

# 生物信息法推算青光眼小鼠视乳头及视网膜功能变化

刘静坤<sup>1</sup>, 王霖邦<sup>2</sup>, 王兵<sup>3</sup>, 盛亚玲<sup>1</sup>, 贺静<sup>1</sup>, 梦粉鸽<sup>1</sup>

作者单位:<sup>1</sup>(710054) 中国陕西省西安市红会医院;<sup>2</sup>(400016) 中国重庆市, 重庆医科大学;<sup>3</sup>(710077) 中国陕西省西安市, 中国陕西省卫生监督所

作者简介:刘静坤, 毕业于西安交通大学, 硕士, 副主任医师, 研究方向:医学大数据挖掘及青光眼。

通讯作者:刘静坤. 1768697234@qq.com

收稿日期:2016-03-21 修回日期:2016-09-30

## Application of mathematical algorithm for calculating changes of optic and retina function in mice model of glaucoma

Jing-Kun Liu<sup>1</sup>, Lin-Bang Wang<sup>2</sup>, Bing Wang<sup>3</sup>, Ya-Ling Sheng<sup>1</sup>, Jing He<sup>1</sup>, Fen-Ge Meng<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Ophthalmology, Xi'an Honghui Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China; <sup>2</sup>Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; <sup>3</sup>Department of the Laboratory, Shaanxi Province Health Inspection Institution, Xi'an 710077, Shaanxi Province, China

**Correspondence to:** Jing-Kun Liu. Department of Ophthalmology, Xi'an Honghui Hospital, Xi'an 710054, Shaanxi Province, China. 1768697234@qq.com

Received:2016-03-21 Accepted:2016-09-30

## Abstract

• **AIM:** To be one of the primary cause injury to multiple sites of ocular of glaucoma which affects over 70 million people worldwide. We applied data mining techniques, linear and the matrix operations, efficiently calculated the network and estimated the possible function of the "node" genes of the retina and optic of glaucoma, in order to provide new thought and method on the pathogenesis of glaucoma.

• **METHODS:** The data in this study is from Gene Expression Omnibus (GEO) which belong to Nation Center for Biotechnology Information (NCBI), the quality of the raw data CEL files was processed and analyzed by the Expression software which belong to Affymetrix Inc., Santa Clare, CA, USA. Significant analysis method (SAM) which base on the T test was used to identified the significant genes. Based on GRNInfer and Gvedit soft we set up gene networks of optic and retina of mice and further more enriched analysis which based on DAVID and MAS3.0 online software were processed.

• **RESULTS:** The analysis between the group of the optic nerve heads and retinas in different stage of glaucoma showed that the amount of significant different expressed genes in the optic never head group increased

significantly comparing with the group of retina in the early stage of glaucoma, the analysis of the genes network construction show that: the node genes of optic nerve heads included Unc13c, Kif5a, TRPM1, PANX; and the node genes of retina include POU4F1, NEFL, BC03870, CALB2. Metabolic pathways enrichment analysis which based on MAS3.0 online platform show that there was mainly the amyotrophic lateral sclerosis, tyrosine metabolism, melanogenesis, Nitrogen metabolism, Gap junction, Leukocyte transendothelial migration metabolism pathway enriched out in optic nerve head; and there was mainly amyotrophic lateral sclerosis, neurodegenerative disorders, prostate cancer, leukocyte transendothelial migration metabolism pathway enriched out in retina.

• **CONCLUSION:** By understanding bioinformatics result, it seems optic were more sensitive than the retina to high intraocular pressure, and weather high expression of TYrp1 gene can be as a sensitive diagnostic item require more evidence back up. Functional enrich analysis of node gene showed that cytoskeleton reconstructed, molecular motor and nutrients transport function improve in optic; and in retina, the most prominent finding in retina was enrichment function modules were focus on regeneration, repairing and differentiation of cells, which remind that we should reinforce research on reparation of retina of primary glaucoma. Metabolic pathways enrichment analysis show that inflammatory response plays prominent place in optic and retina of primary glaucoma, because of the optic narrow and crowed anatomic shape, nutrient metabolism and substances transfer enrichment modules play an important role in optics of primary glaucoma.

• **KEYWORDS:** glaucoma; biological computing; signaling pathway; biomarker

**Citation:** Liu JK, Wang LB, Wang B, *et al.* Application of mathematical algorithm for calculating changes of optic and retina function in mice model of glaucoma. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2016;16(11):2014-2018

## 摘要

**目的:**本研究运用生物信息学软件,利用数据库资料,推测青光眼早期小鼠视乳头及视网膜可能的信号路径及基因生物功能模块,为研究青光眼发病机制提供新的途径。**方法:**本研究的数据是从美国生物技术信息中心 GEO 基因表达数据库获得。利用美国昂飞公司 Expression Console 软件对原始的 CEL 数据进行标准化及对数化转换处理。利用以 *t* 检验为基础的基因表达差异显著性分析方法 SAM 对基因芯片数据进行显著性差异分析,分析

后筛选显著性差异表达基因,采用 GNRInfer 软件构建了小鼠视乳头及视网膜前 50 个有显著差异表达基因的调控网络,同时我们利用 MAS3.0 分子注释系统软件及 DAVID 软件这两种在线分析平台中进一步富集基因信号通路。

**结果:**青光眼各组视乳头和视网膜及其相对应组的显著性差异基因分析表明,在青光眼早期视乳头组及视网膜组较之正常组相比视乳头组显著性差异基因数量明显增多,青光眼视乳头及视网膜网络构建显示,视乳头基因网络中主要调控节点基因包括 Unc13c、Kif5a、TRPM1、PANX;视网膜基因网络中主要调控节点基因包括 POU4F1、NEFL、BC03870、CALB2。MAS 在线信号通路分析显示,视乳头组织中主要的信号代谢通路包括肌萎缩侧索硬化代谢通路、神经退行性紊乱、白细胞穿内皮性迁移及前列腺癌信号通路。视网膜组织主要代谢通路包括肌萎缩侧索硬化代谢、酪氨酸代谢、黑色素生成、氮代谢、缝隙连接、白细胞穿内皮迁移。

**结论:**早期青光眼阶段视乳头较视网膜对眼压更为敏感,特别是 *Tyrrp1* 基因在早期高眼压的表达能否作为青光眼早期生物学指标有待进一步探讨。在青光眼高眼压压力下,节点分子生物学功能显示在视乳头组织中,细胞骨架的重排、生物驱动马达动力、物质代谢及运输力均为增强;而在视网膜组织中,最突出的表现在细胞的再生、分化及修复作用,此结果提示我们在青光眼的研究中应重视哺乳动物视网膜损伤后自身修复的研究。代谢通路富集分析显示,炎症反应在视乳头及视网膜的病理反应中均起到非常重要的作用,而在视乳头中由于其狭窄而拥挤的解剖结构在青光眼发病中存在营养代谢及物质转运障碍。

**关键词:**青光眼;生物计算;信号通路;生物标记  
DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2016.11.08

**引用:**刘静坤,王霖邦,王兵,等.生物信息法推算青光眼小鼠视乳头及视网膜功能变化.国际眼科杂志 2016;16(11):2014-2018

## 0 引言

青光眼可引起眼部多部位损伤,是眼科常见的退行性病变,全世界约有 7 亿患病人群,高眼压是引起青光眼患者眼部损伤的重要因素,但目前降低眼压治疗并不是总是有效,且有很多毒副作用,因此为改善治疗效果,研究青光眼病理生理学分子生物学机制有重要意义。青光眼属于多基因致病及环境因素致病性疾病,在高眼压作用下视网膜组织与对照组织基因芯片显著性差异表达基因数量较多,如何确定重要的节点基因还有很多新的思路及方法有待探索。目前对青光眼早期致病性基因研究相对较少。为进一步探究早期青光眼发病机制,我们挖掘 NCBI 中 GEO 数据库数据,运用生物信息学方法构建并推算早期青光眼视网膜及视乳头可能发生信号通路及代谢的改变,并进一步运用线性代数法构建视网膜及视乳头基因调控网络,推算基因节点基因在相应组织的功能。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 本研究数据来源于美国生物技术信息中心(Nation Center for Biotechnology Information,NCBI)的 GEO (Gene Expression Omnibus) 数据库,数据样本号为

表 1 青光眼各组视网膜与对照组显著高表达基因数目及功能富集模块数目

组别	显著高表达基因数目		功能富集模块数目	
	视乳头	视网膜	视乳头	视网膜
青光眼 1 组	19	2	3	0
青光眼 2 组	20	2	2	0
青光眼 3 组	20	3	3	0
青光眼 4 组	174	142	55	42

GSE26299 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE26299>)。我们选取了样本中的 100 个基因芯片数据。样本分组定义:对照组;青光眼 1 组,无青光眼症状第一阶段(NO1);青光眼 2 组,无青光眼症状第二阶段(NO2);青光眼 3 组,出现中度青光眼症状(MOD);青光眼 4 组,出现重度青光眼症状(SEV)。样本分组:对照组中视乳头组及视网膜组各 10 眼;青光眼 1 组,视乳头组及视网膜组各 10 眼;青光眼 2 组,视乳头组及视网膜组各 10 眼;青光眼 3 组,视乳头组及视网膜组各 10 眼;青光眼 4 组,视乳头组及视网膜组各 10 眼。

## 1.2 方法

**1.2.1 原始数据处理** 原始数据均为 CEL 格式,原始数据的处理采用美国昂飞公司 Expression Console 软件对原始数据进行标准化及对数化转换处理。

**1.2.2 基因芯片显著性差异表达分析** 基因表达差异显著性分析方法(significance analysis of microarray,SAM)是一种对基因芯片数据进行显著性差异分析的方法,该方法是一种以 *t* 检验为基础的统计学分析,本研究中 SAM 分析是采用 TM4 软件的子软件 MuliExperiment (MeV) 的 SAM 分析功能。本研究中,分别对比视乳头及视网膜组中 D2-Glaucoma 与相应的 NOE1 组、NOE2 组、MOD 组及 SEV 组。

**1.2.3 基因调控网络构建** 基因调控网络属于系统生物学的研究范畴,使用 GNRInfer 软件是在线性代数基础上推算基因间相互关系的工具软件,结合 GVedit (<http://www.graphviz.org>) 画图软件可将以基因表达数值矩阵转化为基因间相互作用的可视化图像。GNRInfer<sup>[1]</sup> 中等式 (1) 代表一组数据所有的可能网络。

$$J = (A^T - A) U^{-1} V^T + YV = J + YV^T \quad (1)$$

**1.2.4 DAVID 聚类分析** DAVID(Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery) (<http://www.david.niaid.nih.gov>) 由数据分析软件及生物学数据库构成,用数学算法从大量生物信息中挖掘有用的生物信息,并进一步对基因的功能进行注释、富集及功能聚类<sup>[2-3]</sup>。

**1.2.5 分子注释系统 3.0 (MAS 3.0)** 分子注释系统 MAS3.0 (Molecule Annotation System 3.0) 是对高通量基因芯片提供基因功能注释及富集分析的免费在线分析平台。MAS3.0 在线分析平台将 Genebank 等生物数据库信息通过富集分析提供给研究者基因本体注释、信号通路等知识。本研究应用 MAS3.0 系统分别富集视乳头及视网膜显著差异高表达基因信号通路富集图。

## 2 结果

**2.1 青光眼各组视乳头及视网膜与其相应对照组的 SAM 分析** 分析表明,在青光眼视乳头组 4 组高表达基因分别有 19、20、20 和 174 个,而视网膜组高表达基因数分别为 2、2、3 和 142 个(表 1)。其中视乳头组青光眼 1 组中

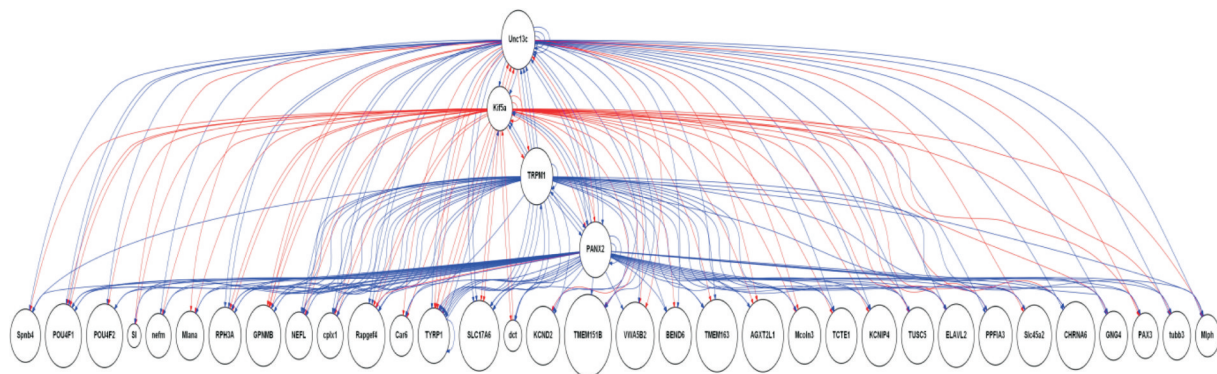


图1 视乳头显著高表达基因网络(图中圆圈的内容均为基因的名称,蓝色线条及箭头均表示上游基因对下游基因的减弱作用,红色线条及箭头均表示上游基因对下游基因的加强作用)。

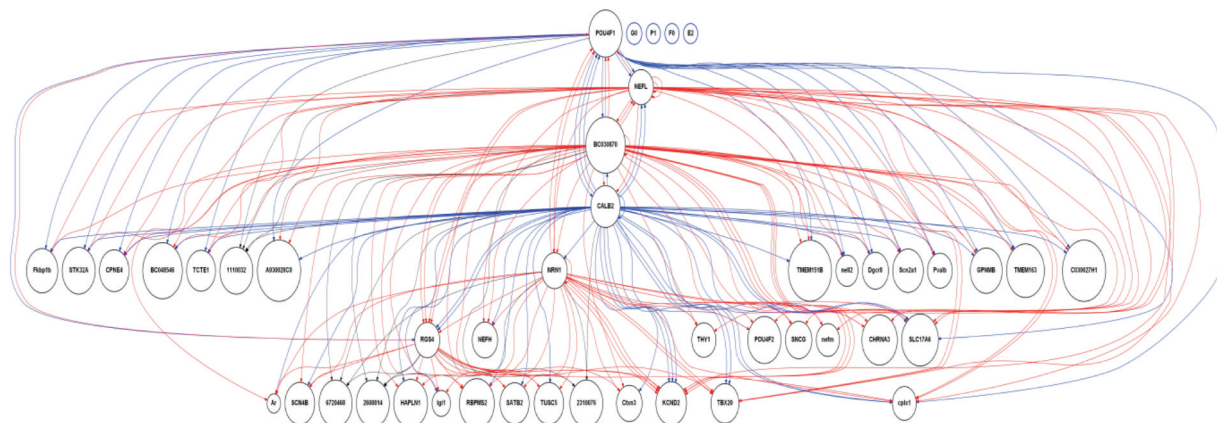


图2 视网膜显著高表达基因网络(图中圆圈的内容均为基因的名称,蓝色线条及箭头均表示上游基因对下游基因的减弱作用,红色线条及箭头均表示上游基因对下游基因的加强作用)。

DAVID 富集功能模块包括:膜结合、黑色素代谢、信号传递、转录调节;2组中 DAVID 富集功能模块包括膜结合、黑色素代谢模块;3组中 DAVID 富集功能模块包括膜结合、信号传递及分泌、转录调节;4组中 DAVID 富集功能模块则富集出 55 个功能模块。视网膜组青光眼 1、2、3 组中均未富集出 DAVID 功能模块;4组中则富集出 42 个功能模块。

**2.2 视乳头和视网膜显著高差异表达基因网络构建** 本研究分别应用线性代数方法将纵轴为基因序列号、横轴为时间轴显著高表达基因矩阵转化为基因相互作用网络,网络中每个基因均有其上游基因及下游基因,基因间相互关系分为加强或减弱,其中红线及箭头表示加强作用,蓝线及箭头表示减弱作用。图1为视乳头显著高表达基因网络,图2为视网膜显著高表达基因网络。视乳头基因网络中主要调控节点基因包括 Unc13c、Kif5a、TRPM1、PANX2,视网膜基因网络中主要调控节点基因包括 POU4F1、NEFL、BC03870、CALB2。

**2.3 MAS3.0 富集结果** 结果显示,视乳头组织中主要的信号代谢通路网络如图3,主要代谢通路包括肌萎缩侧索硬化代谢、酪氨酸代谢、黑色素生成、氮代谢、缝隙连接、白细胞穿内皮迁移;视网膜组织中主要代谢通路网络如图4,主要的信号代谢通路包括肌萎缩侧索硬化代谢通路、神经退行性紊乱、白细胞穿内皮性迁移及前列腺癌信号通路。

### 3 讨论

既往研究显示,病理性高血压小鼠模型可发生视网膜神经节细胞的凋亡、视乳头杯盘比的增大及视神经纤维束

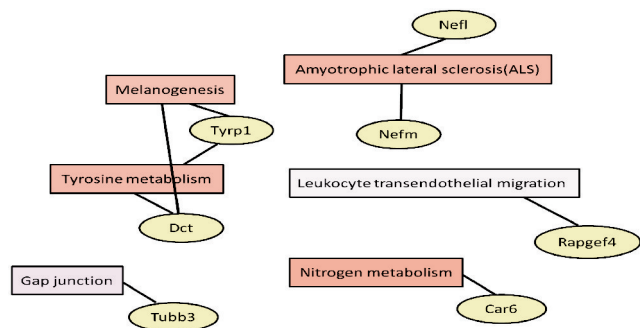


图3 视乳头显著高表达基因网络信号通路网络图(图中矩形内容为所富集的信号通路,红色的深度代表富集值的强度,颜色越深,富集值越高,黄色椭圆内容代表基因名称; Amyotrophic lateral sclerosis: ALS, 肌萎缩侧索硬化信号通路; Tyrosine metabolism: 酪氨酸代谢信号通路; Melanogenesis: 黑色素代谢信号通路; Nitrogen metabolism: 氮代谢信号通路; Gap junction: 缝隙连接信号通路; Leukocyte transendothelial migration: 白细胞游走迁移信号通路)。

肿胀断裂<sup>[4]</sup>等病理性病变,但早期青光眼视网膜及视乳头病理生理学发病机制及其基因网络构建的研究较为缺乏,为探索其发病机制,我们挖掘了 GEO 数据库并利用线性代数软件进一步推算其数据中所蕴含的生物学信息。

早期青光眼视网膜及视乳头显著差异基因分析表明,视乳头组在青光眼早期及中期即青光眼1组、2组及3组显著增高基因数目较视网膜明显增多,富集青光眼1组中 19 个基因我们发现了 3 个基因功能模块,主要包括细胞膜结合功能、色素代谢模块、转录功能,以上结果表明在早

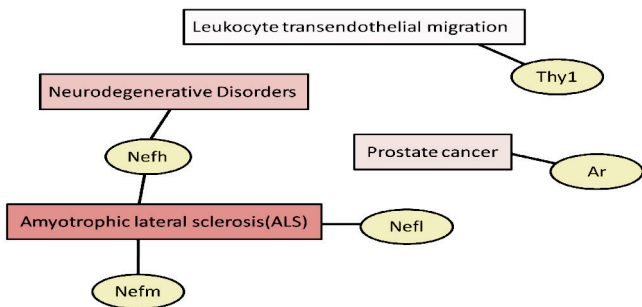


图4 视乳头显著高表达基因网络信号通路网络图(图中矩形内容为所富集的信号通路,红色的深度代表富集值的强度,颜色越深,富集值越高,黄色椭圆内容代表基因名称; Amyotrophic lateral sclerosis: ALS, 肌萎缩侧索硬化信号通路; Neurodegenerative Disorders: 神经退行性信号通路; Prostate cancer: 前列腺癌信号通路; Leukocyte transendothelial migration: 白细胞游走迁移信号通路)。

期青光眼阶段视乳头较视网膜对眼压更为敏感。从解剖学原因分析,视乳头的组织或细胞及视网膜动、静脉受到压力后可以缓冲的外界环境较视网膜所处的环境相比较受限,视乳头不仅受到机械压力,同时高眼压对动静脉的压力可造成视乳头组织及细胞的缺血缺氧等反应,这些原因均可对早期青光眼小鼠视乳头基因的表达产生影响。

青光眼其本质是一种神经退行性疾病,病理性眼压升高被认为是青光眼疾病发生的重要危险因素。视乳头组及视网膜组相应组别中高表达差异基因的富集结果显示,在青光眼早期,这些基因对压力较为敏感,对抵御损伤较为重要。既往研究显示,青光眼组织的损伤可导致一系列的信号传导通路障碍,包括线粒体功能异常、蛋白水解级联反应、内质网压力及氧化应激等,但我们的研究却推测视乳头在青光眼早期高表达基因主要加强了基因转录、黑色素代谢、信号传递、膜结合信号传递功能,这些功能常出现在急性的各种炎症、机械等压力下<sup>[5]</sup>。黑色素代谢模块中的酪氨酸酶相关蛋白1(Tyrap)控制黑色素生物合成链的远端反应,在早期高血压视乳头中Tyrap基因的高表达能否作为青光眼损伤的早期敏感性指标之一有待于进一步研究。

构建基因网络并推算基因间的相互作用方式是近年来系统生物学的研究热点之一。各种生物分子及其相互作用可被简化为一个基因网络。通过基因芯片的矩阵数据,应用线性代数计算出网络拓扑结构图,从而揭示基因间复杂的作用机制,并推测相关基因功能。随着高通量基因检测技术发展,网络构建成为从生物系统学层次上研究基因的功能提供有效的手段,并依次可识别节点“hub”基因。同时可以通过“连坐法”(guilt-by-association, GBA)来发现新的基因功能<sup>[6]</sup>,另外越来越多的证据表明表型是由基因社团(community)来决定,社团间基因相互作用可提供更多的生物表型方式<sup>[7]</sup>,因此基因的网络构建为从系统层次揭示生命本质提供新的机遇。

本研究所构建青光眼视乳头基因网络中的节点基因包括Unc13c、Kif5a、TRPM1、PANX2。研究认为Munc13对神经元发育来说甚至必不可少<sup>[8]</sup>,并参与了神经的可塑性过程,与细胞骨架的重排有关<sup>[9]</sup>。能高效地将三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)结合以及水解产生的化学能转化为机械能<sup>[10]</sup>,同时携带着“货物”沿着微管定向移动<sup>[11-13]</sup>。TRPM1属瞬时受体电位离子通道(transient

receptor potential channels, TRP channels)。维持细胞内外环境的离子稳态等众多生命活动<sup>[14-17]</sup>。PANX2属于Pannexin蛋白,是缝隙连接通道的亚单位,可传递突触的传递<sup>[18-19]</sup>、ATP的释放<sup>[20]</sup>、金属离子的传递<sup>[21]</sup>和感觉信号的传导<sup>[22]</sup>。从以上生物信息学结果可推测,视乳头在青光眼的机械压力下,筛板各层的物理压力可引起相应基因的表达增高,并进一步加强视乳头组织中细胞骨架的重排、生物驱动马达的动力增强、ATP、离子通道等运输的加强以及囊泡运输的增强,这些分子标志为青光眼的诊断、治疗及防治提供新思路。

而在视网膜中的节点基因中,Pou4f1属于第四类POU结构域(POU4),它们对各种感觉神经系统的发育及神经元的分化方向选择中起着重要作用<sup>[23-29]</sup>。研究发现属于POU结构域转录因子家族成员Bm3在维持RGC亚型多样性中所发挥着独特作用<sup>[30]</sup>。神经丝轻链多肽(neurofilament light polypeptide, NEFL)在多种神经系统炎症和非炎症性神经系统疾病均有不同程度增高,对维持神经是细胞骨架的关键成分,在维持神经细胞形态及使髓鞘的轴突再生方面有重要的作用<sup>[31-34]</sup>。钙视膜蛋白(Calretinin)又称CALB2。当细胞受到外界刺激可使细胞质内Ca<sup>2+</sup>浓度增加时,CaBP即与Ca<sup>2+</sup>结合,随即与相应靶蛋白结合发挥生物学效应钙结合蛋白(CaBP),在细胞内激活酶或蛋白质,参与调节细胞的功能代谢,同时在细胞核内对细胞分化、发育、增殖、坏死和凋亡等功能也起重要作用<sup>[35-37]</sup>。Neuritin(Nrn1)基因是1996年Nedivi等通过大鼠光刺激诱导实验,在视皮质中首次发现并报道的可塑性相关候选基因15(CPG15)。在神经系统受损后发挥重要的再生修复作用<sup>[38-39]</sup>。以往的研究显示哺乳动物视网膜组织的再生能力非常有限,但我们的研究显示视网膜受到高血压后,节点基因功能富集均与视网膜的再生有关,提示我们应重视哺乳动物视网膜修复功能的研究。

MAS3.0视乳头及视网膜差异表达基因中富集网络信号通路图3和4发现均存在肌萎缩硬化代谢通路(ASL)的改变,目前ASL的发病主要以基因突变学说为主,ASL主要侵犯脊髓前角细胞、脑干运动神经元及锥体束,但视网膜属感觉神经末梢,强烈的富集值进一步证明相同的基因群在不同的发病部位可引起不同的疾病,疾病致病原因可由基因突变引起,也可与基因数量表达调控有关。视乳头及视网膜也共同富集出白细胞内皮迁移,说明炎症性反应在青光眼病理生理发病进程中起到非常重要的作用。而视乳头独有缝隙连接通路、酪氨酸代谢、黑色素生成、氮代谢,说明视乳头代谢特点上存在营养代谢及物质转运困难的视乳头狭窄而拥挤的解剖结构及高血压下组织水肿压迫血管,更进一步加重局部的血供及营养物质的供应。

综上所述,通过生物信息学推算,我们发现早期青光眼阶段视乳头较视网膜对眼压更为敏感,特别是Tyrap基因在早期高血压的表达能否作为青光眼早期生物学指标有待进一步探索。在青光眼高血压压力下,节点分子生物学功能显示,在视乳头组织中,细胞骨架的重排、生物驱动马达动力、物质代谢及运输力均为增强;而在视网膜组织中,最突出的表现为细胞的再生、分化及修复作用,此结果提示我们在青光眼的研究中应重视哺乳动物视网膜损伤后自身修复的研究。在一定的病理条件下必定是一些特定的基因团而不是单个基因发生了调节(表达增高或表达减弱),利用生物信息学方法富集出这些基因团的功能

模块、代谢通路,可科学地、全面掌握病理条件下基因表达高低所调节的功能改变的方向,例如本研究发现在小鼠眼压升高时节点基因功能模块主要表现为视网膜的再生模块,那么进一步对这些节点基因研究,就可对视网膜再生机制、视网膜保护机制、抗青光眼药物及视网膜再生性研究提供基础。代谢通路富集分析显示炎症反应在视乳头及视网膜的病理反应中均起到非常重要的作用,而在视乳头中由于其狭窄而拥挤的解剖结构在青光眼发病中存在营养代谢及物质转运障碍,这些结论与既往研究及视网膜及视乳头的解剖结构的一致性证明,再次证明生物信息学研究的可行性。

#### 参考文献

1 Wang Y, Joshi T, Zhang XS, *et al.* Inferring gene regulatory networks from multiple microarray datasets. *Bioinformatics* 2006;22(19):2413-2420  
2 Dennis G Jr, Sherman BT, Hosack DA, *et al.* DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol* 2003;4(5):3  
3 Huang DW, Sherman BT, Tan Q, *et al.* The DAVID Gene Functional Classification Tool: a novel biological module-centric algorithm to functionally analyze large gene lists. *Genome Biol* 2007;8(9):R183  
4 Gross RL, Ji J, Chang P, *et al.* A mouse model of elevated intraocular pressure: retina and optic nerve findings. *Trans Am Ophthalmol Soc* 2003;101:163-171  
5 Liu J, Wang B, Wang W, *et al.* Computational networks of activating transcription factor 3 gene in Huh7 cell lines and hepatitis C virus-infected Huh7 cell lines. *Mol Med Rep* 2015;12(1):1239-1246  
6 Gillis J, Pavlidis P. "Guilt by association" is the exception rather than the rule in gene networks. *PLoS Comput Biol* 2012;8(3):e1002444  
7 Lee I, Lehner B, Crombie C, *et al.* A single gene network accurately predicts phenotypic effects of gene perturbation in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Genet* 2008;40(2):181-188  
8 Ashery U, Varoqueaux F, Voets T, *et al.* Munc13-1 acts as a priming factor for large dense-core vesicles in bovine chromaffin cells. *EMBO J* 2000;19(14):3586-3596  
9 Rosenmund C, Sigler A, Augustin I, *et al.* Differential control of vesicle priming and short-term plasticity by Munc13 isoforms. *Neuron* 2002;33(3):411-424  
10 Rice S, Lin AW, Safer D, *et al.* A structural change in the kinesin motor protein that drives motility. *Nature* 1999;402(6763):778-784  
11 Svoboda K, Schmidt CF, Schnapp BJ, *et al.* Direct observation of kinesin stepping by optical trapping interferometry. *Nature* 1993;365(6448):721-727  
12 Vale RD. The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell* 2003;112(4):467-480  
13 Hirokawa N, Nitta R, Okada Y. The mechanisms of kinesin motor motility: lessons from the monomeric motor KIF1A. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009;10(12):877-884  
14 Clapham DE. TRP channels as cellular sensors. *Nature* 2003;426(6966):517-524  
15 Huang CL. The transient receptor potential superfamily of ion channels. *J Am Soc Nephrol* 2004;15(7):1690-1699  
16 Clapham DE, Julius D, Montell C, *et al.* International Union of Pharmacology. XLIX. Nomenclature and structure-function relationships of transient receptor potential channels. *Pharmacol Rev* 2005;57(4):427-450  
17 Ramsey IS, Delling M, Clapham DE. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol* 2006;68:619-647  
18 Zoidl G, Kremer M, Zoidl C, *et al.* Molecular diversity of connexin and pannexin genes in the retina of the zebrafish *Danio rerio*. *Cell Commun Adhes* 2008;15(1):169-183  
19 Thompson RJ, Jackson MF, Olah ME, *et al.* Activation of pannexin-1 hemichannels augments aberrant bursting in the hippocampus. *Science* 2008;322(5907):1555-1559

20 Ellsworth ML, Forrester T, Ellis CG, *et al.* The erythrocyte as a regulator of vascular tone. *Am J Physiol* 1995;269(6Pt2):H2155-2161  
21 Bunse S, Schmidt M, Hoffmann S, *et al.* Single cysteines in the extracellular and transmembrane regions modulate pannexin 1 channel function. *J Membr Biol* 2011;244(1):21-33  
22 Huang YA, Roper SD. Intracellular Ca<sup>2+</sup> and TRPM5-mediated membrane depolarization produce ATP secretion from taste receptor cells. *J Physiol* 2010;588(Pt13):2343-2350  
23 Andersen B, Rosenfeld MG. POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr Rev* 2001;22(1):2-35  
24 Gerrero MR, McEvilly RJ, Turner E, *et al.* Brn-3.0: a POU-domain protein expressed in the sensory, immune, and endocrine systems that functions on elements distinct from known octamer motifs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1993;90(22):10841-10845  
25 Ninkina NN, Stevens GE, Wood JN, *et al.* A novel Brn3-like POU transcription factor expressed in subsets of rat sensory and spinal cord neurons. *Nucleic Acids Res* 1993;21(14):3175-3182  
26 Turner EE, Jenne KJ, Rosenfeld MG. Brn-3.2: a Brn-3-related transcription factor with distinctive central nervous system expression and regulation by retinoic acid. *Neuron* 1994;12(1):205-218  
27 Xiang M, Zhou L, Macke JP, *et al.* The Brn-3 family of POU-domain factors: primary structure, binding specificity, and expression in subsets of retinal ganglion cells and somatosensory neurons. *J Neurosci* 1995;15(7Pt1):4762-4785  
28 Xiang M, Gan L, Li D, *et al.* Role of the Brn-3 family of POU-domain genes in the development of the auditory/vestibular, somatosensory, and visual systems. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1997;62:325-336  
29 Xiang M. Requirement for Brn-3b in early differentiation of postmitotic retinal ganglion cell precursors. *Dev Biol* 1998;197(2):155-169  
30 Loscher CJ, Hokamp K, Kenna PF, *et al.* Altered retinal microRNA expression profile in a mouse model of retinitis pigmentosa. *Genome Biol* 2007;8(11):R248  
31 Filali M, Dequen F, Lalonde R, *et al.* Sensorimotor and cognitive function of a NEFL (P22S) mutant model of Charcot-Marie-Tooth disease type 2E. *Behav Brain Res* 2011;219(2):175-180  
32 Koutsis G, Pandraud A, Karadima G, *et al.* Floroskufi P, Wood NW, Houlden H; Mutational analysis of PMP22, EGR2, LITAF and NEFL in Greek Charcot-Marie-Tooth type 1 patients. *Clin Genet* 2013;83(4):388-391  
33 Yum SW, Zhang J, Mo K, *et al.* A novel recessive Nefl mutation causes a severe, early-onset axonal neuropathy. *Ann Neurol* 2009;66(6):759-770  
34 Bhagavati S, Maccabee PJ, Xu W. The neurofilament light chain gene (NEFL) mutation Pro22Ser can be associated with mixed axonal and demyelinating neuropathy. *J Clin Neurosci* 2009;16(6):830-831  
35 Augusto D, Leteurtre E, De La Taille A, *et al.* Calretinin: a valuable marker of normal and neoplastic Leydig cells of the testis. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10(2):159-162  
36 Lugli A, Forster Y, Haas P, *et al.* Calretinin expression in human normal and neoplastic tissues: a tissue microarray analysis on 5233 tissue samples. *Hum Pathol* 2003;34(10):994-1000  
37 Bar-Shira Maymon B, Yavetz H, Yogev L, *et al.* Detection of calretinin expression in abnormal immature Sertoli cells in non-obstructive azoospermia. *Acta Histochem* 2005;107(2):105-112  
38 Naeve GS, Ramakrishnan M, Kramer R, *et al.* a gene induced by neural activity and neurotrophins that promotes neurogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94(6):2648-2653  
39 Pahnke J, Mix E, Knoblich R, *et al.* Overexpression of glial cell line-derived neurotrophic factor induces genes regulating migration and differentiation of neuronal progenitor cells. *Exp Cell Res* 2004;297(2):484-494