



دانشکده: علوم زیستی

رساله دکتری رشته: زیست شناسی گرایش: ژنتیک

عنوان رساله:

بررسی تغییرات ترانسکریپتوم در سلول های اولیه شبکه ترابکولار انسانی در اثر سرکوب بیان فاکتورهای

رونویسی PITX2 و FOXC1

نام دانشجو:

سید حسن پای لاهی

استاد راهنما:

الهه الهی

استاد مشاور:

مجید صادقی زاده

دی ۱۳۸۹

فهرست مطالب

صفحه	عنوان
۱	۱-۱- گلوکوم
۱	۱-۱-۱- تاریخچه گلوکوم
۱	۱-۱-۲- تعریف گلوکوم
۲	شکل ۱-۱
۳	۲-۱- چشم، آناتومی و فیزیولوژی آن
۳	۱-۲-۱- مایع زلالیه
۴	۲-۲-۱- دینامیک جریان مایع زلالیه در چشم
۵	شکل ۲-۱
۵	شکل ۳-۱
	۳-۲-۱- فشار داخل چشم (IOP)
۶	۴-۲-۱- شبکه ی ترابکولار
۶	۵-۲-۱- آناتومی و سازمان یابی بافت شبکه ی ترابکولار
۷	شکل ۴-۱
۸	۶-۲-۱- ویژگیهای عملکردی سلول های بافت TM
۹	۷-۲-۱- مکانیسم های نفوذ پذیری بافت TM
۱۰	۸-۲-۱- اهمیت مطالعه ی بافت شبکه ترابکولار در پی بردن به اساس ملکولی گلوکوم
۱۲	جدول ۱-۱
۱۳	۳-۱- ژن ها و مسیرهای مولکولی دخیل در پاتولوژی گلوکوم
۱۳	۱-۳-۱- ابرخانواده ژنی $TGF\beta$
۱۵	۲-۳-۱- ژن $PAX6$
۱۶	۳-۳-۱- ژن های $FOXC1$ و $FOXC2$
۱۸	۴-۳-۱- ژن $FOXH1$
۱۹	شکل ۵-۱
۱۹	۵-۳-۱- ژن $FOXE3$
۲۰	۶-۳-۱- ژن $PITX2$
۲۱	۷-۳-۱- ژن $PITX3$
۲۲	۸-۳-۱- ژن $LMX1B$
۲۳	۹-۳-۱- ژن $CYP1B1$
۲۵	۱۰-۳-۱- ژن های تیروزیناز و تیروزین هیدروکسیلاز
۲۶	۱۱-۳-۱- BMP ها و گیرنده هایشان در چشم
۳۰	جدول ۲-۱

۳۳

۳۵

۳۶

۳۷

جدول ۳-۱

شکل ۶-۱

۱-۳-۱۲-ژن لوکوس *MYOC : GLC1A*

شکل ۷-۱

عنوان

۳۸	۱۳-۳-۱- ژن لوکوس <i>OPTN : GLC1E</i>
۳۸	۱۴-۳-۱- ژن لوکوس <i>WDR36 : GLC1G</i>
۳۹	۱۵-۳-۱- ژن لوکوس <i>LTBP2 : GLC3C</i>
۴۰	شکل ۱-۸
۴۰	۱۶-۳-۱- سایر ژنهای مرتبط با گلوکوم
۴۰	۴-۱- نتیجه گیری
۴۱	۵-۱- هدف و چگونگی انجام این مطالعه
۴۳	شکل ۱-۹
۴۳	شکل ۱-۱۰
۴۴	شکل ۱-۱۱
۴۵	مقدمه ، مروری بر مطالعات انجام شده، اهداف رساله
۴۶	۱-۲- کشت سلولهای TM
۴۶	۱-۱-۲- مقدمه
۴۶	۲-۱-۲- مواد و وسایل لازم برای کشت سلولهای TM
۴۶	۱-۳-۱-۲- طرز تهیه محیط کشت سلول (یک لیتر)
۴۷	۲-۳-۱-۲- طرز تهیه ی محلول کلاژناز ۲ mg/ml جهت تیمار بافت TM
۴۷	۴-۱-۲- تهیه کشت اولیه از بافت های شبکه ترابکولار (TM)
۴۷	۱-۴-۱-۲- گرفتن بافت TM از بیمارستان شهید لبافی نژاد
۴۸	شکل ۱-۲
۴۸	۲-۴-۱-۲- تیمار تکه های بافتی برای جدا کردن سلول ها از بافت
۴۸	۳-۴-۱-۲- تهیه کشت اولیه از سلولهای TM با استفاده از آنزیم کلاژناز
۴۹	۴-۴-۱-۲- تهیه کشت اولیه از سلولهای TM با استفاده از آنزیم تریپسین
۵۰	۵-۱-۲- پاساژ سلولها
۵۰	۱-۵-۱-۲- مقدمه
۵۱	شکل ۲-۲
۵۲	۳-۵-۱-۲- چگونگی پاساژ سلولها
۵۴	۶-۱-۲- فریز کردن سلولها
۵۴	۱-۶-۱-۲- مقدمه
۵۵	۲-۶-۱-۲- مواد و وسایل لازم برای فریز کردن سلولها
۵۵	۳-۶-۱-۲- چگونگی فریز کردن سلولها
۵۵	۷-۱-۲- تیمار سلول های شبکه ترابکولار با استروئید دکسامتازون

۲-۲- ترانسفکت کردن سلولها با siRNA ها

۲-۲-۱- مقدمه

۵۶

۵۶

۵۷	۲-۲-۲- مواد و وسایل لازم برای ترانسفکشن سلولها
۵۷	۳-۲-۲- نحوه ترانسفکشن سلولها
۶۰	۳-۲- استخراج RNA
۶۰	۱-۳-۲- مقدمه
۶۰	۲-۳-۲- مواد و وسایل لازم برای استخراج RNA
۶۱	۳-۳-۲- نحوه استخراج RNA تام از سلول های TM
۶۲	۴-۲- سنتز cDNA
۶۲	۱-۴-۲- مواد و وسایل لازم برای سنتز cDNA
۶۲	۲-۴-۲- نحوه سنتز cDNA
۶۳	۵-۲- واکنش Real time PCR
۶۳	۱-۵-۲- مقدمه
۶۴	۲-۵-۲- مواد و وسایل لازم برای Real time PCR
۶۴	۳-۵-۲- نحوه اجرای Real-Time PCR
۶۶	۶-۲- آنالیز داده های Real time PCR
۶۶	۱-۶-۲- مقدمه
۶۷	۲-۶-۲- ارزیابی کیفیت و صحت واکنش PCR
۶۷	۳-۶-۲- انتخاب ژن کنترل داخلی مطلوب
۶۸	۴-۶-۲- تعیین کارایی (Efficiency) واکنش
۶۸	۵-۶-۲- تعیین میزان تغییر بیان ژن
۶۸	۷-۲- استخراج پروتئین از سلول ها
۶۸	۱-۷-۲- مقدمه
۶۹	۲-۷-۲- مواد و وسایل لازم برای استخراج پروتئین
۶۹	۱-۲-۷-۲- طرز تهیه بافر لیز سلولی برای استخراج کل پروتئین های سلول (pH=6.8)
۷۰	۳-۷-۲- نحوه استخراج پروتئین تام از سلول های TM
۷۱	۸-۲- تعیین غلظت پروتئین ها
۷۱	۱-۸-۲- مقدمه
۷۱	۲-۸-۲- روش بردفورد (Bradford assay)
۷۲	۱-۲-۸-۲- مواد و وسایل لازم برای آزمایش بردفورد
۷۲	۱-۱-۲-۸-۲- طرز تهیه محلول برادفورد 5X

۷۲	۳-۸-۲- چگونگی تهیه و رسم منحنی استاندارد BSA
۷۳	۴-۸-۲- روش لوری (Lowry assay)
۷۴	۱-۴-۸-۲- مواد لازم برای انجام روش سنجش لوری

۷۴	۱-۱-۴-۸-۲- طرز تهیه محلول های A, B, C و D برای انجام آزمون لوری
۷۵	۵-۸-۲- چگونگی انجام آزمون لوری (به سبک مارک ول)
۷۶	۹-۲- آزمایش وسترن بلاتینگ
۷۶	۱-۹-۲- مقدمه
۷۶	۲-۹-۲- الکتروفورز کردن پروتئین ها بر روی ژل عمودی آکریلامید (SDS-PAGE)
۷۶	۱-۲-۹-۲- مقدمه
۷۷	۲-۲-۹-۲- مواد و وسایل لازم برای Run کردن پروتئینها بر روی ژل آکریلامید
۷۷	۱-۲-۲-۹-۲- طرز تهیه آکریلامید-بیس آکریلامید 30.8% (30;0.8)
۷۸	۲-۲-۲-۹-۲- در طرز تهیه ی 4x Tris-HCl SDS (pH=8.8)
۷۸	۳-۲-۲-۹-۲- در طرز تهیه ی 4x Tris-HCl SDS (pH=6.8)
۷۸	۴-۲-۲-۹-۲- طرز تهیه محلول رانینگ (pH =8.3)
۷۸	۵-۲-۲-۹-۲- طرز تهیه بافر بارگذاری نمونه برای رنگ شدن پروتئینها بر روی ژل
۷۹	۶-۲-۲-۹-۲- طرز تهیه بافر فیکساتیو ژل آکریلامید
۷۹	۷-۲-۲-۹-۲- طرز تهیه بافر رنگ آمیزی ژل
۷۹	۸-۲-۲-۹-۲- طرز تهیه بافر برای رنگ بری ژل
۷۹	۴-۲-۹-۲- چگونگی ساخت ژل
۷۹	۱-۴-۲-۹-۲- نحوه ساختن ژل جدا کننده
۸۰	۲-۴-۲-۹-۲- نحوه ساختن ژل بالایی
۸۱	۵-۲-۹-۲- نحوه آماده سازی نمونه های پروتئینی و الکتروفورز کردن پروتئین ها بر روی ژل
۸۱	۶-۲-۹-۲- رنگ آمیزی ژل و یا آماده سازی ژل برای انتقال پروتئین به کاغذ نیتروسلولز
۸۲	۳-۹-۲- انتقال پروتئین ها از ژل به غشای نیتروسلولز
۸۲	۱-۳-۹-۲- مواد و وسایل لازم برای انتقال پروتئین ها از ژل به غشا
۸۲	۱-۱-۳-۹-۲- طرز تهیه بافر انتقال (pH=8.3)

- ۸۲ - ۲-۳-۹-۲ - چگونگی انتقال پروتئین ها از ژل به کاغذ
- ۸۳ - ۴-۹-۲ - آشکار سازی پروتئینها
- ۸۳ - ۱-۴-۹-۲ - مقدمه
- ۸۴ - ۲-۴-۹-۲ - مواد و محلولهای لازم برای آشکار سازی پروتئینها
- ۸۴ - ۱-۲-۴-۹-۲ - طرز تهیه TBST (pH = 7.5)
- ۸۵ - ۳-۲-۴-۹-۲ - طرز تهیه محلول آنتی بادی اولیه
- ۸۵ - ۴-۲-۴-۹-۲ - طرز تهیه محلول آنتی بادی ثانویه
- ۸۵ - ۳-۴-۹-۲ - نحوه آشکار سازی پروتئین
- ۸۵ - ۱-۳-۴-۹-۲ - شستشو و بلاکینگ بلات و بکارگیری محلول آنتی بادی اولیه و ثانویه

۸۶	۲-۹-۴-۳-۲- آماده سازی های لازم برای ورود به اتاق تاریک
۸۶	۲-۹-۴-۳-۳- آشکار سازی نهایی پروتئین بر روی فیلم با استفاده از کیت ECL
۸۷	شکل ۲-۴
۸۷	۲-۱۰-ایمونوفلورسانس
۸۷	۲-۱۰-۱- مقدمه
۸۸	۲-۱۰-۲- ایمونوفلورسانس بر روی سلول های TM
۸۸	۲-۱۰-۲-۱- مواد و وسایل لازم برای ایمونوفلورسانس بر روی سلول های TM
۸۹	۲-۱۰-۲-۲- نحوه ایمونوسیتوشیمی
۹۰	۲-۱۰-۳- ایمونوفلورسانس بر روی برش های تهیه شده از بخش قدامی چشم
۹۰	۲-۱-۳-۱- مواد و وسایل لازم برای ایمونوفلورسانس برش های تهیه شده از بخش قدامی چشم
۹۰	چشم
۹۰	۲-۱۰-۳-۲- نحوه ایمونوفلورسانس بر روی سکشن های تهیه شده از بخش قدامی چشم
۹۰	۲-۱۱-آزمایشات ریزآرایه
۹۰	۲-۱۱-۱- مقدمه
۹۲	۲-۱۱-۲- مواد و وسایل لازم برای آزمایشات ریزآرایه
۹۲	۲-۱۱-۳- نحوه انجام آزمایشات ریزآرایه
۹۲	۲-۱۱-۴- آنالیز داده های ریزآرایه
۱۰۰	۲-۱۲- مطالعات آنالیز GO و KEGG
۱۰۰	۲-۱۲-۱- مقدمه
۱۰۱	جدول ۲-۲
۱۰۲	۲-۱۲-۲- روش کار
۱۰۳	شکل ۲-۵
۱۰۴	۲-۱۳- Hierarchical clustering
۱۰۴	۲-۱۴- آنالیز پروموتوری به صورت in silico
۱۰۴	۲-۱۵- مقایسه با پژوهش های قبلی
۱۰۶	۳-۱- کشت سلولهای TM
۱۰۷	شکل ۳-۱
۱۰۸	۳-۲- تأیید سلولهای TM
۱۰۸	شکل ۳-۲

۱۰۸
۱۰۹
۱۱۰

Real time PCR واکنش ۳-۳

شکل ۳-۳

شکل ۴-۳

عنوان

۱۱۱	شکل ۳-۵
۱۱۲	شکل ۳-۶
۱۱۳	۴-۳- ترانسفکت کردن سلولها با siRNAs و بهینه کردن غلظت siRNA و Reagent
۱۱۴	شکل ۳-۸
۱۱۴	۵-۳- استخراج پروتئین از سلول های TM و سنجش مقدار پروتئین ها با روش Lowry
۱۱۴	شکل ۳-۹
۱۱۵	شکل ۳-۱۰
۱۱۶	۶-۳- تأیید سرکوب بیان ژن ها در سطح پروتئین
۱۱۶	شکل ۳-۱۱
۱۱۶	۵-۳- نتایج تأثیر سرکوب بیان FOXCI بر ژن های نامزد
۱۱۷	شکل ۳-۱۲
۱۱۷	۷-۳- آنالیز داده های میکروآرای
۱۱۷	شکل ۳-۱۳
۱۱۸	شکل ۳-۱۴
۱۱۸	شکل ۳-۱۵
۱۲۰	جدول ۳-۱
۱۲۱	جدول ۳-۲
۱۲۲	جدول ۳-۳
۱۲۳	جدول ۳-۴
۱۳۵	جدول ۳-۵
۱۳۸	جدول ۳-۶
۱۳۸	۸-۳- تأیید داده های ریزآرایه با استفاده از Real Time PCR
۱۳۹	جدول ۳-۷
۱۴۰	شکل ۳-۱۶
۱۴۲	شکل ۳-۱۷
۱۴۳	۹-۳- مقایسه با سایر داده های ریزآرایه مرتبط با گلوکوم
۱۴۳	جدول ۳-۸
۱۴۴	۱۰-۳- آنالیز in silico ژن های انتخاب شده
۱۴۵	شکل ۳-۱۸
۱۴۶	جدول ۳-۹
۱۴۶	جدول ۳-۱۰
۱۴۹	۱۱-۳- اثر سرکوب بیان ژن PITX2 در سری زمانی ۱۲ ساعته
۱۴۹	شکل ۳-۱۹
۱۴۹	۱۲-۳- اکسیداتیو استرس و پیام رسانی Wnt
۱۵۰	شکل ۳-۲۰
۱۵۸	شکل ۴-۱

فهرست نمودارها، عکس ها و نقشه ها

صفحه	عنوان
۲	شکل ۱-۱- عواملی که در پاتوفیزیولوژی زوال عصبی بیماری گلوکوم نقش دارند
۵	شکل ۱-۲- مسیر متداول خروج مایع داخل چشمی
۵	شکل ۱-۳- مسیرهای خروج مایع داخل چشمی. پیکان عریض تر، مسیر متداول و پیکان باریک تر، مسیر غیر متداول را نشان می دهد
۷	شکل ۱-۴- دیاگرام شماتیک بافت TM. پیکان ها جهت و مسیر حرکت مایع زلالیه را از اتاقک جلویی به کانال شلم نشان می دهند
۱۹	شکل ۱-۵- ابرخانواده $TGF\beta$ و پیام رسانی BMP و ژن های تکوینی بخش قدامی چشم
۳۵	شکل ۱-۶- تصویر شماتیک از برهم کنش های $TGF-B2$ ، $BMP-4$ و گرمین در سلول های TM
۳۷	شکل ۱-۷- نمای شماتیک ژن <i>MYOC</i>
۴۰	شکل ۱-۸- ساختار شماتیک پروتئین $LTBP2$ و جهش های بیماریزای آن
۴۳	شکل ۱-۹- ارتباط بین ژن های <i>PITX2</i> ، <i>FOXC1</i> و گلوکوم
۴۳	شکل ۱-۱۰- تأثیر جهش در ژن های <i>PITX2</i> و <i>FOXC1</i> بر روی فشار داخلی چشم
۴۴	شکل ۱-۱۱- بیان ژن <i>FOXC1</i> در بافت های مختلف چشم و بدن انسان
۴۸	شکل ۱-۲- شکل، تکه های بافتی TM را در یک ظرف برای تیمار آنزیمی نشان می دهد. فلش ها موقعیت دو تکه بافتی را نشان می دهند
۵۱	شکل ۲-۲- خلاصه مراحل تهیه کشت اولیه از بافت TM
۵۴	شکل ۲-۳- لام هماسیتومتر و Coverslip
۸۷	شکل ۲-۴- مراحل انجام آزمایش وسترن بلات.
۱۰۳	شکل ۲-۵- استفاده از نرم افزار DAVID از سال ۲۰۰۳ تا ۲۰۰۹
۱۰۷	شکل ۳-۱- مراحل مختلف تهیه سلول TM1
۱۰۸	شکل ۳-۲- تأثیر دکسامتازون بر بیان میوسیلین در سلول ها TM
۱۰۹	شکل ۳-۳- گراف ها و منحنی های Real Time PCR مربوط به ژن <i>PITX2</i>
۱۱۰	شکل ۳-۴- گراف ها و منحنی های Real Time PCR مربوط به ژن <i>FOXC1</i>
۱۱۱	شکل ۳-۵- گراف ها و منحنی های Real Time PCR مربوط به ژن <i>ACTIN</i>
۱۱۲	شکل ۳-۶- خروجی نرم افزار GNorm
۱۱۴	شکل ۳-۸- میزان سرکوب بیان ژن های <i>FOXC1</i> و <i>PITX2</i> توسط siRNAs مربوطه در رده های مختلف TM که توسط Real time PCR اندازه گیری شده است
۱۱۴	شکل ۳-۹- منحنی استاندارد BSA
۱۱۵	شکل ۳-۱۰- یک الگوی SDS-PAGE نمونه برای پروتئین های استخراج شده از سلول های TM
۱۱۶	شکل ۳-۱۱- سرکوب بیان ژن <i>FOXC1</i> با استفاده از siRNA2 <i>FOXC1</i> در سلول های TM1

- ۱۱۷ شکل ۳-۱۲- اثر سرکوب بیان ژن *FOXCI* بر ژن های مرتبط با گلوکوم
- ۱۱۷ شکل ۳-۱۳- نمودار جعبه ای نمونه ها قبل از نرمالایز شدن
- ۱۱۸ شکل ۳-۱۴- نمودار جعبه ای نمونه ها بعد از نرمالایز شدن
- ۱۱۸ شکل ۳-۱۵- متوسط تعداد بیدها را برای هر آرایه
- ۱۴۰ شکل ۳-۱۶- تأیید نتایج آزمایشات میکروآری با Real time PCR

عنوان

- ۱۴۰ شکل ۳-۱۶- تأیید نتایج آزمایشات میکروآرای با Real time PCR
- ۱۴۲ شکل ۳-۱۷- تأیید اثر سرکوب بیان *PITX2* و *FOXC1* بر ژن های *ALDH1A1* و *CXCL6* در سطح پروتئین
- ۱۴۵ شکل ۳-۱۸- Heat map های ژن های حاصل از سرکوب (A) *PITX2* و (B) *FOXC1*.
- ۱۴۹ شکل ۳-۱۹- اثر سرکوب بیان ژن *PITX2* بر ژن های *PITX2*، *DKK1*، *CXCL6* و *ALDH1A1* در بازه های زمانی ۱۲، ۲۴، ۳۶ و ۴۸ ساعت پس از ترنسفکشن siRNA
- ۱۵۰ شکل ۳-۲۰- اثر H_2O_2 و LiCl بر بیان *ALDH1A1*. A. اندازه گیری شده با Real time PCR. B. اندازه گیری شده با وسترن بلاتینگ

فهرست جدول ها

صفحه	عنوان
۱۲	جدول ۱-۱- فاکتورهای رونویسی که در ایجاد بی نظمی های تکوینی چشم درگیر هستند
۳۰	جدول ۲-۱- مولکول های بازدارنده پیام رسانی BMP در انسان
۳۳	جدول ۳-۱- خلاصه ای از BMP ها، گیرنده های BMP و آنتاگونیست های آنها در بافت های چشم بالغ
۶۵	جدول ۱-۲- مشخصات و ویژگی های پرایمرهای استفاده شده برای واکنش های Real Time PCR
۱۰۱	جدول ۲-۲- جدول ۱۶ پایگاه داده اصلی KEGG و دسته بندی اصلی آن را نشان می دهد
۱۲۰	جدول ۱-۳- اثر siRNA ها بر ژن های استاندارد <i>B2M</i> ، <i>ACTB</i> و <i>GAPDH</i> بر اساس داده های ریزآرایه
۱۲۱	جدول ۲-۳- همه ژن های شناسایی شده بر اثر تیمار با PITX2 siRNAs که حداقل با یک پروتکل خود را نشان داده اند
۱۲۲	جدول ۳-۳- ژن های شناسایی شده بر اثر تیمار با FOXC1 siRNAs که با هر سه پروتکل به دست آمده اند
۱۲۳	جدول ۴-۳- ژن های شناسایی شده بر اثر تیمار با FOXC1 siRNAs که حداقل با یک پروتکل خود را نشان داده اند
۱۳۵	جدول ۳-۵- ۲۰۰ ژن با بالاترین بیان در سلول های TM
۱۳۸	جدول ۳-۶- مسیرهای KEGG به دست آمده از آنالیز ۲۰۰ ژن با بیشترین بیان در سلول های TM
۱۳۹	جدول ۳-۷- میانگین کارایی واکنش های Real time PCR برای ژن های بررسی شده
۱۴۳	جدول ۳-۸- مقایسه ژن های شناسایی شده در این مطالعه با سایر ژن های شناسایی شده بر روی کلیه داده های ریزآرایه انجام شده مرتبط با گلوکوم تا کنون را نشان می دهد
۱۴۶	جدول ۳-۹- جایگاه های اتصال FOXC1 و PITX2 در ناحیه پروموتوری ژن های تحت تأثیر قرار گرفته توسط siRNAs هر دو فاکتور رونویسی FOXC1 و PITX2
۱۴۶	جدول ۳-۱۰- Functional anotations enriched برای ژن های تحت تأثیر PITX2 و FOXC1 siRNAs

چکیده

هدف: شناسایی ژن هایی که در کشت های اولیه سلول های شبکه ترابکولار (TM) بیانشان تحت تأثیر فاکتورهای رونویسی PITX2 و FOXC1 قرار می گیرد. همچنین شناسایی ژن هایی که در بیماری گلوکوم نقش دارند. ژن های عامل بیماری گلوکوم که تاکنون شناخته شده اند تنها در کسر کوچکی از بیماران عامل بیماری می باشند. هدف ما در این مطالعه شناسایی ژن های دیگری است که ممکن است به علت نقش های ظریف، به راحتی توسط روشهای ژنتیکی قابل شناسایی نباشند.

روش ها: با استفاده از ریزآرایه بیانی، بیان ژنها در سلو های TM تیمار شده با scrambled siRNA با سلول های TM تیمار شده با siRNA های اختصاصی FOXC1 و PITX2 مقایسه شدند. برای به حداقل رساندن نتایج اشتباه منفی و مثبت از سه روش مختلف برای آنالیز داده ها استفاده شد. نتایج ریزآرایه بر روی تعدادی از ژن ها با روش های Real Time PCR، وسترن بلات و ایمنوهیستوشیمی تأیید شدند. تأثیرات بر روی دو ژن *ALDH1A1* و *CXCL6* بیشتر پیگیری شدند.

نتایج: سرکوب PITX2 و FOXC1 به ترتیب منجر به شناسایی ۵ و ۲۶ ژن توسط هر سه روش شد. ۴۱ و ۸۴۹ ژن نیز توسط حداقل یک پروتکل شناسایی شدند. همه نتایج ریزآرایه نیز بر روی ژن های بررسی شده با سایر روش ها تأیید شدند. نتایج در دو سلول TM دیگر تهیه شده نیز تأیید شدند. نقش PITX2 در پاسخ *ALDH1A1* به استرس اکسیداتیو نشان داده شد.

نتیجه گیری: روش های بیوانفورماتیکی نشان دادند که ژن های شناسایی شده بر عملکردها و مسیرهای مرتبط با گلوکوم تأثیر می گذارند. نقش PITX2 و FOXC1 در بیان بسیاری از ژن ها و بعضی از مسیرها برای نخستین بار ارائه می شود. از آنجا که بسیاری از ژن های شناسایی شده در رابطه با گلوکوم مطالعه نشده اند، ما احساس می کنیم که این ژن ها چشم اندازهای جدیدی برای درک اتیولوژی این بیماری می گشاید.

واژگان کلیدی: PITX2، FOXC1، گلوکوم، ریزآرایه، *ALDH1A1*، *CXCL6*

فصل اول

مقدمه ،

مروزی پر مطالعات انجام شده ،
اهداف رساله

۱-۱-۱- گلوکوم

۱-۱-۱- تاریخچه گلوکوم

واژه گلوکوم از لغت یونانی گلوکوس^۱ به معنی رنگ خاکستری یا سبز- آبی گرفته شده است. این رنگ در مردمک متسع شده ناشی از گلوکوم، در موارد پیشرفته وبدون درمان دیده می شود. در ابتدا تصور می شد که بیماری روی عدسی اثر می گذارد. در قرن شانزدهم آمبریوس پار^۲ پزشک فرانسوی، اصطلاح بافتالموس (مانند گاو) را بکار برد که بزرگ شدن کره چشم را توصیف می کند. در سال ۱۷۲۲ سنت ایوز^۳ افزایش زلالیه را به عنوان دلیل اصلی بزرگ شدن کره چشم ذکر کرد. وابستگی بین افزایش فشار چشم، با بزرگ شدن کره چشم و گلوکوم در ۱۷۴۴ بوسیله فیلیپ توماس بگر^۴ توصیف شد. فنجانگی شدن دیسک بینایی در گلوکوم در سال ۱۸۵۶ توسط آدولف وبر^۵ مطرح گردید. ویلیام فون مورالت^۶ طبیعت گلوکومایی بزرگ شدن کره چشم مادر زادی را در سال ۱۸۶۹ توصیف کرد، ولی شکست غشا دسمه^۷ را در نظر نگرفت. گراهامر^۸ این شکست غشایی را در ۱۸۸۴ بیان کرد و اتوهاب^۹ اهمیت کلینیکی این بیماری را در سال ۱۸۹۹ بخوبی توضیح داد [۱].

۱-۱-۲- تعریف گلوکوم

گلوکوم^{۱۰} یک نوروپاتی چشمی مزمن و مخرب است که به واسطه ی ظاهر خاص عصب بینایی، از بیشتر دیگر انواع نوروپاتی چشمی متمایز می شود. در گلوکوم، حاشیه ی عصبی-شکیه ای عصب بینایی به طور پیشرونده نازک تر می شود که خود، قسمت فنجانگی عصب بینایی را بزرگتر می کند. این پدیده، تحت عنوان فنجانگی شدن عصب بینایی شناخته می شود و علت آن نیز از بین رفتن آکسون سلول های گانگلیونی شبکیه، به همراه سلول های گلیال پشتیبان و عروق آن منطقه است [۲]. این بیماری، بعد از آب مروارید (کاتاراکت)، دومین علت کوری در سرتاسر جهان است [۳].

مرگ سلول های گانگلیونی شبکیه شاخص بیماری گلوکوم است و در این نوروپاتی بینایی^{۱۱} نقش دارد. در شکل ۱-۱ تعدادی از عوامل دخیل در مرگ سلول های گانگلیونی شبکیه نشان داده شده اند [۴].

1- glaukos

2- Ambroise Pare

3 - Saint-Yves

4 - Philip Thomas Beger

5- Adolph Weber

6- Wilhelm Von Muralt

7 - Descemet's membrane

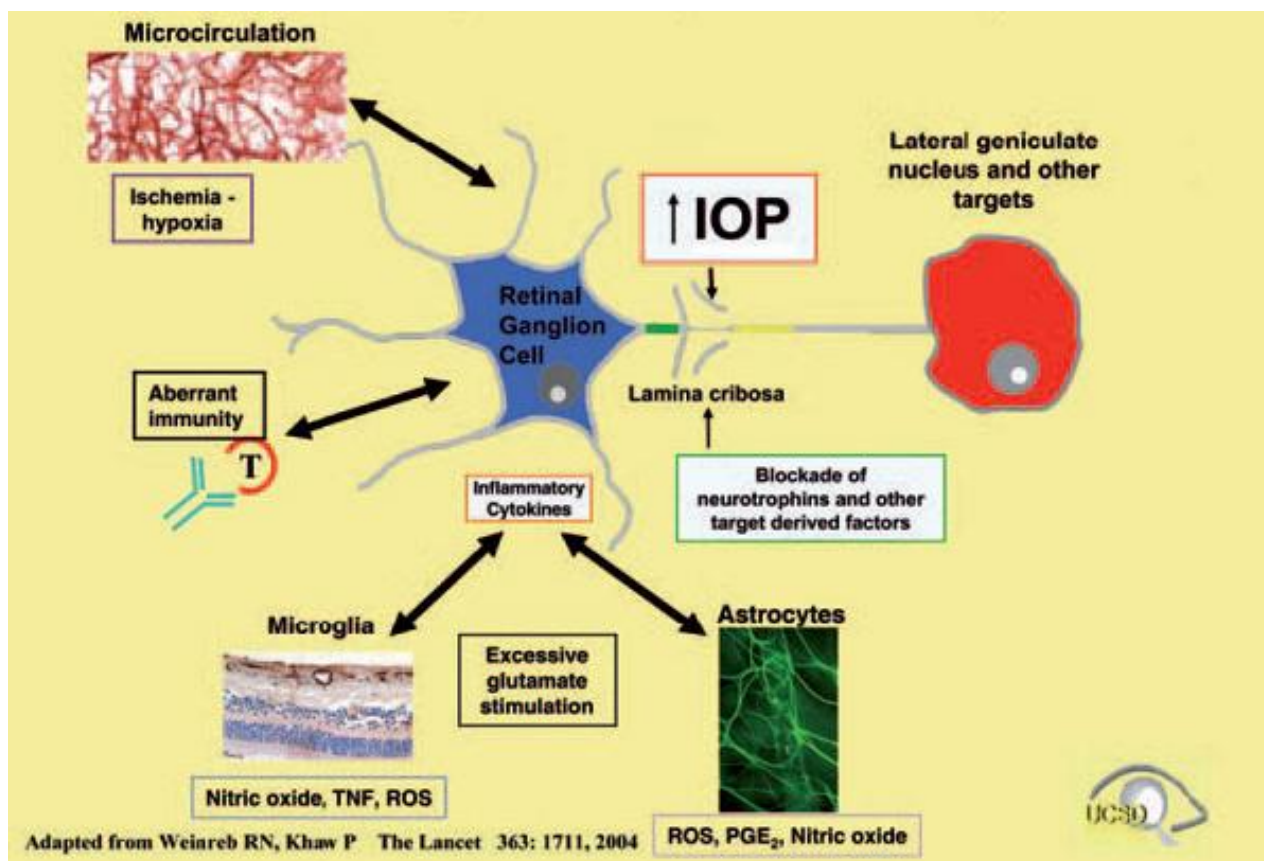
8- Grahmer

9- Otto Haab

10- Glaucoma

11 - Optic neuropathy

همانطور که در شکل نشان داده شده است افزایش IOP می تواند منجر به فشردگی و تغییر لامینا کریبوسا^۱ و انسداد هر دو جریان اکسوپلاسمی retrograde و antrograde شود. همچنین افزایش IOP موجب مسدود شدن جریان اکسوپلاسمیک^۲ و تداخل در رسانش فاکتورهای رشد نوروتروفیک از LGN^۳ به سلول گانگلیونی شبکیه می شود.



شکل ۱-۱- عواملی که در پاتوفیزیولوژی زوال عصبی بیماری گلوکوم نقش دارند (Weinreb RN and Khaw PT. Lancet 2004; 363: 1711-1720)

همانطور که در شکل ۱-۱ نشان داده شده است سایر عواملی که منجر به مرگ سلول گانگلیونی شبکیه می شوند عبارتند از کم خونی موضعی^۴ و افزایش نیتریک اکسید و ROS^۵ ها در میکروگلیا و آستروسیت ها .

- 1 - Lamina cribosa
- 2 - Axoplasmic flow
- 3 - Lateral geniculate nucleus
- 4 - Ischemia
- 5 - Reactive Oxygen Species