

بررسی ارتباط بین ژن *TNC* و بیماری پوکی استخوان

نسرین السادات نبوی زاده^۱، زهره حجتی^{۲*}

مقاله پژوهشی

مقدمه: بیماری پوکی استخوان از شایع‌ترین علل شکستگی استخوان در دوران پیری است. بررسی پوکی استخوان در افراد مسن به دلیل هتروژن بودن فرایند پیری بسیار پیچیده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط ژن *TNC* در بیماران مبتلا به سندرم ارثی و بسیار نادر پوکی استخوان با عنوان استئوژنز ایمپرکتا است. مطالعه بر روی این بیماران به دلیل مونوژنیک بودن بیماری ارثی پوکی استخوان می‌تواند برای شناسایی بیومارکر اختصاصی در روند پوکی استخوان حائز اهمیت باشد.

روش بررسی: در این مطالعه مورد شاهدهی، از بیماران مبتلا به استئوژنز ایمپرکتا به عنوان مدل آزمایشگاهی ساده و مونوژن برای بررسی نقش احتمالی ژن *TNC* در پوکی استخوان استفاده شده است. بدین منظور، ابتدا از طریق آنالیز بیوانفورماتیکی، شبکه پروتئینی *TNC* و مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با پروتئین‌های این شبکه بررسی شدند. سپس، بافت پوست از ۳ بیمار مبتلا به سندرم وراثتی پوکی استخوان و دو فرد سالم گرفته شد و پس از کشت بافت پوست، سلول‌های فیبروبلاست از سلول‌های کراتینوسیت جداسازی شد. سپس RNA هر نمونه سلولی از دو پاساژ مختلف استخراج و پس از سنتز cDNA، بیان ژن *TNC* در سلول‌های بیمار و سالم توسط روش Real-time PCR و از طریق تکرارهای مختلف سنجیده شد.

نتایج: پروتئین‌های شبکه *TNC* با مسیرهای بیولوژیکی مرتبط در فرایند استخوان‌زایی به‌طور معناداری در ارتباط هستند. میزان بیان ژن کاندید *TNC* در سلول‌های فیبروبلاست سالم و بیمار پوکی استخوان بررسی و افزایش معنادار بیان این ژن در سلول‌های بیمار با استفاده از تکرارهای بیولوژیکی و تکنیکی ($p = 0/005$, $p = 0/007$) و از طریق آنالیز Student t.test تأیید گردید. در این مطالعه از نرم‌افزارهای Excel و GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) استفاده شده است.

نتیجه‌گیری: افزایش بیان ژن *TNC* در بیماری مونوژنیک پوکی استخوان می‌تواند نمایانگر نقش احتمالی این ژن در روند پوکی استخوان باشد و این ژن را به عنوان بیومارکر این بیماری معرفی کند. مطالعه بر روی بیماری نادر استئوژنز ایمپرکتا به‌عنوان یک مدل آزمایشگاهی ساده و مونوژن برای بررسی بیماری هتروژن پوکی استخوان است و برای تأیید نهایی، نیاز است تا بیان ژن کاندید در جامعه آماری مناسب متشکل از افراد مبتلا به پوکی استخوان بررسی شود.

واژه‌های کلیدی: پوکی استخوان، بیماری مونوژنیک، *TNC*، Real-time PCR، مسیرهای بیولوژیکی

ارجاع: نبوی زاده نسرین السادات، حجتی زهره. بررسی ارتباط بین ژن *TNC* و بیماری پوکی استخوان. مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد ۱۳۹۹؛ ۲۸ (۱۰): ۳۳-۳۱.

۱- دانشجوی دکترا، بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استاد، بخش ژنتیک، گروه زیست شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکده علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، اصفهان، ایران

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۳۲۸۷۹۰۳، پست الکترونیکی: z.hojati@sci.ui.ac.ir، صندوق پستی: ۸۱۷۴۶۷۳۴۴۱

مقدمه

پوکی استخوان به‌عنوان یکی از بیماری‌های مهم قرن بیست و یکم در نظر گرفته می‌شود و تقریباً ۲۰۰ میلیون نفر در سطح جهان به این بیماری مبتلا هستند که تأثیر قابل توجهی در میزان مرگ و میر دارد (۱). عمدتاً پوکی استخوان با کاهش تراکم مواد معدنی استخوان (Bone mineral density (BMD) و افزایش خطر شکنندگی و وخیم‌تر شدن وضعیت استخوان همراه است و متأسفانه این اپیدمی ویرانگر به‌طور خاموش پیش می‌رود تا زمانی که یک شکستگی رخ دهد (۲). با توجه به ارتباط نزدیک بین روند پیری و پاتوژنز پوکی استخوان، تحقیقات در مورد مکانیسم‌های از بین رفتن استخوان همراه با افزایش سن در سال‌های اخیر به‌طور قابل توجهی گسترش یافته است که شامل ترکیبی از مطالعات بالینی و مولکولی است. به‌طور کلی، پیری یک فرایند پیچیده است که در اثر مجموعه‌ای از فاکتورهای محیطی و ژنتیکی روی می‌دهد. در روند پیری، مجموعه‌ای از تغییرات زیان‌آور در سلول‌ها و بافت‌ها انباشته می‌شوند که در نهایت منجر به افزایش خطر بیماری و مرگ می‌گردند (۳). در مقابل پیری و بیماری‌های رایج مثل دیابت، چاقی و بسیاری از انواع سرطان‌ها که معمولاً در اثر مجموعه‌ای از علائم متعدد ژنتیکی و فاکتورهای محیطی ایجاد می‌شوند، بیماری‌های نادر وجود دارند که معمولاً در اثر جهش در یک ژن ایجاد می‌شوند و اثبات روند بیماری‌زایی آن ساده‌تر است. کشف مکانیسم‌های دخیل در بیماری‌های نادر می‌تواند به فهم عمیق‌تر ما از بیماری‌های رایج مرتبط و مکانیسم‌های مولکولی آن‌ها کمک کند. برای مثال گرچه بیماران مبتلا به بیماری نادر و وراثتی پوکی استخوان درصد بسیار کمی از جمعیت را تشکیل می‌دهند، اما فرایند پوکی استخوان با افزایش سن به‌صورت رایج در زندگی بسیاری از انسان‌ها وجود دارد و تلاش‌های بسیار زیادی تاکنون برای پیشگیری و درمان آن صورت گرفته است. مطالعه بر روی بیماری نادر پوکی استخوان یک ابزار بسیار مفید برای مطالعه اختصاصی روند پوکی استخوان در دوران پیری است بدین صورت که ژن‌های دخیل در بیماری و مکانیسم آن‌ها می‌توانند در طراحی بسیاری

از درمان‌ها مورد استفاده قرار گیرند. از جمله بیماری‌های ارثی و مونوژنیک شناخته شده در ارتباط با پوکی استخوان می‌توان به استئوژنزیز ایمپرفکتا (osteogenesis imperfecta)، سندرم بروک (Bruck syndrome)، استئوپتروزیس (osteopetrosis)، سندرم استئوپورزیس-سودوگلیوما (osteoporosis-pseudoglioma syndrome)، بیماری ون بوخم (von Buchem disease)، اسکلوستئوزتئوز (sclerosteosis)، استئولیز خانوادگی (familial osteolysis)، بیماری پاژه (Paget's disease)، هیپوفسفاتازی (hypophosphatasia)، هایپرپاراتیروئیدیسم نوزادی (neonatal hyperparathyroidism) و پیکنودیزوستوز (pyknodysostosis) اشاره کرد (۴). در این مطالعه از نمونه‌های استئوژنزیز ایمپرفکتا استفاده گردید که در آن بیماران از بدو تولد از پوکی استخوان شدید و شکستگی‌های متعدد استخوانی رنج می‌برند.

هم‌چنین ژن *Tenascin C (TNC)* به عنوان ژن کاندید در روند پوکی استخوان انتخاب شد. ژن *TNC* یک گلیکوپروتئین ماتریکس خارج سلولی را کد می‌کند که در طی رشد استخوان و مورفوژنز توسط سلول‌های استئوبلاست ساخته می‌شود (۵، ۶). بررسی‌ها نشان داده است که *TNC* در تمایز استخوانی استئوبلاست و معدنی شدن بافت استخوان نقش دارد. در طی این تمایز، ممکن است *TNC* به عنوان یک واسطه برای تشکیل استخوان جدید توسط سیگنال $TGF-\beta$ فعال شود (۷، ۸). علاوه بر این، پروتئین *Bone morphogenetic protein (BMP)* و فاکتورهای رشد *Wnt* یا فشار مکانیکی و استرس می‌توانند بیان *TNC* را در استئوبلاست‌ها افزایش دهند (۹، ۱۰). هدف اصلی این مطالعه بررسی ارتباط ژن *TNC* با بیماری پوکی استخوان با استفاده از روش‌های بیوانفورماتیکی و آزمایشگاهی است. لازم به‌ذکر است که این مطالعه به منظور کاندید کردن بیومارکر پوکی استخوان صورت گرفته است و به‌دلیل تعداد بسیار محدود نمونه‌های بیماران مبتلا به استئوژنزیز ایمپرفکتا به عنوان مدل مونوژن و نادر پوکی استخوان، لازم است این نتایج در مطالعات گسترده‌تر با جامعه آماری مناسب متشکل از بیماران مبتلا به انواع پوکی استخوان و افراد سالم تأیید نهایی شود.

مطالعات بیوانفورماتیک و زیست شناسی سامانه‌ها

به منظور به دست آوردن برهم‌کنش‌های پروتئینی TNC از پایگاه داده زیستی (<https://string-db.org/>) String استفاده گردید. این پایگاه داده شامل مجموعه‌ای از برهم‌کنش‌های پروتئینی شناخته شده و پیش‌بینی شده براساس نتایج آزمایشگاهی، پیش‌بینی‌های بیوانفورماتیکی و مقالات چاپ شده است. سپس مجموعه شبکه پروتئینی TNC توسط دو ابزار KEGG (<https://www.genome.jp/kegg>) و Reactome (<https://reactome.org/>) آنالیز مسیریابی شدند. پایگاه داده Reactome مسیره‌های بیولوژیکی را با جزئیات کامل نشان می‌دهد. هم‌چنین KEGG به صورت گسترده برای تجزیه و تحلیل داده‌ها در ژنومیک، متابولومیک و سایر مطالعات omics، مدل‌سازی و شبیه‌سازی در سیستم بیولوژی و طراحی دارو استفاده می‌شود. در نهایت نقش مسیره‌های معنادار اصلی به دست آمده توسط این دو روش در روند استخوان‌زایی ارزیابی گردید.

کشت و نگهداری سلول‌های فیبروبلاست انسانی در شرایط طبیعی: در ابتدا بیوپسی‌های پوست سه بیمار مبتلا به استئوزنوزی‌ایمپرفکتا و دو فرد سالم به قطعات کوچک ۲ میلی‌متری بریده و توسط بافر PBS شسته شدند. سپس خراش‌های عمیقی بر روی یک ظرف پتری‌دیش ۱۰ سانتی‌متری توسط یک تیغه استریل ایجاد شد و قطعات پوستی روی خراش‌های ایجاد شده ثابت شدند. پس از آن، در محیط کشت حاوی DMEM با گلوکز بالا (HyClone, Thermo Scientific, USA, Cat. No. SH30022.01) گاو جنینی (FBS) (HyClone, Thermo Scientific, USA, Cat. No. SH30070.03)، ۱ درصد پنی‌سیلین / استرپتومایسین (Gibco, USA, Cat. No. 15140-122) و ۲ میلی مولار L-گلوتامین (Thermo Fisher Scientific, USA, Cat. No. 25030081) کشت داده شدند. معمولاً ۳ تا ۵ روز طول می‌کشد تا رشد سلول‌های فیبروبلاست اولیه از بیوپسی پوست شروع شود. مشخصات پاساژهای سلولی استفاده شده در این مطالعه در جدول ۱ آمده است.

جدول ۱: نمونه‌های مورد استفاده در این مطالعه و شماره پاساژ سلولی آن‌ها

| نمونه | شماره پاساژ سلولی (سری اول) | شماره پاساژ سلولی (سری دوم) |
|---------|-----------------------------|-----------------------------|
| سالم ۱ | P10 | P11 |
| سالم ۲ | P7 | P8 |
| بیمار ۱ | P7 | P8 |
| بیمار ۲ | P3 | P6 |
| بیمار ۳ | P3 | P7 |

در سرعت بالا سانتریفیوژ شدند. به اندازه حجم لیز سلولی، اتانول ۷۰٪ به آن اضافه شده و از طریق پیتاژ کردن به طور کامل مخلوط گردید. سپس نمونه‌ها به ستون RNeasy spin column منتقل و در دور ۸۰۰۰ g به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند. پس از آن بافر RW1 و RPE به ترتیب به نمونه‌ها اضافه و در هر مرحله نمونه‌ها در دور ۸۰۰۰ g به مدت ۱۵ ثانیه سانتریفیوژ شدند. هم‌چنین به منظور حذف تمام DNA ژنومی

استخراج RNA از سلول‌های فیبروبلاست کشت داده شده با استفاده از کیت RNeasy Mini (Qiagen, Germany, Cat. No. 74106): سلول‌های چسبیده به کف پلیت از طریق روش تریپسینه کردن جمع‌آوری و سلول‌ها با استفاده از ۶۰۰ میکرولیتر محلول لیزکننده RLT و با استفاده از ورتکس لیز شدند. به منظور همگن‌سازی، لیز سلولی مستقیماً به ستون‌های QIAshredder spin column منتقل شده و به مدت دو دقیقه

تعیین اختصاصیت و کارایی هر جفت پرایمر پس از انجام

Real-time PCR

همان‌طور که در برنامه Real-time PCR آمده است، پس از اتمام چرخه‌های PCR، واکنش وارد مرحله منحنی ذوب شد. در این مرحله دما از ۶۰ تا ۹۵ درجه سانتی‌گراد به تدریج افزایش می‌یابد و در دمای مخصوصی کل محصول دو رشته‌ای مورد نظر دناتوره شده و تک رشته‌ای می‌گردد. در صورتی که پرایمرها اختصاصی نباشند در حین PCR، به جز محصول اصلی، محصول یا محصولات فرعی و یا پرایمر دایمر تشکیل می‌گردد. وجود یک پیک در منحنی ذوب نشان‌دهنده اختصاصی بودن و مناسب بودن پرایمرها است. هم‌چنین کارایی پرایمرهای طراحی شده با استفاده از منحنی استاندارد و محاسبه R^2 تعیین شد. برای سنجش R^2 چهار رقت متوالی از cDNA نمونه طبیعی در غلظت‌های ۱/۸، ۱/۱۶، ۱/۳۲، ۱/۶۴ تهیه شد و سپس Real Time PCR هر رقت با هر جفت پرایمر انجام گرفت. هرچه میزان R^2 به یک نزدیک‌تر باشد، ارتباط معنادارتری بین غلظت cDNA و C_t وجود دارد که این نشان‌دهنده کارایی پرایمر است. در نهایت به منظور رفع خطاهای تکنیکی، سه جفت پرایمر برای مطالعه بیان ژن TNC از طریق سایت (https://pga.mgh.harvard.edu/cgi-bin/primerbank/new_search2.cgi) انتخاب شدند. هم‌چنین ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌نگه‌دار به منظور نرمال‌سازی داده‌های Real-time PCR مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۴).

آنالیز نتایج با استفاده از روش $\Delta\Delta Ct$

پس از پایان واکنش و تعیین خط آستانه، سیکل آستانه (C_t) هر نمونه به دست می‌آید. از نسبت سیکل آستانه ژن مورد نظر به سیکل آستانه ژن خانه‌نگه‌دار می‌توان میزان بیان نسبی ژن مورد نظر را از روش $2^{-\Delta\Delta Ct}$ به دست آورد. در این روش $\Delta\Delta Ct$ از رابطه زیر استفاده می‌گردد:

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ sample} - \Delta Ct \text{ control}$$

در این رابطه ΔCt sample، اختلاف میان سیکل‌های آستانه ژن مورد نظر و خانه‌نگه‌دار در نمونه مورد آزمایش (بیمار) و ΔCt

از روش هضم DNase بر روی ستون استفاده شد. RNA استخراج شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. سنتز cDNA با استفاده از کیت iScript reverse transcriptase (Bio-Rad, USA, Cat. No. 1708891) حدود ۱ میکروگرم RNA استخراج شده برای ساخت cDNA استفاده شد. سنتز cDNA با استفاده از کیت iScript reverse transcriptase صورت گرفت. در مرحله اول، RNA به لوله‌های PCR حاوی ۴ میکرولیتر از مخلوط 5x iScript Reaction Mix و ۱ میکرولیتر از iScript reverse transcriptase اضافه شد به گونه‌ای که مجموع حجم هر واکنش پس از اضافه کردن آب دو بار تقطیر ۲۰ میکرولیتر گردید. پس از انکوبه کردن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، مخلوط به دستگاه PCR منتقل شد. در دستگاه PCR، نمونه‌ها در دمای ۴۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه و سپس در ۹۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ دقیقه انکوبه شده و در آخر نمونه‌ها در ۴ درجه سانتی‌گراد سرد شدند. cDNA سنتز شده در دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد و با توجه به غلظت مورد نیاز به صورت خالص یا رقیق شده (نسبت ۱ به ۱۰) مورد استفاده قرار گرفت.

تکنیک Quantitative real-time PCR

تکنیک Quantitative real-time PCR یا qRT-PCR با استفاده از سایبرگرین Applied Biosystems™ PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix و به صورت تکرارهای سه تایی برای هر نمونه انجام شد. در این مطالعه از ژن GAPDH به عنوان ژن خانه‌نگه‌دار برای نرمال‌سازی داده‌ها استفاده شد. تمام پرایمرها در غلظت ۲.۵ میکرومولار مورد استفاده قرار گرفتند. مواد تهیه شده برای تکنیک qRT-PCR در پلیت‌های ۳۸۴ چاهکی (Applied Biosystems, USA, Cat. No. 4309849) ریخته و توسط فیلم چسبناکی (Thermo Scientific, UK, Cat. No. AB-0558) مهر و موم شدند. سپس تکنیک real-time PCR در دستگاه ABI Prism 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems, US) صورت گرفت. میزان مواد مورد استفاده در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر و هم‌چنین برنامه Real-time PCR به ترتیب در جدول ۲ و ۳ آمده است.

سنجیده شد ($p < 0.05$) به عنوان سطح معناداری در نظر گرفته شده است). همچنین نمودارها توسط نرم افزار GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software, Inc, San Diego, CA) تهیه شدند.

ملاحظات اخلاقی

پروپوزال این تحقیق توسط دانشگاه اصفهان تایید شده است (کد اخلاق IR.UI.REC.1399.029).

control، اختلاف میان سیکل های آستانه ژن مورد نظر و خانه-نگهدار در نمونه کنترل (سالم) می باشد. عدد حاصل از آن، در رابطه $2^{-\Delta\Delta Ct}$ قرار داده می شود که نتیجه به دست آمده اختلاف میزان بیان در نمونه کنترل و مورد آزمایش را نشان می دهد.

تجزیه و تحلیل آماری

در این مطالعه داده های جمع آوری شده مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند و میزان تغییر بیان ژن *TNC* بین نمونه های سالم و بیمار از طریق آنالیز student t.test و نرم افزار Excel

جدول ۲: مواد و مقادیر مورد نیاز جهت انجام واکنش Real-time PCR در حجم نهایی ۱۰ میکرولیتر

| حجم مورد نیاز به ازای هر واکنش | مواد مورد نیاز |
|--------------------------------|-------------------------|
| ۵ میکرولیتر | SYBR™ Green Master Mix |
| ۱ میکرولیتر | Forward primer (2.5 μM) |
| ۱ میکرولیتر | Reverse Primer (2.5 μM) |
| ۱ میکرولیتر | cDNA (1/10 diluted) |
| ۲ میکرولیتر | Nuclease-Free Water |
| ۱۰ میکرولیتر | حجم نهایی |

جدول ۳: برنامه Real-time PCR

| تعداد چرخه | مرحله | دما | زمان |
|------------|--|--------------------|----------|
| ۱ | Primary Denaturation and DNA polymerase activation | ۹۵ درجه سانتی گراد | ۱۰ دقیقه |
| ۴۰ | Denaturation | ۹۵ درجه سانتی گراد | ۲۰ ثانیه |
| | Annealing | ۶۰ درجه سانتی گراد | ۳۰ ثانیه |
| | Extension | ۷۲ درجه سانتی گراد | ۱ دقیقه |
| | Plate read | | |

Melting Curve from 60°C to 95°C, read every 0.2°C, hold 2 sec

جدول ۴: پرایمرهای طراحی شده برای Real-time PCR

| نام ژن | پرایمر | توالی (۵' > ۳') | طول محصول |
|--------|----------|-----------------------|-------------|
| TNC | Forward1 | TCCAGTGTTCGGTGGATCT | ۱۳۱ جفت باز |
| | Reverse1 | TTGATGCGATGTGTGAAGACA | |
| TNC | Forward2 | GCCCCTGATGTTAAGGAGCTG | ۲۵۰ جفت باز |
| | Reverse2 | GGCCTCGAAGGTGACAGTT | |
| TNC | Forward3 | AGGGCAAGTGCCTAAATGGAG | ۷۷ جفت باز |
| | Reverse3 | TGGGCAGATTTCACGGCTG | |
| GAPDH | Forward1 | CGACAGTCAGCCGCATCTT | ۳۰۳ جفت باز |
| | Reverse1 | CCCCATGGTGTCTGAGCG | |

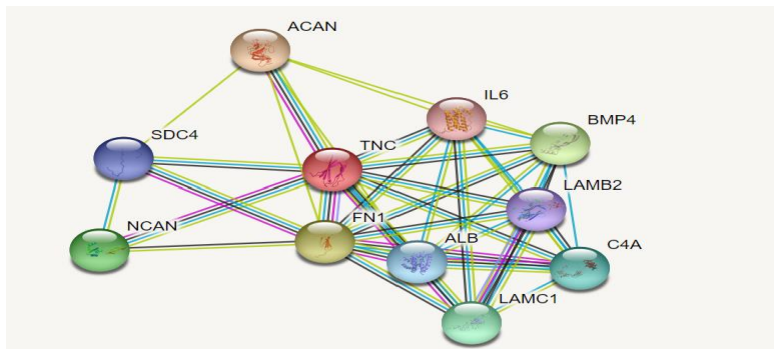
نتایج

در این مطالعه مورد شاهدی، ابتدا سه بیمار خویشاوند مبتلا به سندرم وراثتی پوکی استخوان استئوزنزیز ایمپرکتا شناسایی شدند. شدت پوکی استخوان در افراد مبتلا بسیار بالا است به گونه‌ای که نوزادان در حین تولد دچار شکستگی استخوان در نواحی متعددی شدند. بیوپسی پوست از ۲ فرد سالم و ۳ بیمار گرفته شد و پس از کشت و جداسازی سلول‌های فیبروبلاست از سلول‌های کراتینوسیت، RNA سلول‌های فیبروبلاست با استفاده از کیت RNeasy Mini استخراج گردید. از آنجایی که شرایط مختلف محیطی و تعداد پاساژ بر روی میزان بیان ژن‌های مختلف در سلول تاثیر می‌گذارند، در این مطالعه برای هر نمونه، RNA از سلول‌ها در دو پاساژ مختلف استخراج شد (جدول ۱). هم‌چنین در مطالعه حاضر، برهمکنش‌های پروتئینی ژن کاندید *TNC* در انسان توسط سایت <https://string-db.org/> جمع‌آوری شد (شکل ۱). در این برهمکنش‌ها، پروتئین‌های *BMP4*، *ACAN*، *SDC4*، *LAMB2*، *NCAN*، *FN1* با پروتئین *TNC* در ارتباط هستند. سپس، مجموعه شبکه پروتئینی *TNC* توسط ابزارهای مسیریابی *Reactome* و *KEGG*، آنالیز مسیریابی شدند که مسیرهای بیولوژیکی مرتبط با استخوان‌زایی شامل ماتریکس خارج سلولی (ECM) *Extracellular matrix* و برهمکنش‌های

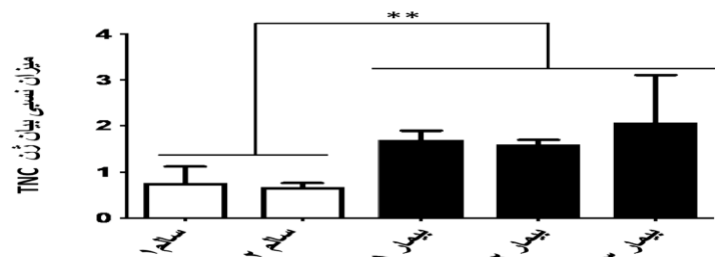
سیندکان (Sdc) *Syndecan* به عنوان مسیرهای معنادار اصلی شناسایی گردیدند (جدول ۵). به دلیل نقش بسیار مهم این سیگنال‌ها به خصوص ماتریکس خارج سلولی در پاتوفیزیولوژی پوکی استخوان (۱۲، ۱۱) و عدم مطالعه اختصاصی ژن *TNC* در روند پوکی استخوان انسان، ارتباط بین بیان این ژن و پوکی استخوان در بیماران مبتلا به سندرم وراثتی پوکی استخوان استئوزنزیز ایمپرکتا مورد بررسی قرار گرفت. بدین منظور، سه جفت پرایمر برای ژن *TNC* طراحی شدند که کارایی آن‌ها با استفاده از منحنی استاندارد و محاسبه R^2 تعیین گردید. پس از تهیه رقت‌های مختلف، میزان R^2 برای جفت پرایمر اول ۰/۹۶۸، برای جفت پرایمر دوم ۰/۶۴ و برای جفت پرایمر سوم ۰/۸۴ محاسبه شد. در نتیجه پرایمر اول و سوم به عنوان پرایمر کارآمدتر برای سنجش بیان ژن *TNC* انتخاب گردیدند. سپس، اختصاصیت هر دو جفت پرایمر با استفاده از منحنی ذوب و مشاهده یک پیک تأیید شد. در نهایت افزایش معنادار بیان ژن *TNC* با استفاده از نمونه‌های سری اول ($p = ۰/۰۰۵$) و سری دوم ($p = ۰/۰۰۷$) از طریق آنالیز Student t.test تأیید شد (شکل ۲ و ۳). که می‌تواند نشان‌دهنده نقش احتمالی این ژن در روند استخوان‌زایی طبیعی و پوکی استخوان در دوران پیری باشد.

جدول ۵: مسیرهای به دست آمده از شبکه پروتئینی *TNC*

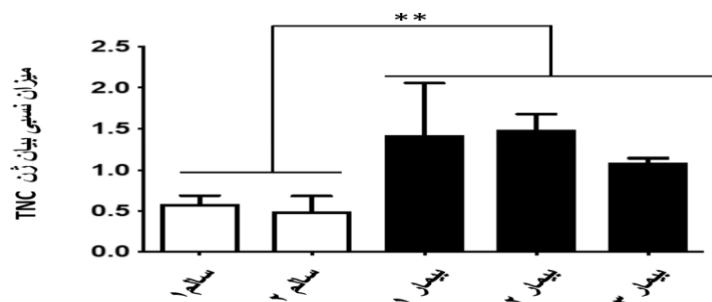
| نام ابزار مسیریابی | نام مسیر بیولوژیکی | ژن‌های دخیل در مسیر بیولوژیکی | سطح معناداری (P) |
|--------------------|--|--|------------------------|
| KEGG | ECM-receptor interaction | LAMB2; TNC; LAMC1; SDC4; FN1 | $1/1 \times 10^{-6}$ |
| Reactome | Extracellular matrix organization | BMP4; ACAN; SDC4; LAMB2; NCAN; FN1; TNC; LAMC1 | $6/3 \times 10^{-11}$ |
| Reactome | ECM proteoglycans | ACAN; LAMB2; NCAN; FN1; TNC; LAMC1 | $4/5 \times 10^{-11}$ |
| Reactome | Non-integrin membrane-ECM interactions | SDC4; LAMB2; FN1; TNC; LAMC1 | $1/0.7 \times 10^{-6}$ |
| Reactome | Syndecan interactions | SDC4; FN1; TNC | $6/3 \times 10^{-6}$ |



شکل ۱: برهمکنش‌های مولکولی بین TNC و سایر پروتئین‌ها در انسان. پروتئین‌های شبکه شامل TNC، ACAN، SDC4، NCAN، FN1، BMP4، IL6، LAMB2، C4A، ALB، LAMC1 هستند که از جمله آن‌ها می‌توان به پروتئین BMP4 و ACAN اشاره کرد. پروتئین BMP4 به صورت مستقیم در القای تشکیل استخوان و غضروف نقش دارد و همچنین پروتئوگلیکان ACAN به عنوان اصلی ماتریکس خارج سلولی بافت غضروف است و در ناهنجاری‌های استخوانی مثل آرتروز دخیل می‌باشد.



شکل ۲: افزایش معنادار بیان ژن TNC در افراد بیمار نسبت به افراد سالم. در این بررسی از نمونه‌های سری اول و جفت پرایمر اول استفاده شده است. $p < 0.01$ * اختلاف معنادار بیان TNC بین گروه افراد بیمار و سالم را نشان می‌دهد.



شکل ۳: افزایش معنادار بیان ژن TNC در افراد بیمار نسبت به افراد سالم. در این بررسی از نمونه‌های سری دوم و جفت پرایمر سوم استفاده شده است. $p < 0.01$ * اختلاف معنادار بیان TNC بین گروه افراد بیمار و سالم را نشان می‌دهد.

شکندگی استخوان می‌گردد (۱۳). بازسازی استخوان فرایندی مداوم در طول زندگی است که در سه دهه اول، به صورت یک ارتباط پایدار و ثابت بین جذب استخوان و تشکیل استخوان وجود دارد و با افزایش سن این تعادل به هم می‌خورد (۱۴). مطالعه اختصاصی پوکی استخوان در افراد مسن به دلیل

بحث

پوکی استخوان به عنوان یک بیماری اسکلتی سیستماتیک و اختلال مرتبط با سن تعریف می‌شود که با کمبود تراکم و تغییر بافت استخوانی همراه است و در نهایت منجر به افزایش

سلولی مانند چسبندگی، مهاجرت، تکثیر، تمایز و بقا حائز اهمیت هستند. هرگونه نقص ساختاری ارثی یا اکتسابی و یا اختلال متابولیکی در ECM ممکن است باعث ایجاد تغییرات سلولی و در نتیجه پیشرفت بیماری در بافت خاصی گردد (۱۹). وجود بیش از صد نوع پروتئین ECM در بافت استخوان و نقش اساسی این پروتئین‌ها در روند بازسازی آن، نشان‌دهنده اهمیت پروتئین‌های ECM در فیزیولوژی بافت استخوان و بیماری‌های وابسته به آن است. به‌طور کلی، استخوان‌ها در طول زندگی برای حفظ ساختار و عملکرد قوی به‌طور مداوم بازسازی می‌شوند و بازسازی ناکارآمد باعث ایجاد شرایط پاتولوژیک از جمله پوکی استخوان می‌گردد.

پروتئین‌های ECM نقش بسیار مهمی در روند بازسازی استخوان از طریق ایجاد فعالیت متعادل بین سلول‌های استئوکلاست در بازجذب استخوان و سلول‌های استئوبلاست در تولید استخوان جدید ایفا می‌کنند. هم‌چنین، پروتئین‌های ECM از جمله کلاژن نوع I می‌توانند به عنوان داربستی برای اتصال مواد معدنی عمل کنند. علاوه‌براین، ECM فرایند تمایز سلول‌های بنیادی مزانشیمی به سلول‌های استئوبلاست را به‌طور مستقیم از طریق برهمکنش مستقیم سلول-ECM و تعدیل فعالیت فاکتور رشد کنترل می‌کند. به‌طور مشابه، ECM می‌تواند بر تکامل استئوکلاست‌ها از سلول‌های پیش‌ساز ماکروفاژ تمایز نیافته تأثیر بگذارد و عملکرد استئوکلاست را از طریق اتصال مستقیم این سلول‌ها به اجزای ماتریکس تنظیم کند (۲۰). نکته قابل توجه اینکه فراتر از تراکم و محتوای مواد معدنی، یکپارچگی ECM در مقاومت به شکستگی استخوان نقش دارد. پروتئین‌های ECM به‌طور اختصاصی برای جلوگیری از شروع و انتشار آسیب‌های کوچک سازماندهی شده‌اند و طی روند پیری، تغییراتی در ECM رخ می‌دهد که باعث شکننده شدن استخوان می‌گردد (۲۱). علاوه بر ECM، شبکه پروتئینی TNC در مسیر مربوط به برهمکنش‌های سیندکان نقش دارد. این خانواده ۴ عضو دارد (Sdc 1-4) که این پروتئین‌های غشایی از یک هسته پروتئینی و زنجیره‌های گلیکوزآمینوگلیکان تشکیل شده‌اند. هرچند این چهار سیندکان عملکردهای

پیچیدگی روند پیری و همراه بودن این فرایند با بیماری‌های زمینه‌ای دیگر مانند دیابت، فشار خون، قند خون و بیماری‌های قلبی و عروقی بسیار دشوار است. در مقابل، بیماری‌های نادر و ارثی معمولاً در اثر جهش در یک ژن ایجاد می‌شوند و مطالعه بر روی این بیماری‌ها سبب شناسایی مکانیسم‌های اختصاصی در روند بیماری‌زایی می‌شود. در این مطالعه، سه بیمار خویشاوند مبتلا به استئوزنیز ایمپرکتا با پوکی استخوان بسیار شدید و شکستگی‌های متعدد استخوانی شناسایی شدند و ژن TNC به عنوان کاندید اولیه انتخاب گردید. TNC یک عضو از خانواده گلیکوپروتئین‌های Tenascin است. Tenascin‌ها گلیکوپروتئین‌های ماتریکس سلولی هستند که در طی تکامل و بازسازی بافت بیان می‌شوند. علاوه‌براین، بیان Tenascin‌ها تحت شرایط پاتولوژیک شامل زخم‌های پوستی، آترواسکلروز، آسم و سرطان افزایش می‌یابد (۵). Tenascin‌ها هم‌چنین تمایز و تکثیر استئوبلاست را تعدیل می‌کنند و در آسیب‌شناسی‌های مربوط به اسکلت از جمله تومورهای استخوان و استئوآرتریت نقش دارند (۱۶، ۱۵). این گلیکوپروتئین‌ها نقش مهمی در چسبندگی استئوکلاست و ترمیم شکستگی دارند به‌طوری‌که در موش فاقد TNC در هنگام ترمیم شکستگی، جذب نامناسب و تولید بیش از حد استخوان رخ می‌دهد (۱۷). در مهره‌داران خانواده Tenascin دارای چهار عضو C، W، R و Xb هستند و از این میان Tenascin-C و Tenascin-W به‌طور عمده در تکامل اسکلتی نقش دارند (۱۸). در این مطالعه، ابتدا شبکه پروتئینی TNC به‌دست آمد و سپس به‌طور اختصاصی، این شبکه پروتئینی توسط ابزارهای KEGG و Reactome مسیریابی شدند. مسیرهای معنادار اصلی به‌دست آمده به‌طور کلی شامل مسیرهای مرتبط با ماتریکس خارج سلولی (ECM) و برهمکنش‌های سیندکان (Sdc) هستند. ماتریکس خارج سلولی شامل طیف وسیعی از ماکرومولکول‌ها می‌باشد که به انواع کلاژن، الاستین و پروتئین‌های میکروفیبریل‌دار و هم‌چنین پروتئوگلیکان‌ها از جمله هیالورونان و گلیکوپروتئین‌های غیرکلاژن طبقه بندی می‌شوند. مولکول‌های ECM علاوه بر نقش ساختاری در کنترل رویدادهای مهم

تأیید شد. تاکنون مطالعات گوناگونی بر روی بیان ژن *TNC* در بیماری‌های مختلف استخوانی صورت گرفته است که نشان‌دهنده افزایش میزان این پروتئین در اختلالات متعدد استخوانی هستند. Ozkan و همکارانش در سال ۲۰۱۵ افزایش معنادار بیان *TNC* را بر روی بیماران مبتلا به بیماری مزمن کلیوی همراه با نقص استخوانی (CKD-MBD) Chronic kidney disease-mineral and bone disorder نشان دادند و به این نتیجه رسیدند که می‌توان این ژن را به عنوان یک بیومارکر برای تشخیص این بیماری در نظر گرفت (۲۶). هم‌چنین Page و همکارانش در سال ۲۰۱۲ گزارش کردند که می‌توان *TNC* را به عنوان بیومارکر فرسایش استخوانی معرفی کرد زیرا سطح پروتئین *TNC* در افراد مبتلا به روماتیسم مفصلی به‌طور قابل ملاحظه‌ای بالاست و بالاترین میزان آن در مرحله نهایی روماتیسم مشاهده شد (۲۷). علاوه بر این، بر اساس مطالعات انجام شده توسط Patel و همکارانش در سال ۲۰۱۱ میزان *TNC* در مایع سینوویال و غضروف زانو بیماران مبتلا به آرتروز به‌طور قابل ملاحظه‌ای افزایش یافته است. یافته‌های آن‌ها نشان می‌دهد که سطح بالای *TNC* می‌تواند واسطه‌های التهابی را القا کند و باعث تخریب ماتریکس در مفاصل بیماران مبتلا به آرتروز شود (۲۸). براساس اطلاعات به‌دست آمده تاکنون هیچ مطالعه‌ای بر روی ارتباط *TNC* با بیماری پوکی استخوان در انسان صورت نگرفته است و تنها مطالعه بر روی نقش *TNC* در پوکی استخوان موش توسط Chen و همکارانش در سال ۲۰۱۶ انجام گرفت و یافته‌های آن‌ها بر خلاف نتایج به دست آمده در این تحقیق نشان داد که کاهش بیان این پروتئین باعث تشدید پوکی استخوان با مهار سیگنال *Wnt* و سرکوب استخوان‌سازی می‌شود (۲۹). این تضاد می‌تواند پیشنهاددهنده پیچیدگی بیان *TNC* در انواع مختلف پوکی استخوان و یا عدم کارآمدی مدل آزمایشگاهی موش برای مطالعه پوکی استخوان در انسان باشد. هم‌چنین سنجش بیان ژن *TNC* بر روی بیماران بیشتر مبتلا به انواع پوکی استخوان برای تأیید داده‌های این مطالعه و معرفی نهایی این ژن به عنوان یک بیومارکر پوکی استخوان لازم است و در صورت

مشترکی دارند اما به نظر می‌رسد که هرکدام از آن‌ها سیگنال‌های منحصربه‌فرد خودشان را دارند و طبق یک الگوی اختصاصی در روند تکامل و در سلول‌های مختلف بیان می‌شوند. به عنوان مثال، بیان پروتئین *Sdc2* در طی تمایز سلول‌های استئوبلاست افزایش می‌یابد. از نظر مکانیسمی هم این پروتئین عملکردهای مختلفی را در سلول‌های استئوبلاست به عنوان یک کمک گیرنده برای فاکتورهای رشد فیبروبلاست و پروتئین‌های *Wnt* انجام می‌دهد و چسبندگی سلولی، تکثیر، تمایز و آپوپتوز را کنترل می‌کند. مطالعات اخیر هم‌چنین نشان می‌دهد که پروتئین *Sdc2* از طریق تعامل با سیگنال Wnt / β -catenin به پاسخ سلول‌های استئوسارکوما به عوامل سمی سلولی کمک می‌کند. علاوه بر این، نقش پروتئین *Sdc2* در پاتولوژی استئوسارکوما و سایر تومورها گزارش شده است (۲۲) و بررسی‌ها نشان می‌دهد که *Sdc2* از جمله ژن‌هایی هست که سهم بسیار مهمی در طی روند بهبودی شکستگی در پوکی استخوان ایفا می‌کند (۲۳). هم‌چنین یافته‌های یک گروه از دانشمندان نشان‌دهنده نقش حیاتی پروتئین *Sdc3* در متابولیسم استخوان از طریق افزایش سیگنال *Wnt* در سلول‌های استئوبلاست و استئوکلاست است. نتایج آن‌ها پروتئین *Sdc3* را به عنوان یک هدف درمانی جدید برای توسعه داروی جدید آنابولیک برای درمان پوکی استخوان معرفی می‌کند (۲۴). علاوه بر این، پروتئین *Sdc4* که به‌طور مستقیم در شبکه پروتئینی *TNC* قرار گرفته با بیماری استخوانی آرتروز در ارتباط است و از طریق دخیل بودن در استخوان‌زایی اندوکندرال در فرایند ترمیم شکستگی نقش دارد (۲۵). به دلیل ارتباط مستقیم سیگنال‌های *ECM* و سیندکان با روند استخوان‌زایی و پوکی استخوان، ژن *TNC* به عنوان کاندید نهایی این مطالعه انتخاب گردید. سپس، برای بررسی ارتباط این ژن با پوکی استخوان، نمونه پوست از افراد مبتلا به پوکی استخوان وراثتی استئوزنریز ایمپرفکتا و افراد سالم گرفته شد. پس از جداسازی سلول‌های فیبروبلاست نمونه‌ها و استخراج RNA، افزایش معنادار بیان ژن *TNC* در افراد بیمار توسط Real-time PCR و در تکرارهای مختلف بیولوژیکی و تکنیکی

استخوان‌زایی و پوکی استخوان طبیعی در دوران پیری باشد و این ژن را به عنوان یک بیومارکر تشخیصی معرفی کند.

سپاس‌گزاری

این مقاله برگرفته از پایان‌نامه دانشگاه اصفهان می‌باشد. نویسندگان تحقیق حاضر از دکتر محمد شبول به دلیل شناسایی بیماران و تهیه نمونه‌های انسانی از کشور اردن کمال تشکر را دارند.

حامی مالی: دانشگاه اصفهان

تعارض در منافع: وجود ندارد.

تأیید افزایش میزان TNC در این بیماران، مهار بیان این ژن می‌تواند به عنوان یک روش کاندید برای درمان پوکی استخوان مورد مطالعه قرار گیرد.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، ارتباط بین ژن TNC و پوکی استخوان در بیماران مبتلا به سندرم پوکی استخوان بسیار نادر و وراثتی استئوژنزیز ایمپرفکتا بررسی گردید و افزایش معنادار بیان ژن TNC در بیماران نسبت به افراد سالم مشاهده شد. این تغییر بیان می‌تواند نشان‌دهنده نقش احتمالی ژن TNC در روند

References:

- 1-Johnell O, Kanis JA. *An Estimate of the Worldwide Prevalence and Disability Associated with Osteoporotic Fractures*. Osteoporosis Int 2006; 17(12): 1726-33.
- 2-Kanis JA, Melton LJ, Christiansen C, Johnston CC, et al. *The Diagnosis of Osteoporosis*. The Lancet 2002; 359: 1929- 36.
- 3-Rodríguez-Rodero S, Fernández-Morera JL, Menéndez-Torre E, Calvanese V, Fernández AF, Fraga MF. *Aging Genetics and Aging*. Aging Dis 2011; 2(3): 186-95.
- 4-Huang S, Ng GC, You-Qiang S. *Genetic Disorders Associated with Osteoporosis*. Advances in Osteoporosis 2015: 19.
- 5-Chiquet-Ehrismann R, Chiquet M. *Tenascins: Regulation and Putative Functions during Pathological Stress*. J Pathol 2003; 200(4): 488-99.
- 6-Sato R, Fukuoka H, Yokohama-Tamaki T, Kaku M, Shibata SH. *Immunohistochemical Localization of Tenascin-C in Rat Periodontal Ligament with Reference to Alveolar Bone Remodeling*. Anat Sci Int 2016; 91(2): 196-206.
- 7-Li C, Li G, Liu M, Zhou T. *Paracrine Effect of Inflammatory Cytokine-Activated Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells and its Role in Osteoblast Function*. J Biosci Bioeng 2016; 121(2): 213-9.
- 8-De Laporte L, Rice JJ, Tortelli F, Hubbell JA. *Tenascin C Promiscuously Binds Growth Factors Via Its Fifth Fibronectin Type III-Like Domain*. Plos One 2013; 8(4): E62076.
- 9-Wang A, Ding X, Sheng S, Yao Z. *Bone Morphogenetic Protein Receptor in the Osteogenic Differentiation of Rat Bone Marrow Stromal Cells*. Yonsei Med J 2010; 51(5): 740-5.
- 10-Shinohara Y, Okamoto K, Goh Y, Kiga N, Tojyo I, Fujita S. *Inhibition of Fibrous Adhesion Formation in the Temporomandibular Joint of Tenascin-C Knockout Mice*. Eur J Histochem 2014; 58(4): 263-70.

- 11-Sroga GE, Vashishth D. *Effects of Bone Matrix Proteins on Fracture and Fragility in Osteoporosis*. Curr Osteoporos Rep 2012; 10(2): 141-50.
- 12-Zhang D, Li X, Pi C, Cai L, Liu Y, Du W, et al. *Osteoporosis-Decreased Extracellular Matrix Stiffness Impairs Connexin 43-Mediated Gap Junction Intercellular Communication in Osteocytes*. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai) 2020; 52(5): 517-26.
- 13-Consensus A. *Consensus Development Conference: Diagnosis, Prophylaxis, and Treatment of Osteoporosis*. Am J Med 1993; 94(6): 646-50.
- 14-Demontiero O, Vidal C, Duque G. *Aging and Bone Loss: New Insights for the Clinician*. Ther Adv Musculoskel Dis 2012; 4(2): 61-76.
- 15-Hasegawa M, Hirata H, Sudo A, Kato K, Kawase D, Kinoshita N, et al. *Tenascin-C Concentration in Synovial Fluid Correlates With Radiographic Progression of Knee Osteoarthritis*. J Rheumatol 2004; 31(10): 2021-6.
- 16-Pazzaglia L, Conti A, Chiechi A, Novello C, Magagnoli G, Astolfi A, Pession A, et al. *Differential Gene Expression in Classic Giant Cell Tumours of Bone: Tenascin C as Biological Risk Factor for Local Relapses and Metastases*. Histopathology 2010; 57(1): 59-72.
- 17-Alford AI, Hankenson KD. *Matricellular Proteins: Extracellular Modulators of Bone Development, Remodeling, And Regeneration*. Bone 2006; 38(6): 749-57.
- 18-Chiquet-Ehrismann R. *Tenascins*. Int J Biochem Cell Biol 2004; 36: 986-90.
- 19-Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. *Extracellular Matrix Molecules: Potential Targets in Pharmacotherapy*. Pharmacological Reviews 2009; 61(2): 198-223.
- 20-Alford AI, Kozloff KM, Hankenson KD. *Extracellular Matrix Networks in Bone Remodeling*. Int J Biochem Cell Biol 2015; 65: 20-31.
- 21-Nyman JS, Makowski AJ. *The Contribution of the Extracellular Matrix to the Fracture Resistance of Bone*. Curr Osteoporos Rep 2012; 10(2): 169-77.
- 22-Mansouri R, Hay E, Marie PJ, Modrowski D. *Role of Syndecan-2 in Osteoblast Biology and Pathology*. Bonekey Reports 2015; 4.
- 23-Gao F, Xu F, Wu D, Cheng J, Xia P. *Identification of Novel Genes Associated with Fracture Healing in Osteoporosis Induced by Krm2 Overexpression or Lrp5 Deficiency*. Mol Med Rep 2017; 15(6): 3969-76.
- 24-De Sousa Brito FM, Butcher A, Pisconti A, Poulet B, et al. *Syndecan-3 Enhances Anabolic Bone Formation through WNT Signalling*. Biorxiv 2019: 846972.
- 25-Bertrand J, Stange R, Hidding H, Echtermeyer F, Nalesso G, Godmann L, et al. *Syndecan 4 Supports Bone Fracture Repair, but Not Fetal Skeletal Development, In Mice*. Arthritis & Rheumatism 2013; 65(3): 743-52.
- 26-Ozkan G, Ulusoy S, Guvercin B, Menteşe A, Karahan SC, Yavuz A. *A New Player in Chronic Kidney Disease Mineral and Bone Disorder: Tenascin-C*. Int J Artif Organs 2015; 38(9): 481-7.
- 27-Page TH, Charles PJ, Piccinini AM, Nicolaidou V, Taylor PC, Midwood KS. *Raised Circulating*

- Tenascin-C in Rheumatoid Arthritis*. Arthritis Res Ther 2012; 14(6): R260.
- 28-Patel L, Sun W, Glasson SS, Morris EA, Flannery CR, Chockalingam PS. *Tenascin-C Induces Inflammatory Mediators and Matrix Degradation in Osteoarthritic Cartilage*. BMC Musculoskelet Disord 2011; 12: 164.
- 29-Chen Y, Chen ZF, He F. *Tenascin-C Knockdown Suppresses Osteoblast Differentiation and Promotes Osteoporosis In Mice By Inhibiting Wnt Signaling*. Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao J Southern Medical University 2016; 36(8): 1117-22.

Exploring the Correlation between *TNC* Gene and Osteoporosis

Nasrinsadat Nabavizadeh¹, Zohreh Hojati^{*2}

Original Article

Introduction: Osteoporosis is one of the main causes of bone fractures in old age. The examination of osteoporosis in the elderly is very complicated due to the heterogeneity of the aging process. This study aimed to investigate the correlation of the *TNC* gene in the patients with an inherited and very rare osteoporosis syndrome. The importance of this study was the identification of a specific biomarker for the osteoporosis process in a monogenic disease.

Methods: In this case-control study, the patients with Osteogenesis Imperfecta were used as a simple and monogenic model to investigate the possibility of *TNC* gene role in osteoporosis. For this purpose, *TNC* protein network and its related biological pathways were firstly evaluated by bioinformatic analysis. Then, skin biopsies were taken from 3 patients with inherited osteoporosis syndrome called Osteogenesis Imperfecta and two healthy individuals. After culturing the biopsy, fibroblast cells were isolated from keratinocyte cells. Then, the total RNA of each sample was extracted from two different passages and cDNA was synthesized. Subsequently, the expression of *TNC* gene was measured by Real-time PCR in healthy and patient cells using various replicates.

Results: *TNC* network proteins are significantly associated with the biological pathways involved in the ossification process. The expression of the *TNC* gene was assessed in wild type and patient cells. Finally, our results confirmed a significant increase in the expression of *TNC* in the patients' compared to wild types' cells by using technical and biological replicates (p:0.005, p:0.007) and Student t-test. In this study, Excel and GraphPad Prism 5.0 software (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA) were used.

Conclusion: Increased expression of *TNC* gene in a monogenic osteoporosis syndrome can indicate the potential role of this gene in the process of bone loss and introduce this gen as a new biomarker for osteoporosis. The study on rare Osteogenesis Imperfecta syndrome is a simple and monogenic model to investigate the heterogeneous osteoporosis. Therefore, the expression of the candidate gene needs to be evaluated and confirmed in an appropriate statistical population composed of patients with osteoporosis.

Keywords: Osteoporosis, Monogenic disease, *TNC*, Real-time PCR, Biological pathways.

Citation: Nabavizadeh N, Hojati Z. Exploring the Correlation between *TNC* Gene and Osteoporosis. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2020; 28(10): 3121-33.

^{1,2}Division of Genetics, Department of Cell and Molecular Biology & Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Isfahan, Iran.

*Corresponding author: Tel: 0913 3287903, email: z.hojati@sci.ui.ac.ir