol Genet*, 2001, 10: 3093-9
- [3] Bayona-Bafaluy MP, Blits B, Battersby BJ, et al. Rapid directional shift of mitochondrial DNA heteroplasmy in animal tissues by a mitochondrially targeted restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102: 14392-7
- [4] Bacman SR, Williams SL, Garcia S, et al. Organ-specific shifts in mtDNA heteroplasmy following systemic delivery of a mitochondria-targeted restriction endonuclease. *Gene Ther*, 2010, 17: 713-20
- [5] Kim S, Kim JS. Targeted genome engineering via zinc finger nucleases. *Plant Biotechnol Rep*, 2011, 5(1): 9-17
- [6] Urnov FD, Miller JC, Lee YL, et al. Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature*, 2005, 435: 646-51
- [7] Perez EE, Wang J, Miller JC, et al. Establishment of HIV-1 resistance in CD4⁺ T cells by genome editing using zinc-finger nucleases. *Nat Biotechnol*, 2008, 26: 808-16
- [8] Carroll D. Progress and prospects: zinc-finger nucleases as gene therapy agents. *Gene Ther*, 2008, 15: 1463-8
- [9] Minczuk M, Papworth MA, Kolasinska P, et al. Sequence-specific modification of mitochondrial DNA using a chimeric zinc finger methylase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 19689-94
- [10] Minczuk M, Papworth MA, Miller JC, et al. Development of a single-chain, quasidimeric zinc-finger nuclease for the selective degradation of mutated human mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36: 3926-38
- [11] Maurer GD, Brucker DP, Baehr O, et al. Differential utilization of ketone bodies by neurons and glioma cell lines: a rationale for ketogenic diet as experimental glioma therapy. *BMC Cancer*, 2011, 26: 11(1): 315
- [12] Kang HC, Lee YM, Kim HD, et al. Safe and effective use of the ketogenic diet in children with epilepsy and mitochondrial respiratory chain complex defects. *Epilepsia*, 2007, 48: 82-8
- [13] Ahola-Erkila S, Carroll CJ, Peltola-Mjosund K, et al. Ketogenic diet slows down mitochondrial myopathy progression in mice. *Hum Mol Genet*, 2010, 19: 1974-84
- [14] Morgan JE, Partridge TA. Muscle satellite cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 2003, 35: 1151-6
- [15] Hawke TJ, Garry DJ. Myogenic satellite cells: physiology to molecular biology. *J Appl Physiol*, 2001, 91: 534-51
- [16] Clark KM, Bindoff LA, Lightowlers RN, et al. Reversal of

- a mitochondrial DNA defect in human skeletal muscle. *Nat Genet*, 1997, 16: 222-4
- [17] Brown DT, Herbert M, Lamb VK, et al. Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the future. *Lancet*, 2006, 368: 87-9
- [18] Fulka J Jr, Fulka H, John JC. Transmission of mitochondrial DNA disorders: possibilities for the elimination of mutated mitochondria. *Cloning Stem Cells*, 2007, 9: 47-50
- [19] Kuehn BM. Scientists probe method to prevent inherited mitochondrial gene diseases. *JAMA*, 2009, 302: 1409
- [20] Tachibana M, Sparman M, Sritanaudomchai H, et al. Mitochondrial gene replacement in primate offspring and embryonic stem cells. *Nature*, 2009, 461: 367-72
- [21] Thorburn DR, Dahl HH. Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet*, 2001, 106: 102-14
- [22] Tarassov I, Kamenski P, Kolesnikova O, et al. Import of nuclear DNA-encoded RNAs into mitochondria and mitochondrial translation. *Cell Cycle*, 2007, 6: 2473-7
- [23] Kolesnikova OA, Entelis NS, Jacquin-Becker C, et al. Nuclear DNA-encoded tRNAs targeted into mitochondria can rescue a mitochondrial DNA mutation associated with the MERRF syndrome in cultured human cells. *Hum Mol Genet*, 2004, 13: 2519-34
- [24] Mahata B, Mukherjee S, Mishra S, et al. Functional delivery of a cytosolic tRNA into mutant mitochondria of human cells. *Science*, 2006, 314: 471-4
- [25] Mukherjee S, Mahata B, Mahato B, et al. Targeted mRNA degradation by complex mediated delivery of antisense RNAs to intracellular human mitochondria. *Hum Mol Genet*, 2008, 17: 1292-8
- [26] Enriquez JA, Chomyn A, Attardi G. MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA^{Lys} and premature translation termination. *Nat Genet*, 1995, 10: 47-55
- [27] Ling J, Roy H, Qin D, et al. Pathogenic mechanism of a human mitochondrial tRNA^{Phe} mutation associated with myoclonic epilepsy with ragged red fibers syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 15299-304
- [28] Park H, Davidson E, King MP. The pathogenic A3243G mutation in human mitochondrial tRNA^{Leu(UUR)} decreases the efficiency of aminoacylation. *Biochemistry*, 2003, 42: 958-64
- [29] Sasarman F, Antonicka H, Shoubridge EA. The A3243G tRNA^{Leu(UUR)} MELAS mutation causes amino acid misincorporation and a combined respiratory chain assembly defect partially suppressed by overexpression of EFTu and EFG2. *Hum Mol Genet*, 2008, 17: 3697-707
- [30] Li R, Guan MX. Human mitochondrial leucyl-tRNA synthetase corrects mitochondrial dysfunctions due to the tRNA^{Leu(UUR)} A3243G mutation, associated with mitochondrial encephalomyopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms and diabetes. *Mol Cell Biol*, 2010, 30: 2147-54
- [31] Park H, Davidson E, King MP. Overexpressed mitochondrial leucyl-tRNA synthetase suppresses the A3243G mutation in the mitochondrial tRNA(Leu(UUR)) gene. *RNA*, 2008, 14: 240716
- [32] Wagstaff KM, Jans DA. Protein transduction: cell penetrating peptides and their therapeutic applications. *Curr Med Chem*, 2006, 13: 1371-87
- [33] Becker-Hapak M, McAllister SS, Dowdy SF. TAT-mediated protein transduction into mammalian cells. *Methods*, 2001, 24: 247-56
- [34] Vocero-Akbani A, Chellaiah MA, Hruska KA, et al. Protein transduction: delivery of Tat-GTPase fusion proteins into mammalian cells. *Methods Enzymol*, 2001, 332: 36-49
- [35] Vyas PM, Payne RM. TAT opens the door. *Mol Ther*, 2008, 16: 647-8
- [36] Rapoport M, Saada A, Elpeleg O, et al. TAT-mediated delivery of LAD restores pyruvate dehydrogenase complex activity in the mitochondria of patients with LAD deficiency. *Mol Ther*, 2008, 16: 691-7
- [37] Yamada Y, Akita H, Kogure K, et al. Mitochondrial drug delivery and mitochondrial disease therapy an approach to liposomebased delivery targeted to mitochondria. *Mitochondrion*, 2007, 7(1-2): 63-71
- [38] Keeney PM, Quigley CK, Dunham LD, et al. Mitochondrial gene therapy augments mitochondrial physiology in a Parkinson's disease cell model. *Hum Gene Ther*, 2009, 20: 897-907
- [39] Gray RE, Law RH, Devenish RJ, et al. Allotopic expression of mitochondrial ATP synthase genes in nucleus of *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol*, 1996, 264: 369-89
- [40] Warner A, Vaziri ND. Treatment of lactic acidosis. *South Med J*, 1981, 74: 841-7
- [41] Walia A, Thapa BR, Kim V. Mitochondrial neurogastrointestinal encephalopathy syndrome. *Indian J Pediatr*, 2006, 73: 1112-4
- [42] Lara MC, Weiss B, Illa I, et al. Infusion of platelets transiently reduces nucleoside overload in MNGIE. *Neurology*, 2006, 67: 1461-3
- [43] Schon EA, Dimauro S, Hirano M, et al. Therapeutic prospects for mitochondrial disease. *Cell*, 2010, 16(6): 268-76
- [44] Balaban RS, Nemoto S, Finkel T. Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, 2005, 120: 483-95
- [45] Finkel T. Radical medicine: treating ageing to cure disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2005, 6: 971-6
- [46] Mancuso M, Coppede F, Migliore L, et al. Mitochondrial dysfunction, oxidative stress and neurodegeneration. *J Alzheimers Dis*, 2006, 10: 59-73
- [47] Rego AC, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in excitotoxicity and apoptosis: implications for the pathogenesis of neurodegenerative diseases. *Neurochem Res*, 2003, 28: 1563-74
- [48] Murphy MP, Smith RA. Drug delivery to mitochondria: the key to mitochondrial medicine. *Adv Drug Deliv Rev*, 2000, 41: 235-50
- [49] Orsucci D, Mancuso M, Ienco EC, et al. Targeting mitochondrial dysfunction and neurodegeneration by means of

- coenzyme Q10 and its analogues. *Curr Med Chem*, 2011, 18(26): 4053-64
- [50] Artuch R, Aracil A, Mas A, et al. Cerebrospinal fluid concentrations of idebenone in Friedreich ataxia patients. *Neuropediatrics*, 2004, 35: 958
- [51] Nitta A, Murakami Y, Furukawa Y, et al. Oral administration of idebenone induces nerve growth factor in the brain and improves learning and memory in basal forebrain-lesioned rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 1994, 349: 401-7
- [52] Cocheme HM, Kelso GF, James AM, et al. Mitochondrial targeting of quinones: therapeutic implications. *Mitochondrion*, 2007, 7 (Suppl): S94-102
- [53] Ross CM. Folate, mitochondria, ROS, and the aging brain. *Am J Med*, 2005, 118: 1174; author reply 1174-5
- [54] Adlam VJ, Harrison JC, Porteous CM, et al. Targeting an antioxidant to mitochondria decreases cardiac ischemia-reperfusion injury. *FASEB J*, 2005, 19: 1088-95
- [55] Seo BB, Nakamaru-Ogiso E, Flotte TR, et al. A single-subunit NADH-quinone oxidoreductase renders resistance to mammalian nerve cells against complex I inhibition. *Mol Ther*, 2002, 6: 336-41
- [56] Park JS, Li YF, Bai Y. Yeast NDI1 improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation. *Biochim Biophys Acta*, 2007, 1772: 533-42
- [57] Siedow JN, Umbach AL. The mitochondrial cyanide-resistant oxidase: structural conservation amid regulatory diversity. *Biochim Biophys Acta*, 2000, 1459(2-3): 432-9
- [58] Hakkaart GA, Dassa EP, Jacobs HT, et al. Allotopic expression of a mitochondrial alternative oxidase confers cyanide resistance to human cell respiration. *EMBO Rep*, 2006, 7: 341-5
- [59] Dassa EP, Dufour E, Goncalves S, et al. The alternative oxidase, a tool for compensating cytochrome c oxidase deficiency in human cells. *Physiol Plant*, 2009, 137: 427-34