

СОЗДАНИЕ МОДЕЛИ АТЕРОСКЛЕРОЗА НА ТРАНСГЕННЫХ МЫШАХ ПУТЁМ МОДИФИЦИРОВАНИЯ ГЕНОМА МИТОХОНДРИЙ

КУБЕКИНА М.В.¹✉

¹Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук России, Москва, Россия

Атеросклероз – хроническое вялотекущее заболевание артерий, возникающее в результате нарушения обмена липидов и белков, при котором происходит формирование атероматозных липидных бляшек в просвете сосудов. Атеросклероз наносит непоправимый ущерб здоровью людей и значительно увеличивает показатель смертности среди населения. Терапия атеросклероза не разработана до сих пор ввиду отсутствия симптомов в течение десятилетий на начальной стадии заболевания, сложности его патогенеза, этических вопросов. Основные генетически-модифицированные модели атеросклероза, разработанные на настоящий момент, не отражают все аспекты этого заболевания. Создание трансгенной модели атеросклероза, воспроизводящей все патофизиологические состояния, сопутствующие этому заболеванию, приблизит нас к пониманию его патогенеза, механизмов возникновения, а вместе с тем и позволит начать разрабатывать адекватную терапию. Настоящий обзор посвящён обсуждению создания новой модели атеросклероза, отвечающей данным требованиям. Автором ведётся работа по созданию трансгенной мыши, несущей мутации в геноме митохондрий, которые ассоциированы с атеросклерозом у людей. Данные мутации происходят в белках, входящих в состав 1-го и 3-го комплексов дыхательной цепи митохондрий, и затрудняют их слаженную работу. По литературным данным, эти мутации связаны с поражениями нервной системы и миопатиями. Получив такую базовую модель, мы сможем воссоздать в ней истинные атеросклеротические поражения с помощью дополнительных факторов.

Ключевые слова: атеросклероз, митохондрии, трансгенные мыши, митохондриальная ДНК, дыхательная цепь, мутагенез .

Цитирование: Кубекина М.В. Создание модели атеросклероза на трансгенных мышках путём модифицирования генома митохондрий. *Russian Scientist*. 2018. т.2 №2: 3-9

Citing: Kubekina MV. Creating a model of atherosclerosis in transgenic mice by modifying the mitochondrial genome. *Russian Scientist*. 2018.v.2 №2: 3-9

✉ marykumy@gmail.com

Материал прошёл двойное слепое рецензирование.

The manuscript took a double-blind peer review.

CREATING A MODEL OF ATHEROSCLEROSIS IN TRANSGENIC MICE BY MODIFYING THE MITOCHONDRIAL GENOME

M.V. KUBEKINA¹✉

¹Institute of gene biology Russian academy of science, Russia, Moscow

Atherosclerosis is a chronic artery disease resulting from a disturbance in the metabolism of lipids and proteins, which causes forming of atheromatous lipid plaques in the lumen of vessels. Atherosclerosis damages human health strongly and significantly increases the death rate among the population. Atherosclerosis therapy has not yet been developed. The main genetically modified models of atherosclerosis are mice knocked out for the *ApoE* gene (*ApoE*^{-/-}) and for the LDL receptor gene (*LDLR*^{-/-}). Unfortunately, these transgenic mice do not reproduce true atherosclerotic lesions, but xanthomas, being rather models of hyperlipidemic states. Creating a transgenic model of atherosclerosis, which reproduces in its body all the pathophysiological states associated with this disease, will bring us closer to understanding its pathogenesis, the mechanisms of its occurrence, and allow us to start developing effective therapy. This review is devoted to discussing the creation of a new model of atherosclerosis that meets these requirements. The author is working on the creation of a transgenic mouse carrying mutations in the mitochondrial genome that are associated with atherosclerosis in humans. These mutations occur in the proteins that make up the 1st and 3rd complexes of the mitochondrial respiratory chain and make its' well-coordinated work difficult. According to literary data, these mutations are associated with lesions of the nervous system and myopathies. Having obtained such a basic model, we will be able to recreate true atherosclerotic lesions in it with the help of additional factors.

Key words: atherosclerosis, mitochondria, transgenic mice, mitochondrial DNA, respiratory chain, mutagenesis.

Введение

Болезни, связанные с атеросклерозом, часто оказываются основной причиной повышенной смертности в большинстве развитых стран, приводя к большим социально-экономическим проблемам [1]. Несмотря на достигнутые успехи в разработке препаратов, диагностике и хирургическом лечении, адекватная терапия атеросклероза до сих пор не разработана. [2].

Чтобы объяснить причину и механизмы развития атеросклероза, было разработано множество гипотез, и почти все они сводятся к повреждению эндотелия сосудов под действием различных агентов (механических, химических, инфекционных), изменению профиля липопротеинов, увеличенной активности иммунной системы [3]. Также обнаружены ассоциированные с патогенезом атеросклероза мутации в геноме митохондрий [4]. При этом на данный момент отсутствует общепризнанная гипотеза, объясняющая развитие атеросклеротического процесса. Изучение этиологии, патогенеза и молекулярно-биологических механизмов развития атеросклероза у человека затруднено по ряду причин: из-за бессимптомного протекания заболевания на ранних стадиях процесса, этических проблем и недостаточной технологической оснащённости исследователей и клиницистов, не позволяющей с высокой точностью визуализировать и динамично отслеживать атерогенные повреждения [5]. Эти обстоятельства и потребность в разработке новых терапевтических подходов обуславливают необходимость моделирования атеросклеротического процесса.

Мыши как модели атеросклероза

Животные модели, применяемые для исследования атеросклероза, включают мышей, крыс, кроликов, морских свинок, хомяков, каждый из которых имеет свои достоинства и недостатки. Наиболее предпочтительный вид — мыши, имеют малый размер, продолжительность жизни 1-2 года, относительно недороги в обслуживании для долгосрочных экспериментов. Но самое важное — это простота внедрения широкого спектра генетических манипуляций, в том числе трансгенез, нокаут/нокин гена. Возможно изменение экспрессии гена и одновременная модификация более чем одного гена в одной модели [6].

На данный момент основные мышинные модели, используемые для изучения атеросклероза, это мыши, нокаутные по гену *ApoE* (*ApoE*^{-/-}) и по гену рецептора к липопротеидам низкой плотности — ЛНП, (*LDLr*^{-/-}), а также по обоим генам одновременно. Ген *ApoE* кодирует белок apoE, который входит в состав липопротеидов очень низкой плотности и хиломикронов. Ген *LDLr* кодирует рецептор, опосредующий эндоцитоз ЛНП, участвующих в метаболизме липидов [7].

Мыши *ApoE*^{-/-} и *LDLr*^{-/-} являются двумя наиболее часто используемыми моделями для оценки воздействия продуктов различных генов и типов клеток на атерогенез. Гиперлипидемия индуцируется в обеих моделях, но механизмы, способствующие развитию атеросклероза, различны. Мыши *LDLr*^{-/-} дефектны по рецептору, опосредующему захват липопротеинов из крови, в то время как у мышей *ApoE*^{-/-} не происходит биосинтез белка apoE в гепатоцитах и других клетках, особенно макрофагах. К сожалению, данные модели, строго говоря, моделируют не атеросклероз, а гиперлипидемиию. Эта патология сопровождается высоким уровнем холестерина в крови, что приводит к образованию поражений в артериальной стенке. Но это не истинные атеросклеротические поражения, а ксантомы [7]. Как мы видим, для формирования ясного представления о патогенезе атеросклероза данных моделей недостаточно. Необходима другая модель, которая бы позволяла отследить образование истинных атеросклеротических поражений.

Перспективы создания новой модели атеросклероза на генетически-модифицированных мышцах

Автором данной статьи ведётся работа по созданию базовой модели атеросклероза, на основании которой можно будет спровоцировать это заболевание с помощью дополнительных факторов. Было показано, что у лиц с бессимптомным атеросклерозом происходят определённые мутации в митохондриальном геноме [8]. На группе из 190 пациентов обнаружено девять мутаций, происходящих в митохондриальном геноме, ассоциированных с атеросклерозом, что делает актуальной проблему создания мышинной генетически-модифицированной модели атеросклероза, имеющей гомологичные мутации в митохондриальном геноме. Это мутации: m.1555A>G, m.3256C>T,

m.3336T>C, m.5178C>A, m.12315G>A, m.13513G>A, m.14459G>A, m.14846G>A, m.15059G>A. Создание животной модели с митохондриальными мутациями позволит изучить механизмы связи дефектов митохондриального генома с атерогенезом, а также позволит искать фармакологические агенты, способные подавлять атерогенез при подобных нарушениях. В качестве модели атеросклероза предполагается получение мышей, содержащих сайтспецифические мутации в геноме митохондрий, соответствующие мутациям, обнаруженным у пациентов с хронической формой атеросклероза [9]. В результате биоинформатического анализа выяснилось, что из всех девяти мутаций только две, а именно m.14459G>A и m.14846G>A, происходят в структурных генах. Остальные семь мутаций локализованы в генах, кодирующих тРНК, структуру которой после мутации невозможно предсказать. По результатам биоинформатического анализа отобраны две из мутаций-кандидатов: m.14459G>A (ген *Mt-nd6* – mitochondrially encoded NADH dehydrogenase 6) и m.14846G>A (ген *Mt-cyb* – mitochondrially encoded cytochrome b). Мутагенез будет осуществлен за счёт доставки в митохондрии комплекса Cas9-sgRNA и матрицы для гомологичной рекомбинации по месту разрыва. Будут проводиться работы по созданию методом CRISPR/Cas9 опосредованного сайтспецифичного встраивания индуцируемого нокаута по кодируемой в ядерном геноме митохондриальной полимеразе POL γ для индукции спонтанных мутаций в митохондриальном геноме для отбора мутаций, приводящих к развитию патологических состояний. Планируется в ген *Poly* ввести мутацию, которая лишит фермент корректирующей 3'-5'-экзонуклеазной активности, что, в свою очередь, приведёт к возникновению ошибок (спонтанных мутаций и делеций) при репликации митохондриальной ДНК [10].

Эксперименты по получению мышей с дефектными митохондриями

Митохондриальная ДНК находится в состоянии многокопийности – на каждую соматическую клетку приходится сотни копий молекул митохондриальной ДНК. Эти копии могут отличаться друг от друга длиной, набором генов, наличием мутаций. Данное состояние известно, как гетероплазмия. Клиническое проявление какой-либо мутации происходит, когда мутантный фенотип

мтДНК достигает примерно 70% [11]. Ещё одна особенность митохондриального генома – быстрые процессы мутирования, отсутствие рекомбинаций и цитоплазматическое наследование генов. Митохондриальный геном отличается большой плотностью нуклеотидных замен и существенной нестабильностью (в 10-17 раз превышает степень мутирования ядерных генов). В течение жизни человека в мтДНК часто возникают соматические мутации [12]. Основная причина появления и развития патологии митохондрий кроется в отсутствии гистонов, своеобразности репарационных механизмов и наличии свободных радикалов кислорода, которые являются побочными продуктами аэробного дыхания [13]. Описаны мутации нескольких генов, участвующих в поддержании жизнедеятельности мтДНК и в синтезе митохондриальных белков, также они смоделированы у мышей.

Becker L. и соавт. описали мышей, дефектных по гену *Mto1*, который кодирует белок МТО1, участвующий в модификации митохондриальной тРНК [14]. У мышей *Mto1*^{-/-} снижено количество копий мтДНК и нарушены процессы окислительного фосфорилирования, а также снижен уровень биосинтеза митохондриальных белков *de novo*. Анализ сердец мышей данной модели с помощью электронной микроскопии выявил очаговый некроз в клетках сердечной мышцы, увеличение размера крист в митохондриях и расширение саркоплазматического ретикулума у молодых взрослых мутантных мышей по сравнению с мышами дикого типа [15].

Ещё один пример связан с инактивацией митохондриального транскрипционного фактора TFAM, кодируемого в ядре. Ген *Tfam* кодирует ключевой фактор транскрипции в митохондриях, содержащий мотивы двух групп высокой мобильности. Закодированный белок также функционирует при репликации и восстановлении митохондриальной ДНК. Полиморфизмы последовательности в этом гене связаны с болезнями Альцгеймера и Паркинсона [16]. *Larsson N.G.* и соавт. обнаружили, что гомозиготные мыши *Tfam*^{-/-} погибали при внутриутробном развитии, в то время как гетерозиготные животные *Tfam*^{+/-} имели частичное снижение уровня белков митохондриального комплекса I в сердце, но не в печени. Снижение биосинтеза белка TFAM также приводит к снижению числа копий мтДНК [17].

Chouchani E.T. и соавт. описали мышей, дефектных по ядерному гену *Ndufs4*. Этот ген кодирует вспомогательную субъединицу I комплекса дыхательной цепи митохондрий (NADH-дегидрогеназа). Комплекс I переносит электроны от NADH на электронный акцептор убихинон. Мутации в этом гене связаны с дефектами митохондриального комплекса I, которые могут приводить к тяжёлой гипертрофической кардиомиопатии [18].

Полимераза γ (POL γ) осуществляет удвоение и репарацию митохондриальной ДНК. *Trifunovic A.* и соавт. провели работу по созданию мышей с мутантной формой этого фермента, а именно – лишили его 3'-5'-экзонуклеазной активности. Таким образом, у этих мышей не происходила репарация ошибок, создаваемых полимеразой γ . Эта модель летальна, средний возраст мышей составляет около 38 недель. Авторы показа-

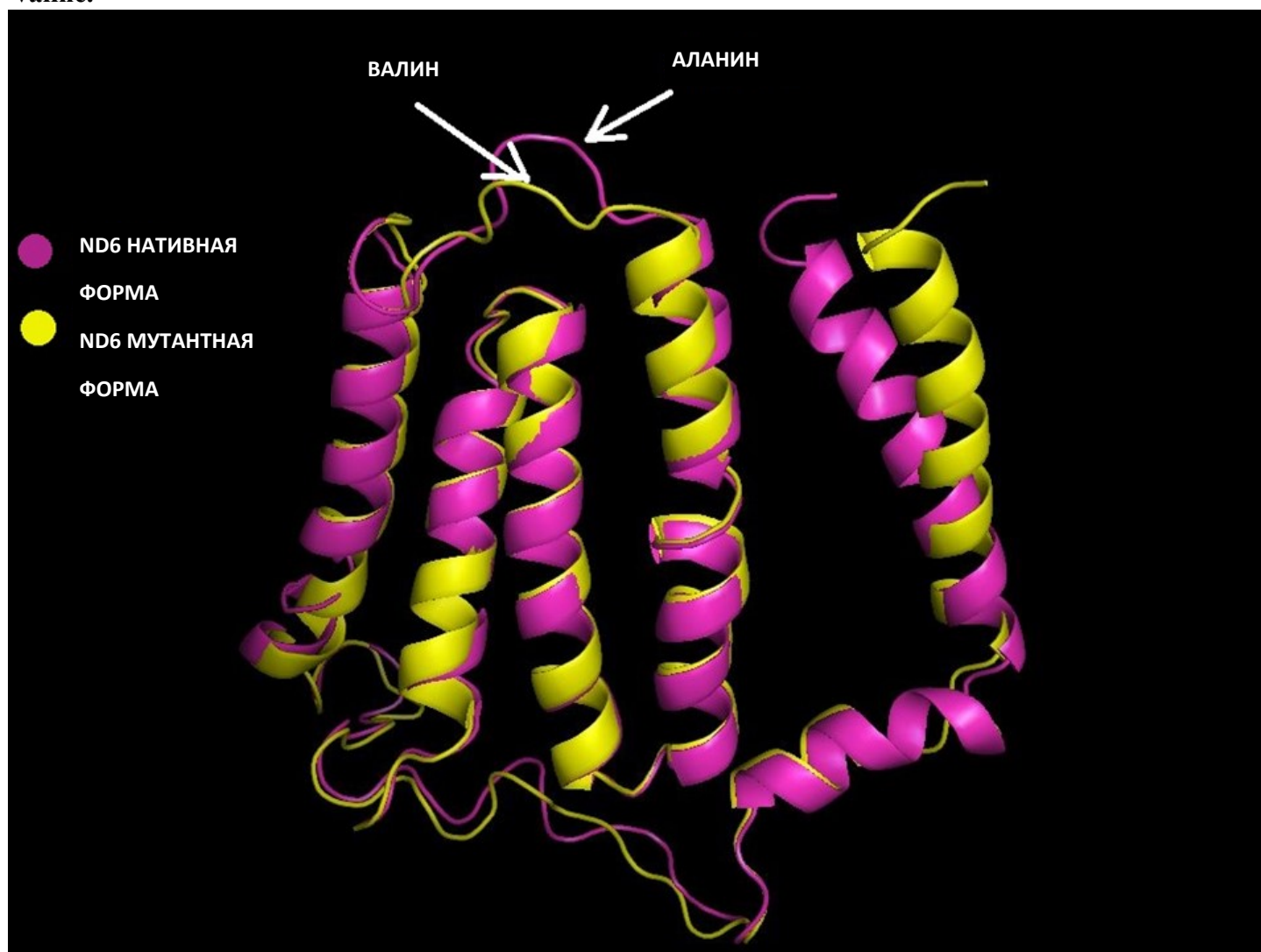
ли, что увеличение мутаций мтДНК в соматических клетках связано с уменьшением продолжительности жизни и преждевременным началом старения. У мышей этой линии наблюдался следующий фенотип: потеря веса, снижение содержания подкожного жира, выпадение шерсти, кифоз, остеопороз, анемия, снижение фертильности и увеличение сердца [10].

Биоинформатический анализ мутаций в генах *Mt-nd6* и *Mt-cyb*

У лиц с бессимптомным атеросклерозом обнаружено, что в митохондриальных генах *Mt-nd6* и *Mt-cyb* вследствие мутации гуанин заменяется на аденин. Продукты данных генов выполняют в организме важные функции, связанные с эффективной работой цепи переноса электронов.

Ген *Mt-nd6* кодирует 6-ую коровую субъединицу 1-го комплекса дыхательной цепи –

Рис. 1. 3D-структура нативной и мутантной формы человеческого белка ND-6. Мутантная форма имеет замену 14459G>A, приводящую к замене аминокислоты аланин на аминокислоту валин.
Fig.1. The 3D structure of the native and mutant forms of the human ND-6 protein. The mutant form has a substitution 14459G>A, leading to the replacement of the amino acid alanine by the amino acid valine.

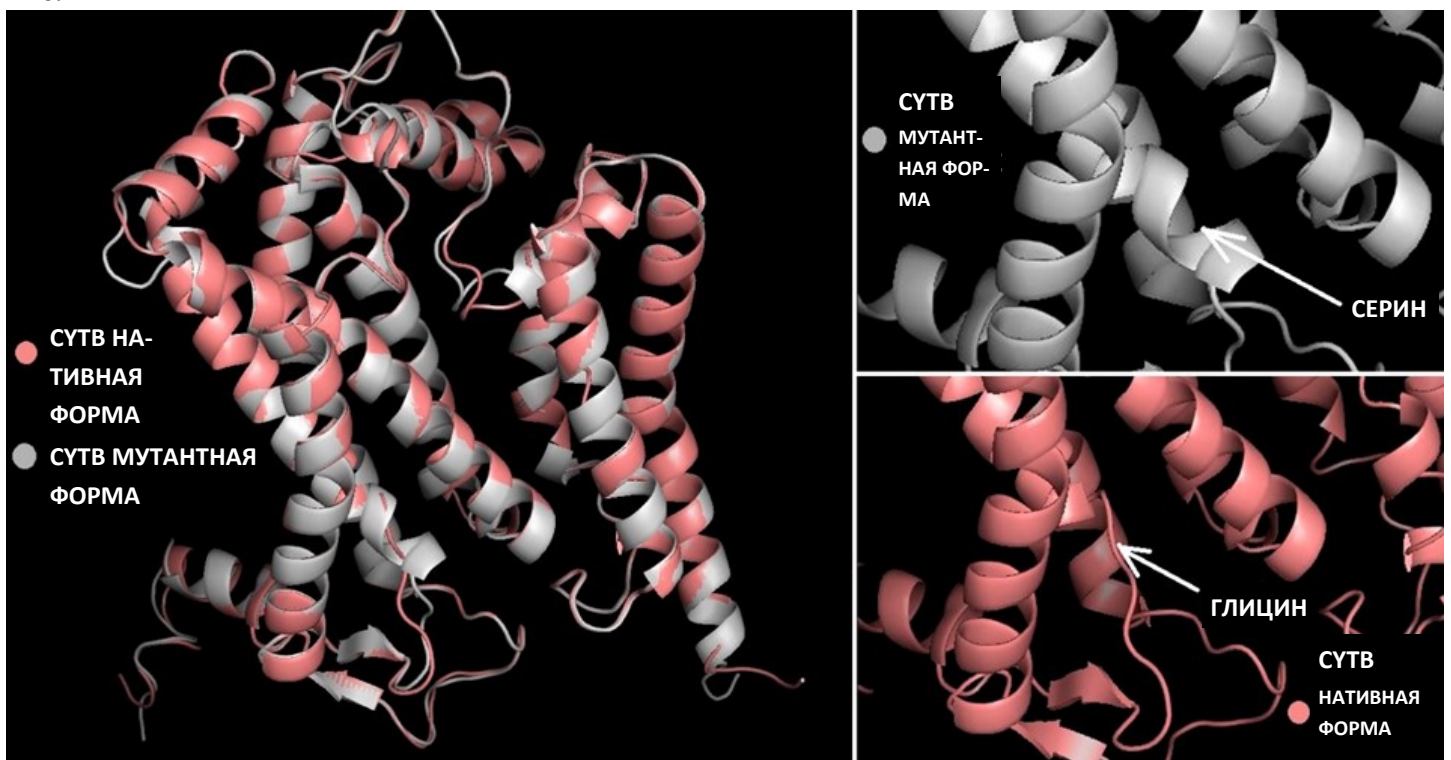


NADH-дегидрогеназы, которая катализирует перенос электронов от *NADH* на растворённый в мембране убихинон. Этот белок является компонентом минимальной сборки, необходимой для работы дыхательной цепи. С мутациями в этом гене связаны такие заболевания, как наследственная оптическая нейропатия Лебера [19] и подострая некротизирующая энцефаломиопатия (синдром Лея) [20], поражающие нервную систему.

Ген *Mt-cyb* кодирует каталитическую субъединицу 3-го комплекса – Цитохром-*bc1*-оксидазы, который опосредует перенос электрона с убихинола на цитохром *c*. Способствует генерации протонного градиента через митохондриальную мембрану, которая затем используется для синтеза АТФ [21]. Дефекты в белке МТ-СУВ являются причиной митохондриальных дисфункций, лежащих в основе различных миопатий. Они включают митохондриальную энцефаломиопатию, гипертрофическую кардиомиопатию и спорадическую митохондриальную миопатию. Преобладающим симптомом митохондриальной миопатии является быстрая утомляемость [22]. Другие симптомы включают лактоацидоз, мышечную слабость и/или миоглобинурию [23].

Мы изучили пространственную структуру данных белков с помощью биоинформатических программ PyMOL и Geneious. В белке ND6 вследствие мутации аминокислота аланин заменена на валин, а в белке СУВ аминокислота глицин заменена на серин. Было показано, что мутация 14459 в гене ND6 приводит к изменению убихинон-связывающего сайта *NADH*-дегидрогеназы, что делает её более чувствительной к убихинону (Рис. 1) [24]. Таким образом, при возникновении этой мутации, убихинон способен ингибировать комплекс I. В белке СУТВ мутантный серин обладает структурной формулой, превосходящей по величине структурную формулу нативного глицина. По-видимому, это может приводить к нарушению правильной сборки и, как следствие, активности белка СУТВ (Рис. 2). Мы полагаем, что при нарушении правильной структуры данного компонента дыхательной цепи в процессе окислительного фосфорилирования происходит утечка электронов, ведущая к окислительному стрессу, который, как известно, коррелирует с течением сердечно-сосудистых заболеваний [25]. Таким образом, для создания базовой генетически-модифицированной модели атеросклероза на мышцах были выбраны мутации именно в генах *Mt-nd6* и *Mt-cyb*. Такая базовая модель позволит развить у живот-

Рис. 2. 3D-структура нативной и мутантной формы человеческого белка СУТВ. Мутантная форма имеет замену 14846G>A, приводящую к замене аминокислоты глицин на аминокислоту серин.
Fig.2. 3D-structure of the native and mutant forms of human СУТВ protein. The mutant form has a substitution 14846G>A, resulting in the replacement of the amino acid glycine with the amino acid serine.



ного атеросклеротические поражения с помощью таких дополнительных факторов, как малая подвижность, диета с высоким содержанием липидов.

Выводы

Моделирование патогенеза атеросклероза – незаменимый подход в современных исследованиях при изучении молекулярно-генетических механизмов, детерминирующих атерогенные повреждения сосудов. Интерпретация полученных в таких исследованиях результатов основана на общности эволюционно выработанных механизмов повреждения и регенерации клеток и тканей в ряду высших позвоночных животных. Генетические манипуляции, влияющие на обменные процессы, позволяют получить у мышей атеросклеротические повреждения, сходные с человеческими. Для разработки эффективных методов лечения атеросклероза и понимания его этиологии необходимо моделирование этого заболевания на трансгенных мышах. В данном обзоре мы обсудили важность создания новой мышинной модели атеросклероза, несущей в себе некоторые мутации митохондриального генома, с которыми выявлена ассоциация с атерогенезом у людей. Эти мутации происходят в 1-ом и 3-ем комплексах дыхательной цепи и непосредственно связаны с её адекватной работой. Создание такой модели позволит разработать подходы к таргетной терапии этого заболевания и приблизить нас к пониманию его патогенеза.

Благодарность

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант 17-75-20249, Дейкин Алексей Васильевич).

Использованная литература:

1. Temchenko AV, Nikiforov NG, Orekhova VA, Melnichenko AA, Karagodin VP, Sobenin IA, Orekhov AN. Achievements in therapy of atherosclerosis. *Pathogenesis* 2013,11(3)13-21.
2. Bobryshev YV, Orekhov AN. Dendritic cells in atherosclerosis: identification and pathophysiological significance. *Pathogenesis*, 2013, 11(1) 9-17.
3. Aladinsky VA, Nikiforov NG, Orekhova VA, Melnichenko AA, Karagodin VP, Sobenin IA, Orekhov AN. Direct anti-atherosclerotic therapy: possible approaches, results of clinical trials. *Patol Fiziol Eksp Ter*, 2013, 4:76-83.
4. Sobenin IA, Zhelankin AV, Mitrofanov KY, Sinyov W, Sazonova MA Postnov AY, Orekhov AN. Mutations of mitochondrial DNA in atherosclerosis and atherosclerosis-related diseases. *Curr Pharm Des*. 2015;21 (9): 1158-63. Review. PMID: 25312735.
5. Chernova EV, Sobenin IA, Melnichenko AA, Karagodin AP, Orekhov AN. Serum atherogenicity as a pathogenetic target for direct anti-atherosclerotic therapy. *Pathogenesis*, 2013, 11(2)28-417.
6. Jawien J, Nastatek P, Korbut R. Mouse models of experimental atherosclerosis. *J Physiol Pharmacol*. 2004 Sep;55(3):503-17. Review. PMID: 15381823.
7. Emini Veseli B, Perrotta P, De Meyer GRA, Roth L, Van der Donckt C, Martinet W, De Meyer GRY. Animal models of atherosclerosis. *Eur J Pharmacol*. 2017 Dec 5;816:3-13. doi: 10.1016/j.ejphar.2017.05.010. Epub 2017 May 5. Review. PMID: 28483459
8. Sazonova MA, Sinyov VV, Ryzhkova AI, Galitsyna EV, Khasanova ZB, Postnov AY, Yarygina EI, Orekhov AN, Sobenin IA. Role of Mitochondrial Genome Mutations in Pathogenesis of Carotid Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev*. 2017;2017:6934394. doi: 10.1155/2017/6934394. Epub 2017 Jul 25.
9. Sazonova MA, Sinyov VV, Barinova VA, Ryzhkova AI, Bobryshev YV, Orekhov AN, Sobenin IA. Association of mitochondrial mutations with the age of patients having atherosclerotic lesions. *Exp Mol Pathol*. 2015 Dec;99 (3):717-9. doi: 10.1016/j.yexmp.2015.11.019. Epub 2015 Nov 14.
10. Trifunovic A, Wredenberg A, Falkenberg M, Spelbrink JN, Rovio AT, Bruder CE, Bohlooly-Y M, Gidlöf S, Oldfors A, Wibom R, Törnell J, Jacobs HT, Larsson NG. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase. *Nature*. 2004 May 27;429(6990):417-23.
11. Loutre R, Heckel AM, Smirnova A, Entelis N, Tarassov I. Can Mitochondrial DNA be CRISPRized: Pro and Contra. *IUBMB Life*. 2018 Sep 5. doi: 10.1002/iub.1919. PMID: 30184317
12. Su T, Turnbull DM, Greaves LC. Roles of Mitochondrial DNA Mutations in Stem Cell Ageing. *Genes (Basel)*. 2018 Mar 27;9(4). pii: E182. doi: 10.3390/genes9040182. Review. PMID: 29584704
13. McCormick EM, Muraresku CC, Falk MJ. Mitochondrial Genomics: A complex field now coming of age. *Curr Genet Med Rep*. 2018 Jun;6(2):52-61. doi: 10.1007/s40142-018-0137-x. Epub 2018 May 2. PMID: 30386685
14. Ghezzi D, Baruffini E, Haack TB, Invernizzi F, Melchionda L, Dallabona C, Strom TM, Parini R, Burlina AB, Meitinger T, Prokisch H, Ferrero I, Zeviani M. Mutations of the mitochondrial-tRNA modifier MTO1 cause hypertrophic cardiomyopathy and lactic acidosis. *Am J Hum Genet*. 2012 Jun 8;90(6):1079-87. doi: 10.1016/j.ajhg.2012.04.011. Epub 2012 May 17. PMID: 22608499
15. Becker L, Kling E, Schiller E, Zeh R, Schrewe A, Hölter SM, Mossbrugger I, Calzada-Wack J, Strecker V, Wittig I, Dumitru I, Wenz T, Bender A, Aichler M, Janik D, Neff F, Walch A, Quintanilla-Fend L, Floss T, Bekeredjian R, Gailus-Durner V, Fuchs H, Wurst W, Meitinger T, Prokisch H, de Angelis MH, Klopstock T. MTO1-deficient mouse model mirrors the human phenotype showing complex I defect and cardiomyopathy. *PLoS One*. 2014 Dec 15;9 (12):e114918. Doi: 10.1371/journal.pone.0114918. eCollection 2014. PMID: 25506927; Central PMCID: PMC4266617.

16. Belin AC, Björk BF, Westerlund M, Galter D, Sydow O, Lind C, Pernold K, Rosvall L, Håkansson A, Winblad B, Nissbrandt H, Graff C, Olson L. Association study of two genetic variants in mitochondrial transcription factor A (TFAM) in Alzheimer's and Parkinson's disease. *Neurosci Lett*. 2007 Jun 15;420(3):257-62. Epub 2007 May 10. PMID: 17537576
17. Larsson NG, Wang J, Wilhelmsson H, Oldfors A, Rustin P, et al. (1998) Mitochondrial transcription factor A is necessary for mtDNA maintenance and embryogenesis in mice. *Nat Genet* 18:231–236.
18. Chouchani ET, Methner C, Buonincontri G, Hu CH, Logan A, et al. (2014) Complex I deficiency due to selective loss of *ndufs4* in the mouse heart results in severe hypertrophic cardiomyopathy. *PLoS one* 9:e94157.
19. Pätsi J, Kervinen M, Finel M, Hassinen IE. Leber hereditary optic neuropathy mutations in the ND6 subunit of mitochondrial complex I affect ubiquinone reduction kinetics in a bacterial model of the enzyme. *Biochem J*. 2008 Jan 1;409(1):129-37. PMID: 17894548. doi: 10.1042/BJ20070866.
20. Ugalde C, Triepels RH, Coenen MJ, van den Heuvel LP, Smeets R, Uusimaa J, Briones P, Campistol J, Majamaa K, Smeitink JA, Nijtmans LG. Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Ann Neurol*. 2003 Nov;54(5):665-9. PMID: 14595656.
21. Fragaki K, Procaccio V, Bannwarth S, Serre V, O'Hearn S, Potluri P, Augé G, Casagrande F, Caruba C, Lambert JC, Paquis-Flucklinger V. A neonatal polyvisceral failure linked to a de novo homoplasmic mutation in the mitochondrially encoded cytochrome b gene. *Mitochondrion*. 2009 Sep; 9 (5): 346–52. doi:10.1016/j.mito.2009.06.002. PMID 19563916.
22. Hagen CM, Aidt FH, Havndrup O, Hedley PL, Jespersgaard C, Jensen M, Kanters JK, Moolman-Smook JC, Møller DV, Bundgaard H, Christiansen M. MT-CYB mutations in hypertrophic cardiomyopathy. *Mol Genet Genomic Med*. 2013 May;1(1):54-65. doi: 10.1002/mgg3.5. Epub 2013 Apr 12. PMID: 24498601; PMCID: PMC3893158; doi: 10.1002/mgg3.5.
23. Mori M, Goldstein J, Young SP, Bossen EH, Shoffner J, Koeberl DD. Complex III deficiency due to an in-frame MT-CYB deletion presenting as ketotic hypoglycemia and lactic acidosis. *Mol Genet Metab Rep*. 2015 Jun 30;4:39-41. doi: 10.1016/j.ymgmr.2015.06.001. eCollection 2015 Sep. PMID: 26937408; PMCID: PMC4750615; doi: 10.1016/j.ymgmr.2015.06.001.
24. AS Jun, MD Brown, DC Wallace. A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1994 Jun 21; 91(13): 6206–6210.
25. Kim YW, Byzova TV. Oxidative stress in angiogenesis and vascular disease. *Blood*. 2014 Jan 30;123(5):625-31. doi: 10.1182/blood-2013-09-512749. Epub 2013 Dec 3. PMID: 24300855; PMCID: PMC3907751.