تصحيح التعبير الجيني لمورثة البروتين الليبيدي (Proteolipid Protein) باستعمال تقنية تداخل الحمض النووي الريبي (RNA Interference) على السلالات الخلوية للخلايا قليلة التغصنات من نموذج مخبري لمرض بيليزاوس–ميرتزباخر (Pelizaeus-Merzbacher Disease)

د. زينة مالك*

الملخص

تهدف هذه الدراسة إلى إخماد مورثة البروتين الليبيدي باستخدام تقنية تداخل الحمض الريبي النووي (RNA Interference)، وذلك على سلالات الخلايا قليلة التغصنات الطافرة لهذا البروتين، والتي يتم الحصول عليها من الفئران الحاملة لتلك الطفرة، حيث تمثل نموذجاً لدراسة الاضطرابات المزيلة لغمد النخاعين وبصورة خاصة داء بيليزاوس–ميرتزباخر.

تشير النتائج الأولية إلى تصحيح في استجابة تلك الخلايا الوظيفية لوجود مادة الدي بيوتيريل أدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي (cAMP) بعد التداخل بتسلسلات قصيرة من الحمض الريبي النووي (Short interfering RNA)، وذلك من خلال قياس عدد من الجزيئات الحيوية الخاصة بالخلايا المكونة لغمد النخاعين، وعلى

* كلية الصيدلة الجامعة السورية الخاصة دمشق–سورية

رأسها كل من بروتين النخاعين القاعدي (MBP) وخميرة الكاربونيك أنهيدراز (CAII).

تقترح هذه المعطيات إمكانية استخدام التداخل الوراثي على النماذج الحيوانية الحية كآلية علاجية للأمراض الجينية المرتبطة بزوال النخاعين؛ شريطة اختبار نظام إيصال نوعي، وملائم وفاعل في الجسم الحي.

الكلمات المفتاحية: تداخل الحمض الريبي النووي– غمد النخاعين– خلايا قليلة التغصنات– بروتين ليبيدي

Regulation of proteolipid protein (PLP) expression in oligodendrocytes cell lines of animal models for Pelizaeus-Merzbacher Disease (PMD) using RNA interference (RNAi) technology

Dr. Zeina Malek *

Abstract

In this study, RNA interference technology was used to inhibit gene expression of the Proteolipid Protein (PLP) on Oligodendrocytes cell lines from Jimpy mutant mice, an animal model for Pelizaeus-Merzbacher Disease (PMD), which is a X-linked sever leukodystrophy. The preliminary findings demonstrate a significant correction of functional aspects in oligodendrocytes, ie effect of dibutyryladenosine 3 ,5 - cyclic monophosphate (dbcAMP) application on both Myelin Basic Protein and Carbonic Anhydrase II expression. Our results suggest a breakthrough in leukodystrophy therapy especially if coupled with effective delivery system *in vivo*.

Key words: RNA Interference- Myelin sheath- Oligodendrocytes- Proteolipid Protein

* Faculty of Pharmacy Syrian Private University Damascus-Syria

المقدمة

يُعَد البروتين الليبيدي (Proteolipid Protein, PLP) من أهم المكونات البروتينية لمادة النخاعين التي تكون الأغماد العازلة المحيطة بمحاوير الخلايا العصبية، حيث يسهم في تكونها واستقرار بنيتها. غمد النخاعين هو غلاف عديد الطبقات ينطلق من غشاء الخلايا الدبقية قليلة التغصنات (Oligodendrocytes)، ويلتف بصورة متكررة حول محور الخلية العصبية؛ مما يؤمِّن عزلاً كهربائياً، ويزيد من كفاية نقل الدفقات العصبية وفاعليتها وسرعتها [1]. تتوضع مورثة البروتين الليبيدي PLP على الصبغي الجنسي X، ويتكون البروتين وسطياً من حوالي 280 حمضاً أمينياً، وهو بروتين غشائي له أربعةُ تسلسلات عابرة للغشاء (Transmembrane segments)، وجسران ثنائيا الكبريت، ويربط هذا البروتين ست مجموعات ليبيدية بصورة تكافؤية [2-1]

إلى جانب الـ PLP تقوم الخلايا قليلة التغصنات (Oligodendrocytes) المسؤلة عن بناء غمد النخاعين في الدماغ بتركيب كل من بروتين النخاعين القاعدي (Myelin Basic Protein, MBP)، بروتين النخاعين السكري (Myelin Oligodendrocytes Glycoprotein, MOG)، والبروتين السكري المرتبط بالنخاعين (Myelin Associated Glycoprotein, MAG)؛ فضلاً عن المكونات البروتينية المذكورة أعلاه، تحتوي مادة النخاعين على مكونات ليبيدية صرفة، منها: الكولسترول، والفوسفوليبيدات، والليبيدات السكرية [3-1]. تحوي الخلايا قليلة التغصنات أيضاً عدداً من الجزيئات الحيوية المهمّة كخميرة الكاربونيك أنهيدراز (Carbonic Anhydrase II, CAII). وتجدر الإشارة إلى أنَّ أي تغيير في بنية مادة النخاعين وتركيبها يؤدي إلى تظاهرات مرضية تتمثل بأعراض عصبية متنوعة من حيث الشدة والنوع [4-3] .

يؤدي الخلل في التعبير الجيني لمورثة البروتين الليبيدي عند الإنسان إلى ظهور أعراض داء بيليزاوس–ميرتزباخر (Pelizaeus -Merzbacher Disease, PMD) المصنف من بين الأمراض المرتبطة بحثل المادة البيضاء (Leukodystrophies)؛ إذ يعاني المصابون به من اضطرابات عضلية وعصبية ترتبط بخلل في بناء مادة النخاعين واستقلابها؛ مما ينعكس سلباً على الاستقرار البنيوي والتكامل الوظيفي لغمد النخاعين [4-6].وتتمثل هذه الأعراض بانخفاض عام في التوتر العضلي، ورأرأة تبدأان بصورة مبكرة في عمر الطفولة؛ فضلاً عن تراجع عام في القدرات والمهارات الحركية حسب درجة الإصابة، وقد تترافق هذه الأعراض مع نقص في القدرات الذهنية [5-7]. وتجدر الإشارة إلى وجود نوعين من هذا الداء؛ في حين يرتبط النوع الأول، وهو الأكثر ندرة، بالطفرة الموضعية لمورثة البروتبن الليبيدي؛ وبالتالي وجود بروتين ليبيدي طافر [8-12]، ولوحظ أن الأعراض في هذه الحالة تكون متوسطة الشدة، يُظهر النوع الثاني أعراضاً شديدة، ويكون بسبب تضاعفات في مورثة البروتين الليبيدي؛ مما يؤكد أهمية كبرى للكمية المعيارية لهذا البروتين في الجسم [13-15]. وتماشياً مع ذلك، تم تطوير نماذج حيوانية لكل نوع، حيث توجد الفئران جيمبي (Jimpy) الطافرة بالنسبة للبروتين الليبيدي، والفئران PLP الحاوية على كميات مضاعفة من البروتين الليبيدي [12-13].

في هذه الدراسة، تم تصحيح التعبير الجيني للبروتين الليبيدي؛ باستخدام تقنية تداخل الحمض النووي الريبي (RNA Interference) عبر تسلسلات متداخلة (short interfering RNA, siRNA) تطفئ تعبير مورثة ذلك البروتين، وذلك على سلالات الخلايا قليلة التغصنات الطبيعية والطافرة من النمط جيمبي [17]. وتم قياس استجابة هذه الخلايا للدي بيوتيريل أدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي (dbcAMP) الذي يُعَدُّ مؤشراً على التمايز المورفولوجي والوظيفي للخلايا قليلة التغصنات؛ وخاصةً قدرتها على إرسال الاستطالات المسؤولة عن تشكل

الأغماد [18-20] ودُرِسَت هذه الاستجابة من خلال التحليل الكمي لعدد من البروتينات المميزة للخلايا قليلة التغصنات [21].

مواد البحث

النماذج الحيوانية وتحضير السلالات الخلوية

للحصول على الفئران الشاهدة (Ta/Y) والطافرة جيمبي (Jimpy, Tajp/Y)، تم استيلاد أزواج طبيعية، وأخرى حاملة للطفرة في المختبر (حيث تم الحصول عليها من مختبرات INSERM من د.بومان ود.شابيل).

الخطوات المتبعة للحصول على سلالات الخلايا قليلة التغصنات الطبيعية (158N) والطافرة (158JP) هي حسب المرجع 16. لتحضير الزراعة الخلوية الأولية للخلايا الدبقية المختلطة تم الحصول على النسيج الدماغي من الفئران الطبيعية والطافرة حديثة الولادة، حيث تم فصل جزء من القشر الدماغي ميكانيكياً، وأُزيلت أغشية السحايا، ومُزِج النسيج الدماغي مع وسط الزراعة DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) المدَّعم بمصل البقر بتركيز 10٪ (لايف تكنولوجي، فرنسا)، وبالبنيسيلين بمقدار 50 وحدة بالمليليتر؛ فضلاً عن الستربتومايسين بمقدار 50 ميكروغرام بالمليليتر، وتمَّ توزيع الخلايا المعلقة على أطباق بتري (فالكون) مغلفة بمادة البولي لايزين بتركيز 20 ميكروغرام/المليليتر (سيغما، فرنسا) وحُضِنت في درجة حرارة 37 مئوية، ضمن جوٍّ حاوٍ على 5٪ ثاني أكسيد الكربون و95٪ هواء رطباً بنسبة 80٪. بعد مرور 12 يوماً، وتبعاً للخطوات المنشورة سابقاً [16]، وللحصول على الزراعة الخلوية الثانوية، تم جمع الخلايا قليلة التغصنات بالزُّراقة من السائل الطافي للزراعة، حيث تم نقل هذا السائل إلى أطباق بتري جديدة وحُضِن لمدة 15 دقيقة بوجود غاز ثاني أكسيد الكربون؛ للتخلص من أي تلوث خلوي، وتم تثفيله لمدة 10 دقائق بسرعة 900 دورة في الدقيقة ومدد الراسب الخلوي بالوسط DMEM المدّعم بمصل البقر 500 ميكروغرام/مليليتر،

والغلوكوز بتركيز 4.5 ميليغرام/مليليتر، والترانسفيرين بتركيز 10 ميكروغرام/مليليتر؛ فضلاً عن الأنسولين بتركيز 5 ميكروغرام/مليليتر، ووضعت على أطباق بتري مغلفة بمادة البولي لايزين، وحُضِنت بالشروط نفسها المذكورة أعلاه.

إخماد مورثة البروتين الليبيدي

تم تصميم تسلسل واصطناعه يستهدف الجزء التالي من الحمض الريبي المرسال للبروتين الليبيدي 5'-GCTCTCACTGGTACAGAAA-3' (كياجين-فرنسا) وحُضِنَ بتركيز مقداره 20 نانو مول لمدة 4 ساعات [22] بوجود مادة الليبوفيكتامين (Lipofectamine 2000) لتأمين إدخال الـsiRNA إلى داخل خلايا السلالات الخلوية العادية (158N) والطافرة (158JP).

الاستجابة للدي بيوتيريل أدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي

بعد القيام بالإخماد الجيني لمورثة البروتين الليبيدي، دُرِست استجابة الخلايا قليلة التغصنات من السلالتين للدي بوتيريل أدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي، حيث أضيف N^6, 2 -O-dibutyryladenosine 3 ,5 - cyclic monophosphate (dbcAMP) بتركيز 10 ميلي مول لمدة 72 ساعةP؛ وذلك وفقاً للطريقة المتبعة سابقاً [20-17]، ثم غُسِلَت وثُبِّتت باستخدام البارافورمألدهيد بتركيز 4٪ في محلول أملاح الفوسفات (PBS) ولمدة 30 دقيقة تمهيداً للكشف الكيميائي المناعي.

الكشف الكيميائي المناعي عن بروتينات النخاعين

بعد التثبيت، تمَّت معالجة الخلايا بمحلول حاصر (روش، فرنسا) بتركيز 3٪ في محلول أملاح الفوسفات (PBS) لمدة ساعة، متبوعة بثلاثة غسولات متتالية (عشر دقائق لكل غسول) في محلول أملاح الفوسفات. تمَّ بعدها حضن الخلايا مع محلول أجسام مضادة عديدة النسيلة للبروتين النخاعين القاعدي (MBP) التي تمَّ تحضيرها في المختبر بتركيز 1/1000 وللكاربونيك أنهيدراز (CAII) المستخدم سابقاً [23-25] بتركيز 1/1000 لمدة ساعتين في درجة حرارة الغرفة. تمَّ الكشف عن مواقع

الارتباط النوعي؛ باستخدام أجسام مضادة ثانوية عديدة النسيلة مرتبطة بالبيروكسيداز (سيغما، فرنسا)؛ وذلك بتركيز 1/5000 لمدة نصف ساعة. بهدف تحريض تفاعل البيروكسيداز، أُسْتُخدِم 100 ميكروليتر من محلول أملاح الفوسفات (10 ميلي مول، pH 6) الحاوي على مادة الفينيلينديامين (سيغما، فرنسا) بتركيز 0.25 ملغ/مل والماء الأكسجيني بتركيز 0.003%، ولإيقاف تفاعل البيروكسيداز، أُضيف 30 ميكروليتر من حمض كلور الماء 4 مولي.

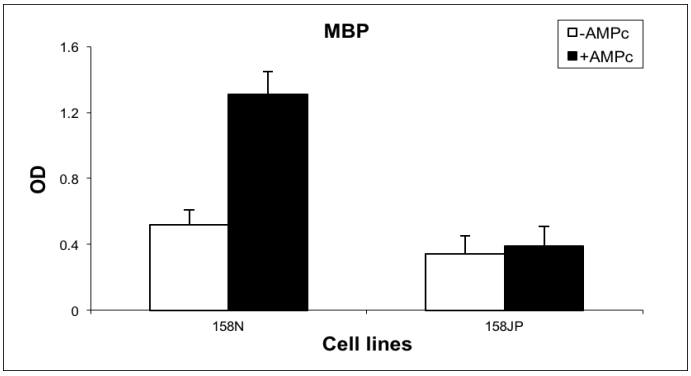
تمَّ قياس الكثافة الضوئية (Optical Density, OD) لناتج تفاعل البيروكسيداز على طول الموجة 492 نانومتر؛ باستخدام قارئ تيتيرتيك (Titertek Multiscan MCC microplate reader, Flow Laboratory). واستخدمت طريقة ANOVA (Analysis Of Variance) للدراسة الإحصائية المقارنة.

النتائج والمناقشة

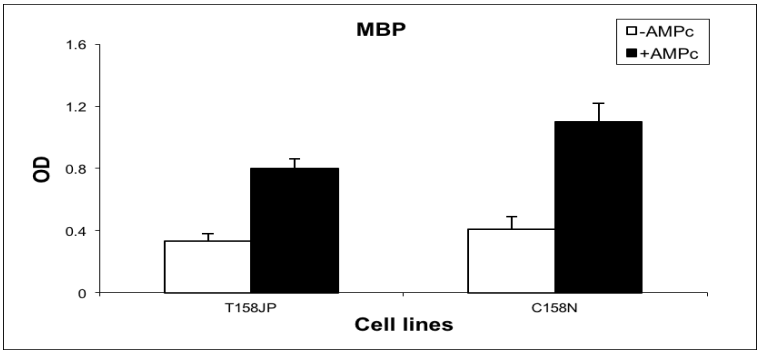
بعد تطبيق الإخماد الجيني بتقنية تداخل الحمض الريبي النووي على السلالات الخلوية، دُرِست الاستجابة الوظيفية للسلالة الطافرة (158JP) عن طريق قياس معايير داخل خلوية ووظيفية (MBP, CAII) بعد المعالجة بالدي بيوتيريل أدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي، وذلك بالمقارنة مع السلالة الطبيعية (158N).

يبين الشكل 1 استجابة كلا سلالتي الخلايا قليلة التغصنات 158JP و158N لتطبيق الدي بيوتيريل أدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي. حيث لوحظ ارتفاع واضح (**, $P<0.01$) في كميات بروتين النخاعين القاعدي في الخلايا 158N، وتغيب أي استجابة في سلالة الخلايا الطافرة 158JP تماشياً مع النتائج المعروفة والمنشورة سابقاً [17]. من جهة أخرى، في الشكل 2 ارتفعت قيم بروتين النخاعين القاعدي بعد المعالجة الجينية باستخدام تسلسلات تتداخل مع الحمض الريبي للبروتين الليبيدي الطافر PLP؛ لتصبح قريبة وبصورة ملموسة مع قيم السلالة غير الطافرة؛ وبالتالي تمَّ تصحيح استجابة سلالة الخلايا الطافرة بالتداخل الجيني (**, $P<0.01$).

بالإضافة لذلك، وللتأكد من عدم وجود أي تداخل بين تطبيق الإخماد الجيني وتعبير بروتين النخاعين القاعدي تمَّ اختبار التسلسلات المُخمِدة على السلالة الخلوية الطبيعية 158N فلم يُلاحظ أي تغيير في كميات البروتين المذكور، وذلك بعد التحريض بالدي بيوتيربل أدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي (الشكل 2 ,** ,$P<0.01$).



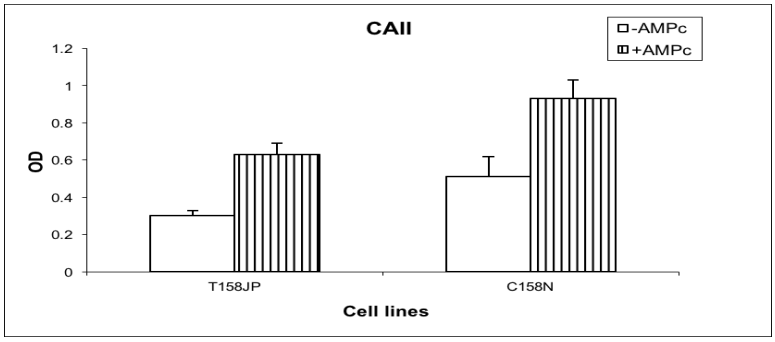
الشكل1: استجابة الخلايا قليلة التغصنات السليمة (158N)، والطافرة (158JP) لوجود dbcAMP (الأعمدة البيضاء، بدونdbcAMP ، والأعمدة السوداء بعد إضافة dbcAMP) من خلال قياس تركيز بروتين النخاعين القاعدي (MBP) ممثلاً بالكثافة الضوئية (OD).



الشكل 2: أثر التداخل الجيني باستخدام تسلسلاتsiRNA مُخَمِدة لمورثة البروتين الليبيدي على استجابة الخلايا قليلة التغصنات الطافرة (T158JP) والسليمة (C158N)، الأعمدة البيضاء، بدونdbcAMP ، والأعمدة السوداء بعد إضافة dbcAMP، وذلك من خلال قياس تركيز بروتين النخاعين القاعدي (MBP) ممثلاً بالكثافة الضوئية (OD).

أيضاً، تمَّ الحصول على النتائج نفسها من حيث تصحيح استجابة خلايا السلالة 158JP فيما يخص قيم خميرة الكاربونيك أنهيدراز (الشكل 3 و4). وتبلغ قيم الدراسة الإحصائية للسلالة الطبيعية قبل المعالجة (* ,$P<0.05$) وللسلالة الطافرة بعد المعالجة (** ,$P<0.01$) وللسلالة الطبيعية بعد المعالجة (* ,$P<0.05$).

الشكل 3: استجابة الخلايا قليلة التغصنات السليمة (158N)، والطافرة (158JP) لوجود dbcAMP (الأعمدة البيضاء، بدونdbcAMP ، والأعمدة المخططة بعد إضافة dbcAMP) من خلال قياس تركيز خميرة الكربونيك أنهيدراز (CAII) ممثلاً بالكثافة الضوئية (OD).



الشكل (4): أثر التداخل الجيني باستخدام تسلسلات siRNA مُخَمِدة لمورثة البروتين الليبيدي على استجابة الخلايا قليلة التغصنات الطافرة (T158JP) والسليمة (C158N)، الأعمدة البيضاء، بدونdbcAMP ، والأعمدة المخططة بعد إضافة dbcAMP، وذلك من خلال قياس تركيز خميرة الكربونيك أنهيدراز (CAII) ممثلاً بالكثافة الضوئية (OD).

هذه الدراسة هي الأولى من نوعها التي تثبت إمكانية استخدام تداخل الحمض الريبي النووي لخفض وإطفاء التعبير الجيني لمورثة البروتين الليبيدي الطافرة والمسؤولة عن اضطرابات حثل المادة البيضاء. حيث نتج عن عملية الإخماد استعادة لاستجابة الخلايا الطافرة بعد تطبيق الأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي الذي يُعَدُّ مسؤولاً عن التمايز الشكلي والوظيفي للخلايا المركبة لمادة النخاعين، وترتفع نسبه بصورة ملحوظة لدى

اتباع الخلايا الدبقية الطريق التمايزي الذي يزيد من تغصناتها واستطالاتها التي ستلتف لاحقاً حول محاوير الخلايا العصبية، وتؤمِّن العزل والحماية المطلوبة كأهم وظائف مادة النخاعين [17-20] . مع الأخذ بالحسبان أن تطبيق الإخماد على السلالات الخلوية الطبيعية لم يؤثر على استجابتها للأدينوزين أحادي الفوسفات الحلقي؛ مما يدل على تمكننا من استهداف النسخ الطافرة حصراً من هذا البروتين.

إن الطفرة الموضعية في المورثة المسؤولة عن تركيب البروتين الليبيدي PLP تؤدي لتركيب بروتين طافر بنسب متفاوتة؛ مما ينعكس على الأعراض التي تكون متدرجة الشدة حسب الحالة المرضية. فيما يخص الخلايا المستخدمة في هذه الدراسة، فلقد تمَّ الحصول عليها من النموذج الحيواني الفئران جيمبي، إن هذه الفئران تحمل كماً عالياً من البروتين الطافر والقليل من البروتين الطبيعي؛ مما يؤدي إلى موتها بصورة مبكرة بعد الولادة؛ وبالتالي فإن تصحيح مورثة البروتين الليبيدي الطافر يمكن أن يخفف من شدة الأعراض المرتبطة بزيادة كميات البروتين الطافر.

من التطبيقات المباشرة التي يمكن أن تتحقق استناداً إلى هذه الدراسة أن يتمَّ تطوير نظام إيصال (In vivo delivery system) فاعل وسهل الاستخدام على النماذج الحية للاضطرابات المزيلة للنخاعين، حيث يُعَدُّ ربط التسلسلات القصيرة المُخَمِّدة مع بروتين سكري لا ممرض مستخلص من جدار بعض الفيروسات حلاً لإيصال تلك التسلسلات لداخل الخلايا المستهدفة علاجياً عابراً بهذه الطريقة الحاجز الدماغي الدموي [26-29]. في هذه الحالة يُعَدُّ التطبيق على النماذج الحية ذا أهمية قصوى فيما يخص الطفرات الموضعية للبروتين الليبيدي، وأيضاً وبصورة مماثلة فيما يخص الطفرات الناجمة عن التضاعفات الوراثية التي تزيد من كميات البروتين الليبيدي، وتكون أعراضها غايةً في الشدة. أخيراً، تُعَدُّ هذه الاستراتيجية إلى جانب العلاج بالخلايا الجذعية المتمايزة لخلايا دبق عصبي متخصصة [30] من الطرق الواعدة للتغلب على أمراض حثل المادة البيضاء.

المراجع:

1-Nave K.A., 2014. Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. Annu Rev Cell Dev Biol. V.30, PP.503-533.

2-Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M.H., Vouyiouklis, D., Nave, K.A., 1998, Current concepts of PLP and its role in the nervous system. Microsc Research V.41, No.5, PP.344–358.

3-Adiele, R.C., Adiele, C.A., 2017. Metabolic defects in multiple sclerosis. Mitochondrion. V.17, PP.30057-0

4-Van der Knaap, M.S., Smit, L.M., Barth, P.G., Catsman-Berrevoets, C.E., Brouwer, O.F., Begeer, J.H., de Coo, I.F., Valk, J., 1997. Magnetic resonance imaging in classification of congenital muscular dystrophies with brain abnormalities. Ann Neurol. V42, No1, PP.50-9.

5-Xia.J., Wang, L., 2013. Pelizaeus-Merzbacher disease: Molecular diagnosis and therapy. Intractable & Rare Diseases Research. V.2, No.3, PP.103-105.

6-Garbern, J.Y., 2007. Pelizaeus-Merzbacher disease: Genetic and cellular pathogenesis. Cell Mol Life Sci., V.64, No.1, PP.50-65.

7-Groh, J., Friedman, H.C., Orel, N., Ip, C.W., Fischer, S., Spahn, I., Schäffner, E., Hörner, M., Stadler, D., Buttmann, M., Varallyay, C., Solymosi, L., Sendtner, M., Peterson, A.C., Martini, R.,2016. Pathogenic inflammation in the CNS of mice carrying human PLP1 mutations. Hum Mol Genet., V.25, No.21, PP.4686-4702

8-Griffiths, I., Klugmann, M., Anderson, T., Yool, D., Thomson, C., Schwab, M.H., Schneider, A., Zimmermann, F., McCulloch, M., Nadon, N., Nave, K.A., 1998. Axonal swellings and degeneration in mice lacking the major proteolipid of myelin. Science. V280, No.5369, PP.1610-3.

9-Gow, A., Southwood, C.M., Lazzarini, R.A., 1998. Disrupted proteolipid protein trafficking results in oligodendrocytes apoptosis in an animal model of Pelizaeus-Merzbacher disease. J Cell Biol V140, PP.925–934.

10-Dhaunchak, A.S., Colman, D.R., Nave, K.A., 2011. Misalignment of PLP/DM20 transmembrane domains determines protein misfolding in Pelizaeus-Merzbacher disease. J Neurosci. V.31, No.42, PP.14961-71

11-Karim, S.A., Barrie, J.A., McCulloch, M.C., Montague, P., Edgar, J.M., Iden, D.L., Anderson, T.J., Nave, K.A., Griffiths, I.R., McLaughlin, M., 2010. PLP/DM20 expression and turnover in a transgenic mouse model of Pelizaeus-Merzbacher disease. Glia., V.58, No.14, PP.1727-38

12-Schneider, A.M., Griffiths, I.R., Readhead, C., Nave, K.A., 1995. Dominant-negative action of the jimpy mutation in mice complemented with an autosomal transgene for myelin proteolipid protein. Proc Natl Acad Sci U S A., V.92, No.10, PP.4447-51.

13-Anderson, T.J., Schneider, A., Barrie, J.A., Klugmann, M., McCulloch, M.C., Kirkham, D., Kyriakides, E., Nave, K.A., Griffiths, I.R., 1998. Late-onset neurodegeneration in mice with increased dosage of the proteolipid protein gene. J Comp Neurol, V.394, PP.506–519.

14-Wolf, N.I., Sistermans, E.A., Cundall, M., Hobson, G.M., Davis-Williams, A.P., Palmer, R., Stubbs, P., Davies, S., Endziniene, M., Wu, Y., Chong, W.K., Malcolm, S., Surtees, R., Garbern, J.Y., Woodward, K.J., 2005. Three or more copies of the proteolipid protein gene *PLP1* cause severe Pelizaeus- Merzbacher disease. Brain. V128, PP.743-751.

15-Simons, M., Kramer, E.M., Macchi, P., Rathke-Hartlieb, S., Trotter, J., Nave, K.A., Schulz, J.B., 2002. Overexpression of the myelin

proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: implications for Pelizaeus-Merzbacher disease. J Cell Biol., V.157, No.2, PP.327-36.

16-Feutz, A.C., Bellomi, I., Allinquant, B., Schladenhaufen, Y., Ghandour, M.S., 1995. Isolation and characterization of defective jimpy oligodendrocytes in culture. J Neurocytol V.24, PP.865–877.

17-Feutz, A.C., Pham-Dinh, D., Allinquant, B., Ghandour, M.S., 2001. An Immortalized Jimpy Oligodendrocyte Cell Line: Defects in Cell Cycle and cAMP Pathway, GLIA, V. 34, PP. 241–252

18-Ghandour, M.S., Feutz, A.M., Jalabi, W., Taleb, O., Bessert, D., Cypher, M., Carlock, L., Skoff, R.P., 2002. Trafficking of PLP/DM20 and cAMP signaling in immortalized jimpy oligodendrocytes. GLIA, V.40, PP.300–311.

19-Raible, D.W., McMorris, F.A., 1993. Oligodendrocyte differentiation and progenitor cell proliferation are independently regulated by cyclic AMP. J Neurosci Res., V34, No.3, PP.287-94

20-Jensen, N.A., Smith, G.M., Garvey, J.S., Shine, H.D., Hood, L., 1993. Cyclic AMP has a differentiative effect on an immortalized oligodendrocyte cell line. J Neurosci Res V.35, PP.288–296

21-Bhat, N.R. 1995. Signal transduction mechanisms in glial cells. Dev Neurosci V.17, PP.267–284.

22-Ki, H.K., Park, D.Y., Lee, S.H., Kim, N.Y., Choi, B.M., Noh, G.J., 2010. The optimal concentration of siRNA for gene silencing in primary cultured astrocytes and microglial cells of rats. Korean J Anesthesiol., V. 59, No.6, PP. 403-410

23-Ghandour, M.S., Langley, O.K., Vincendon, G., Gombos, G., 1979. Double labeling immunohistochemical technique provides evidence of the specificity of glial cell markers. J Histochem Cytochem V.27, PP.1634 –1637.

24-Ghandour, M.S., Vincendon, G., Gombos, G., Limozin, N., Filippi, D., Dalmasso, C., Laurent, G., 1980. Carbonic anhydrase and oligodendroglia in developing rat cerebellum: a biochemical and immunohistochemical study. Dev Biol V.77, PP.73–83.

25-Ghandour, M.S., Langley, O.K., Zhu, X.L., Waheed, A., Sly, W.S., 1992. Carbonic anhydrase IV expression in brain capillary endothelial cells: a novel marker for blood brain barrier. Proc Natl Acad Sci USA V.89, PP.6823– 6827.

26-Zhao, T.Y., Zou, S.P., Alimova, Y.V., Wang, G., Hauser, K.F., Ghandour, M.S., Knapp, P.E., 2006. Short interfering RNA-induced gene silencing is transmitted between cells from the mammalian central nervous system. J Neurochem., V.98, No.5, PP.1541-50.

27-Kumar, P., Wu, H., McBride, J.L., Jung, K.E., Kim, M.H., Davidson, B.L., Lee, S.K., Shankar, P., Manjunath, N., 2007. Transvascular delivery of small interfering RNA to the central nervous system. Nature, V.448, No7149, PP.39-43.

28-Meade, B.R., Dowdy, S.F., 2007. Exogenous siRNA delivery using peptide transduction domains/cell penetrating peptides. Adv Drug Deliv Rev., V.59, No.2-3, PP.134-40.

29-Xia, C.F., Zhang, Y., Zhang, Y., Boado, R.J., Pardridge, W.M., 2007. Intravenous siRNA of brain cancer with receptor targeting and avidin-biotin technology. Pharm Res., V.24, No.12, PP.2309-16.

30-Osorio, M.J., Rowitch, D.H., Tesar, P., Wernig, M., Windrem, M.S., Goldman, S.A. 2017. Stem cell-based treatment of Pelizaeus Merzbacher disease Stem Cells. V.35, No2, PP. 311–315.