

Original article

## Computational Study on the Binding of Tracheal Scaffold Extracellular Matrix Fibronectin to the Integrin of Adipose Tissue Stem Cells

Nahumi A<sup>1</sup>, Peymani M<sup>\*1</sup>, Asadi A<sup>\*2</sup>, Abdolmaleki A<sup>3</sup>, Panahi Y<sup>4</sup>, Shahmohammadi M<sup>2</sup>

1. Department of Biology, Faculty of Sciences, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran

3. Department of Biophysics, Faculty of Advanced Technologies, University of Mohaghegh Ardabili, Namin, Iran

4. Department of Basic Medical Sciences, Khoy University of Medical Sciences, Khoy, Iran

\* Corresponding authors. Tel +984531505193, Fax: +984531505187, E-mail: m.peymani@iaushk.ac.ir, asady@uma.ac.ir

### Article info

#### Article history:

Received: Dec 10, 2023

Accepted: Mar 14, 2024

#### Keywords:

Extracellular Matrix  
Fibronectin  
Integrin  
Tissue Engineering  
Trachea

### ABSTRACT

**Background:** Identifying protein interactions is one of the main challenges in the fields of biostructure and molecular biology. Despite extensive progress, the exact patterns of protein-protein interactions are still unknown. The main goal of this study is to computationally evaluate the interactions of fibronectin-1 in the extracellular matrix of decellularized trachea and integrins in adipose tissue stem cells in order to provide the most accurate possible visualization of these interactions and their role in biological processes.

**Methods:** After decellularization of the sheep trachea through the detergent-enzyme method, histological evaluations and ultrastructure photography of the samples were done by scanning electron microscopy. Also, the simulations of fibronectin1 binding of extracellular matrix protein with integrin  $\alpha v\beta 1$  and  $\alpha 5\beta 3$  of stem cells derived from adipose tissue were investigated, and interaction energy analysis was applied to predict the structure of protein-protein complexes using the algorithms available in HDOCK and ClusPro servers.

**Results:** The findings indicated the preservation of extracellular matrix components and scaffold ultrastructure. Also, in order to find the most favorable connection states in terms of energy, some of them were reported as stable interactions among the top types of connections. This insight provides a valuable understanding of cell-matrix adhesion, migration, and signaling, with potential implications for therapeutic development.

**Conclusion:** The prepared scaffolds are ideal for engineering applications for which computational analysis and experimental data have been used for visualization of stable connection states with energy efficiency between fibronectin and integrin. Also, more studies on cell adhesion modeling in connection with tissue engineering science can provide a suitable field for the development of regenerative medicine in further studies.

How to cite this article: Nahumi A, Peymani M, Asadi A, Abdolmaleki A, Panahi Y, Shahmohammadi M. Computational Study on the Binding of Tracheal Scaffold Extracellular Matrix Fibronectin to the Integrin of Adipose Tissue Stem Cells. J Ardabil Univ Med Sci. 2024;23(4):418-435.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial 4.0 International License.

## Extended Abstract

**Background:** The inherent challenges associated with any surgical operation on the airway have made treating tracheal injuries a substantial issue for clinicians for many years. On the other hand, novel approaches in tissue engineering and regenerative medicine show promise in the treatment of long-segment tracheal abnormalities. In tissue engineering, cells are frequently deposited on scaffolds to create new, live tissue for medical purposes. In order to create structures with the right architecture and characteristics for tissue and organ regeneration, tissue engineering integrates scaffolding materials with cells and biologically active molecules. Scaffolding materials and biomolecules are essential for simulating the natural extracellular matrix (ECM). Identifying protein interactions is one of the main challenges in the fields of biostructure and molecular biology. Despite extensive progress, the exact patterns of protein-protein interactions are still unknown. Several families of proteins with diverse origins and functions form the non-collagenous glycoproteins of the ECM. Most of the ECM glycoproteins interact with integrins and other receptors expressed on the cell surface and with collagen or other ECM components. Fibronectins are one of the main families of ECM glycoproteins. Different fibronectins have been extensively studied for their multiple roles in determining stem cell adhesion, cell fate, and ECM-cell interactions. Interactions between the ECM and stem cells can be directly caused by several cell receptors, including integrins and other receptors. An increasing number of studies have shown that integrins are key receptors involved in ECM-stem cell interactions and in stem cell adhesion. Integrins are a large family of heterodimeric transmembrane receptors that connect the extracellular environment to the intracellular cytoskeleton; thus, they are involved in cell migration, proliferation, survival, and differentiation. Integrins are cell receptors

that have been studied extensively. They play a role in cell adhesion, control many cellular functions, and perform their actions by binding ECM glycoproteins such as fibronectin, laminin, and collagen. The specificity of integrin-ligand interaction is determined by different integrin isoforms in their  $\alpha$  and  $\beta$  chains. It is now clear that integrins maintain cell adhesion through multiple interactions with ECM molecules. The main goal of this study is to computationally evaluate the interactions of fibronectin-1 in the extracellular matrix of decellularized trachea and integrins in adipose tissue stem cells in order to provide the most accurate possible visualization of these interactions and their role in biological processes.

**Methods:** After preparing the sheep trachea and cleaning it, the detergent-enzyme method was used for decellularization of the trachea, and then hematoxylin and eosin staining, DAPI fluorescent dye, and Masson's trichrome staining were employed for histological evaluations. Finally, the ultrastructural photography of the scaffold sample and the intact sample was done with a scanning electron microscope. Through an extensive review of previous articles and discoveries, as well as using the Protein Data Bank (PDB), key proteins that met our criteria were identified, namely fibronectin 1 with PDB code: 1fna, and two types of integrins, alpha5-beta3 with PDB code: 3vi3, and alpha v beta1 with PDB code: 1jv2, served as structural models for this research. Also, the simulations of fibronectin1 binding of extracellular matrix protein with integrin  $\alpha v \beta 1$  and  $\alpha 5 \beta 3$  of stem cells derived from adipose tissue were investigated, and interaction energy analysis was applied to predict the structure of protein-protein complexes using the algorithms available in HDOCK and ClusPro servers. Cluspro, a leading web-based platform, offers various algorithms for protein docking. Robust and efficient protein-protein docking is made possible by the fully integrated HDOCK server, which combines biological

information incorporation, macromolecular docking, template-based modeling, and homology search. Using these servers, the protein structures of fibronectin 1, integrin alpha5-beta3, and integrin Alpha beta1 were entered, and they were determined as receptor and ligand molecules to predict potential interaction sites and molecular connections. After receiving the docking results, the output was carefully analyzed, focusing on scoring criteria such as clustering, energy values, and interface properties. The highest-scoring interactions were further analyzed to assess their biological relevance and structural integrity. Notably, the identified 3D structures were visualized and analyzed using PyMOL and Chimera, enabling a comprehensive understanding of the spatial arrangement and molecular interactions.

**Results:** The findings indicated the preservation of extracellular matrix components and scaffold ultrastructure. The results obtained from Hematoxylin and Eosin staining showed that in the scaffold sample, compared to the intact tissue, all cellular and nuclear components were completely removed, while in the control sample, the nuclei of the cells were visible. However, the extracellular matrix remained intact and the DAPI results showed the complete removal of nuclei from the decellularized trachea compared to intact tissues, which indicated complete decellularization. In the results of Masson's trichrome staining, in the scaffold sample compared to the intact tissue, the structure of the extracellular matrix proteins (collagen structure) was almost preserved,

and the decellularization process did not lead to significant destruction of the extracellular matrix. In addition to these, the results obtained from scanning electron microscopy indicated the preservation of tracheal ECM structure after decellularization and indicated the high similarity of ECM ultrastructure in both intact and scaffold samples. Our findings revealed significant interactions between the investigated proteins, which provide insights into the molecular mechanisms and processes of cell adhesion. Also, in order to find the most favorable connection states in terms of energy, some of them were reported as stable interactions among the top types of connections. This insight provides a valuable understanding of cell-matrix adhesion, migration, and signaling, with potential implications for therapeutic development.

**Conclusion:** The prepared scaffolds are ideal for engineering applications, and with computational analysis and experimental data, energy-efficient, stable binding modes between fibronectin and integrin have been visualized. Furthermore, understanding the nuances of integrin-fibronectin interactions could have implications for various pathological conditions, including cancer metastasis and tissue regeneration. This study contributes to a comprehensive understanding of protein interactions in the extracellular matrix. Also, in the future, more studies on cell adhesion modeling in connection with tissue engineering science can provide a suitable field for the development of regenerative medicine.

## ارزیابی محاسباتی اتصال فیبرونکتین ماتریکس خارج سلولی داربست نای و اینتگرین سلول‌های بنیادی بافت چربی

آیدا ناحومی<sup>۱</sup>، مریم پیمانی<sup>۱\*</sup>، اسدالله اسدی<sup>۲</sup>، آرش عبدالمکی<sup>۳</sup>، یاسین پناهی<sup>۴</sup>، محمدعلی شاه محمدی<sup>۵</sup>

۱. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران

۲. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه حقوق اردبیل، اردبیل، ایران

۳. گروه بیوفیزیک، دانشکده فنواری‌های نوین، دانشگاه حقوق اردبیل، نمین، ایران

۴. گروه علوم پایه پزشکی، دانشکده علوم پزشکی خوی، خوی، ایران.

\* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۳۱۵۰۵۱۸۷-۴۵۳۱۵۰۵۱۹۳. پست الکترونیک: m.peymani@iaushk.ac.ir, asady@uma.ac.ir

### چکیده

**زمینه و هدف:** شناسایی برهمکنش‌های پروتئین‌ها یکی از چالش‌های اصلی در زمینه زیست‌ساختاری و بیولوژی مولکولی است. با وجود پیشرفت‌های گسترده، هنوز الگوهای دقیق برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین ناشناخته است. هدف اصلی این مطالعه ارزیابی محاسباتی برهمکنش‌های فیبرونکتین ۱ ماتریکس خارج سلولی نای سلول‌زدایی شده و اینتگرین‌های سلول بنیادی بافت چربی جهت ارائه دقیق‌ترین تصویرسازی ممکن از این تعاملات و نقش آن‌ها در فرآیندهای بیولوژیکی است.

**روش کار:** پس از فرآیند سلول‌زدایی نای گوسفند از طریق روش دترجنت-آنژیمی، ارزیابی‌های بافت‌شناسی و عکس‌برداری از فراساختار نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی نکاره انجام گرفت. همچنین شبیه‌سازی‌های اتصال پروتئین فیبرونکتین ۱ ماتریکس خارج سلولی با اینتگرین  $\alpha v \beta 3$  و  $\alpha 5 \beta 1$  سلول بنیادی مشتق از بافت چربی مورد بررسی قرار گرفت و تجزیه و تحلیل انرژی برهمکنش برای پیش‌بینی ساختار کمپلکس‌های پروتئین-پروتئین با استفاده از الگوریتم‌های موجود در سرورهای ClusPro و HDOCK اعمال شد.

**یافته‌ها:** یافته‌ها حاکی از حفظ اجزای ماتریکس خارج سلولی و فراساختار داربست بود. همچنین برای یافتن مطلوب‌ترین حالات‌های اتصال از نظر انرژی، تعدادی از آن‌ها از بین انواع اتصالات برتر به عنوان برهمکنش‌های پایدار گزارش شدند. این بینش درک ارزشمندی از چسبندگی ماتریکس سلولی، مهاجرت و سیگنال‌دهی، با پیامدهای بالقوه برای توسعه درمانی ارائه می‌دهد.

**نتیجه گیری:** داربست‌های تهیه شده، برای کاربردهای مهندسی ایده‌آل بوده و با تحلیل‌های محاسباتی و داده‌های تجربی، حالات‌های اتصال پایدار با بهره‌وری انرژی بین فیبرونکتین و اینتگرین تجسم یافته است. همچنین در آینده مطالعات بیشتر در مدل‌سازی چسبندگی سلولی در ارتباط با علم مهندسی بافت، می‌تواند بستر مناسبی جهت توسعه پزشکی بازساختی فراهم کند.

**واژه‌های کلیدی:** ماتریکس خارج سلولی، فیبرونکتین، اینتگرین، مهندسی بافت، نای

دریافت: ۱۴۰۲/۹/۱۹ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۲/۲۴

## مقدمه

جایگزینی نقایص نای یک موضوع پیچیده است که علیرغم پیشرفت‌های حاصل شده در پزشکی مدرن، تاکنون موفقیت بالینی کمی داشته است [۱]. مهندسی بافت، علمی است که با ترکیب سلول‌ها و داربست یک جایگزین بالقوه برای ترمیم ضایعات نای می‌باشد. یک داربست ایده‌آل برای مهندسی بافت نای، باید شکل لوله‌ای خاص برای تنفس، استحکام مکانیکی کافی برای جلوگیری از فروپاشی، ساختار ماتریکس خارج‌سلولی (ECM<sup>۱</sup>) بیومیمتیک برای چسبندگی و تکثیر سلولی و زیست‌فعالی مطلوب برای بازسازی غضروف را دارد باشد [۲,۳]. داربست سلول زدایی‌شده (DTS<sup>۲</sup>) با حذف اجزای سلولی و هسته‌ای از نای دهنده از طریق روش‌های شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی به دست می‌آید و بهدلیل عدم پاسخ ایمنی، زیست‌سازگاری بالینی دارد [۴]. داربست سلول زدایی‌شده در مقایسه با داربست مصنوعی نای، ماتریکس خارج‌سلولی (ECM) و ساختار ۳ بعدی نای طبیعی را حفظ می‌کند، چسبندگی و بازسازی سلول را تسهیل کرده و باکتری‌ها را مهار می‌کند [۵].

ماتریکس خارج‌سلولی (ECM) یک شبکه سه بعدی (3-D) از ماکرومولکول‌های خارج‌سلولی است که پشتیبانی ساختاری، مکانیکی و بیوشیمیایی را برای سلول‌ها و بافت‌هایی که ارگانیسم‌های پیچیده را تشکیل می‌دهند، فراهم می‌کند. به طور فزاینده ای آشکار می‌شود که ECM نقشی حیاتی در توسعه و نگهداری بافت‌های بالغ سالم ایفا می‌کند [۶]. در سالیان گذشته، ECM به دلیل نقش ساختاری و حمایت از سلول‌های اطراف خود مورد توجه بوده است [۷]. تنوع بیوشیمیایی و ساختاری ECM، همراه با ماهیت پویا و چند عاملی آن، نقش عملکردی ایفا می‌کند. علیرغم پیشرفت‌های حیاتی در زمینه تحقیقات ECM، مطالعات بیشتری برای درک کامل

مکانیسم‌های مختلف تنظیم‌کننده تعامل ECM-Sلول (Cell-ECM) مورد نیاز است [۸]. ECM پستانداران از حدود ۳۰۰ پروتئین به هم پیوسته تشکیل شده است و به خوبی در ساختارهای سه بعدی سازماندهی شده است [۹]. در سال ۱۹۸۴، اصطلاح «ماتریزوم» توسط مارتین<sup>۳</sup> و همکاران برای به دست آوردن تصویری از اجزای عملکردی غشای پایه پیشنهاد شد. این تعریف سپس به پروتئین‌های ساختاری ECM تعمیم داده شده است [۱۰]. بر اساس این طبقه‌بندی ماتریزوم، ماتریکس خارج‌سلولی شامل اجزای متعددی است که از جمله آن‌ها می‌توان به پروتئین‌های فیبری، گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌ها اشاره کرد [۸].

چندین خانواده از پروتئین‌ها با منشاء و عملکردی‌های متنوع، گلیکوپروتئین‌های غیرکلائیزی ECM را تشکیل می‌دهند. در میان آن‌ها، گلیکوپروتئین‌های چسبندۀ، دسته‌ای از ماکرومولکول‌های ECM هستند که به اشکال مختلف وجود دارند که با دمین‌های<sup>۴</sup> اتصال متعددی قادر به تعامل با کلائز و پروتئوگلیکان‌ها و اتصال سطوح سلولی هستند [۱۱]. گلیکوپروتئین‌های چسبندۀ شامل فیبرونکتین<sup>۵</sup> (FN)، لامینین<sup>۶</sup> (LM)، ویترونکتین<sup>۷</sup> (VN)، ترومبوسپوندین‌ها<sup>۸</sup> (TSPs) و تناسین<sup>۹</sup> (TN) هستند. بیشتر گلیکوپروتئین‌های ECM با اینتگرین‌ها و سایر گیرنده‌های بیان شده در سطح سلول و با کلائز یا سایر اجزای ECM تعامل دارند [۱۲].

فیبرونکتین‌ها یکی از خانواده‌های اصلی گلیکوپروتئین‌های ECM هستند. فیبرونکتین‌های مختلف به خاطر نقش‌های متعددشان در تعیین

<sup>3</sup> Martin

<sup>4</sup> Adhesive Glycoproteins

<sup>5</sup> Domain

<sup>6</sup> Fibronectin

<sup>7</sup> Laminin

<sup>8</sup> Vitronectin

<sup>9</sup> Thrombospondins

<sup>10</sup> Tenascin

<sup>1</sup> Extracellular Matrix

<sup>2</sup> Decellularized Tracheal Scaffold

بسیاری از فرآیندهای سلولی که با تنظیم مسیرهای سیگنالی مختلف، بر زندگاندن و تمایز سلول نیز تأثیر می‌گذارد، دخیل است [۲۰].

در مطالعات پیشین نشان داده شده است که اینتگرین  $\alpha 2\beta 1$  یا  $\alpha 1\beta 1$  برهمکنش کافی MSC مغز استخوان انسان با کلژن نوع I را فراهم می‌کند که با فعال کردن مسیر بقای پروتئین کیناز B (PKB/Akt) بقای [۲۱]. سلول و تمایز استخوانی را تضمین می‌کند [۲۱]. همچنین نتایج مشابهی در مطالعه آبشارهای سیگنالینگ فعال شده اینتگرین  $\alpha 5$  در MSC مغز استخوان انسان در طی تمایز استئوبلاست به دست آمده است [۲۲]. نتایج یک مطالعه دیگر نشان داده است که اینتگرین در FAK-MSC مغز استخوان موش، فسفوریلاسیون- $\beta$ -کاتنین و GSK3 $\beta$  را فعال می‌کند که از تخریب- $\beta$ -کاتنین و wnt1 انتقال هسته‌ای برای اتصال به پروموتور جلوگیری می‌کند [۲۳]. علاوه بر این، خاموش کردن زیر واحد  $\beta 1$  باعث کاهش تمایز استخوان زایی و غضروفی سلول‌های بنیادی مزانشیمی مغز استخوان انسان می‌شود [۲۴].

در این مطالعه، به دلیل این که سلول‌ها از طریق شبکه‌ای به نام ماتریکس خارج سلولی (ECM) به هم متصل می‌شوند و یکی از اجزای ضروری ECM مهاجرت سلولی، تکثیر، بقا و تمایز دخیل هستند [۱۶]. پروتئین فیبرونکتین است که در فیبریل‌های جمع می‌شود که سلول‌ها را به ECM متصل می‌کنند، هدف ما بررسی برهمکنش فیبرونکتین ۱ ماتریکس خارج سلولی نای سلول‌زدایی شده با اینتگرین  $\alpha 7\beta 3$  و  $\alpha 5\beta 3$  سلول بنیادی مشتق از بافت چربی از طریق رویکردهای محاسباتی برای ارزیابی پروتئین-پروتئین است.

### روش کار ملاحظات اخلاقی

این مطالعه تجربی در گروه زیست‌شناسی دانشگاه محقق اردبیلی انجام گرفت. در این تحقیق از مدل حیوانی گوسفندی استفاده شده است. تاییدیه اخلاقی

چسبندگی سلول‌های بنیادی، سرنوشت سلول و تعامل سلول-ECM به طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۳]. به همین دلیل، فیبرونکتین اغلب به عنوان پوشش برای کشت سلولی، در دستگاه‌های میکروسیال، در کشت‌های دو بعدی یا در داربست‌های سه بعدی استفاده می‌شود [۱۴]. یکی از مشخص‌ترین عملکردهای ECM فراهم کردن یک بستر چسبندگی ساختاری است که اینتگرین‌ها و سایر گیرنده‌های سلول چسبندگی توانند به آن متصل شوند [۱۵]. فعل و انفعالات بین ECM و سلول‌های بنیادی می‌تواند مستقیماً توسط تعدادی گیرنده سلولی از جمله اینتگرین‌ها و گیرنده‌های دیگر ایجاد شود. تعداد فرازینده‌های کلیدی هستند که در تعاملات سلول بنیادی-ECM و در چسبندگی، لنگر انداختن و لانه‌گزینی سلول‌های بنیادی نقش دارند.

اینتگرین‌ها خانواده بزرگی از گیرنده‌های گذرنده از غشا هترودیمری هستند که محیط خارج سلولی را به اسکلت داخل سلولی متصل می‌کنند، بنابراین در مهاجرت سلولی، تکثیر، بقا و تمایز دخیل هستند [۱۶]. انواع مختلف اینتگرین در اتصال مستقیم به تعدادی از اجزای ماتریکس خارج سلولی نقش دارند [۱۷، ۱۸]. اینتگرین‌ها گیرنده‌های سلولی هستند که مطالعات فراوانی درباره آن‌ها انجام شده‌است. آن‌ها در چسبندگی سلولی نقش دارند و بسیاری از عملکردهای سلولی را کنترل می‌کنند و اعمال خود را با اتصال گلیکوپروتئین‌های ECM مانند FN و LM و کلژن و غیره انجام می‌دهند [۱۹]. ویژگی تعامل اینتگرین در لیگاند توسط ایزوفرم‌های مختلف اینتگرین در زنجیره‌های  $\alpha$  و  $\beta$  آنها تعیین می‌شود. اکنون واضح است که اینتگرین‌ها با برهمکنش‌های متعدد با مولکول‌های ECM، چسبندگی سلولی را حفظ می‌کنند. مسیر انتقال سریع و کارآمد با واسطه اینتگرین‌ها به عنوان سیگنال‌دهی Inside-Out شناخته می‌شود و نه تنها در چسبندگی یا مهاجرت سلولی، بلکه در

(سیگما آلدربیج) و DAPI<sup>۱</sup> (ترمو فیشر ساینتیفیک) رنگ آمیزی شدند.

**بررسی فراساختاری داربست سلول‌زدایی شده با نای دست نخورده در سطح میکروسکوپ الکترونی نگاره نمونه‌های نای دست نخورده و سلول‌زدایی شده، به مدت یک شب در دمای اتاق در گلوتارآلدئید (سیگما آلدربیج) ۲/۵٪ ثابت شدند و سه مرتبه با همان بافر شستشو داده شدند. سپس با درصدهای مختلف اتانول (۱۰۰٪ و ۷۰٪ و ۵۰٪) آبگیری شدند. در نهایت پس از خشک کردن، با پوشش طلا-پالادیوم پوشانده شده و سپس از طریق میکروسکوپ الکترونی رویشی (SEM, SU4800, Hitachi, Japan) مورد بررسی قرار گرفتند.**

#### بازیابی انتخاب ساختارهای پروتئینی انتخاب پروتئین‌های هدف

در ابتدا، پروتئین‌های هدف برای بررسی انتخاب شدند. دو نوع اینتگرین از بانک اطلاعات پروتئین PDB (PDB) شناسایی شد: اینتگرین آلفا-۵-بتا ۳ با کد 3VI3 و آلفا-۷-بتا ۱ با کد 1JV2). این انتخاب‌ها بر اساس بالاترین میزان تعامل آنها با پروتئین فیبرونکتین ۱ در ماتریکس خارج سلولی (FNA1 PDB) کد ۱FNA1 بود. این پروتئین‌ها به دلیل نقش حیاتی آنها در چسبندگی و سیگنال دهنی سلولی، به ویژه در تعامل با فیبرونکتین ماتریکس خارج سلولی، برای مطالعه انتخاب شدند [۲۸-۲۵].

#### آماده سازی ساختار

##### آماده سازی ساختارهای پروتئینی:

آماده سازی پروتئین مناسب قبل از آنالیز داکینگ برای نتایج دقیق ضروری است. که شامل به دست آوردن یک ساختار پروتئینی با کیفیت بالا به واسطه حذف مولکول‌های آب و سایر مولکول‌های کوچک مانند لیگاندها، پیونه‌سازی جهت‌گیری زنجیره‌های جانبی، اختصاص دادن و مشخص کردن بارها و انواع

<sup>۱</sup> 4',6-diamidino-2-phenylindole

این پژوهش توسط کمیته اخلاق دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد به شماره مرجع IR.IAU.SHK.REC.1401.078 صادر شد.

#### سلول‌زدایی نای گوسفند

به منظور تبیه داربست‌های نای سلول‌زدایی شده، نای‌های گوسفند خریداری شده به طور کامل پاکسازی شدند. سپس نمونه‌ها سه مرتبه با آب شستشو داده شدند و در بافر فسفات (PBS) به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. نای‌ها به قطعات کوچک‌تر برش داده شدند و در سه چرخه انجاماد و ذوب به مدت ۵ دقیقه در نیتروژن مایع قرار گرفتند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در بافر فسفات حاوی ۰/۲۵٪ تربیتون ایکس-۱۰۰ (مرک) و ۰/۰۵٪ سدیم دئوکسی‌کولات (سیگما آلدربیج) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه شدند. مجدداً قطعات نای سه مرتبه با بافر فسفات به مدت ۱۰ دقیقه شسته شدند. سپس، قطعات نای به مدت ۲۴ ساعت در بافر فسفات حاوی MgCl<sub>2</sub> روی U/ml DNase-I ۱۵۰ و ۵۰ میلی‌مولار DNase از تیمار با شیکر قرار گرفت. پس از تیمار با DNase، قطعات نای به مدت یک شب به ایزوپرپانول انتقال یافت و پس از آن، سه بار شستشو با بافر فسفات هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. در نهایت، قطعات سلول‌زدایی شده نای در بافر فسفات حاوی ۰/۱ آنتی‌بیوتیک / ضدقارچ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

ارزیابی‌های بافتی داربست‌های نای سلول‌زدایی شده از نمونه‌ها پس از انجام مراحل فیکس کردن، آب‌گیری و قالب‌گیری با پارافین بهوسیله میکروتووم برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تبیه گردید. در ادامه جهت رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی، پارافین‌زدایی مقاطع انجام شده و بافت‌ها روی لامها با هماتوکسیلین و اوزین (سیگما آلدربیج) رنگ‌آمیزی شدند. علاوه بر این، نمونه‌های نای دست نخورده و سلول‌زدایی شده، جهت شناسایی رشته‌های کلائز و مواد هسته‌ای به ترتیب توسط ماسون تریکروم

کارایی پیش‌بینی محل اتصال را با تشخیص الگوها و روابط پیچیده در ساختارهای پروتئینی افزایش دهنده. به طور کلی، پیش‌بینی مکان‌های اتصال در پروتئین‌ها جنبه محوری زیست‌شناسی ساختاری و کشف دارو را نشان می‌دهد و بینش‌های ارزشمندی را در مورد فعل و افعال مولکولی برای درک فرآیندهای بیولوژیکی و طراحی درمان‌های هدفمند ارائه می‌دهد.

**تجزیه و تحلیل برهمکنش پروتئین ۱ و اینتگرین‌ها**  
تحقیقات بیشتری برای افزایش درک ما از تعامل بین اینتگرین  $\alpha v \beta 1$  و  $\alpha 5 \beta 3$  با فیبرونکتین ۱ انجام شد. با استفاده از تکنیک‌های محاسباتی، ساختار سه بعدی فیبرونکتین ۱ از بانک داده‌های پروتئین (PDB) به دست آمد. پس از آن، الگوریتم‌های پیش‌بینی کننده برای شناسایی مکان‌های اتصال بالقوه بر روی مولکول فیبرونکتین استفاده شد. این رویکرد یک کاوش جامع از چشم‌انداز برهمکنش پروتئین-پروتئین در ماتریکس خارج سلولی را تسهیل کرد.

شایان ذکر است که استفاده از ابزارهای محاسباتی، از جمله الگوریتم‌های تعییه شده در سرورهای ذکر شده، امکان کاوش و پیش‌بینی مطلوب‌ترین مکان‌های اتصال برای پروتئین‌های مورد مطالعه را فراهم کرد. علیرغم مطالعات مقالات، هیچ تحقیق یا مقاله‌ای به طور قطعی مکان‌های اتصال بینه اینتگرین  $\alpha v \beta 1$  و  $\alpha 5 \beta 3$  را با فیبرونکتین ۱ گزارش نکرده است. بنابراین، مطالعه حاضر پیش‌بینی مکان‌های اتصال بالقوه را با استفاده از تکنیک‌های محاسباتی پیشرفته مهیا می‌کند و به جنبه‌های حیاتی برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین در ماتریکس خارج سلولی اشاره می‌کند [۳۹].

### انتخاب سرورهای Docking

#### معیارهای انتخاب سرور

شبیه‌سازی داکینگ پروتئین-پروتئین به سرورهایی با تکنیک‌های قوی و الگوریتم‌های مختلف نیاز داشت. سابقه سرور در پیش‌بینی قابل اعتماد برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین، رابطه‌ای کاربرپسند، و افزودن

اتم‌ها، و انجام به حداقل رساندن انرژی برای اطمینان از پایداری است. این مراحل، مصنوعات و نادرستی‌ها را به حداقل می‌رساند و قابلیت اطمینان شبیه‌سازی‌های اتصال را بهبود می‌بخشد.

#### شناسایی جایگاه‌های برهمکنش پروتئین-پروتئین

پیش‌بینی مکان‌های اتصال، که به عنوان جایگاه‌های فعال نیز شناخته می‌شوند، در پروتئین‌ها شامل یک رویکرد چند وجهی با استفاده از روش‌های پیشرفته بیوانفورماتیک است که در سرور مورد نظر اعمال می‌شود. این تکنیک‌ها از الگوریتم‌های تخصصی طراحی شده مانند روش (FFT)<sup>۱</sup> برای سرور HDOCK و روش (RRF)<sup>۲</sup> برای سرور Cluspro تشخیص نواحی برهمکنش بالقوه بر اساس عوامل مختلفی، از جمله ویژگی‌های سطح، پتانسیل‌های الکترواستاتیک، و موتیف‌های اتصال شناسایی شده ذاتی پروتئین‌های مورد بررسی، استفاده می‌کند.

همچنین، این فرآیند اغلب ابزارهای محاسباتی و پایگاه داده‌های مختلف را برای افزایش دقیق و قابلیت اطمینان یکپارچه می‌کند. به عنوان مثال، شبیه‌سازی‌های اتصال مولکولی ممکن است برای پیش‌بینی آرایش فضایی برهمکنش‌های پروتئین-پروتئین به کار گرفته شوند. در حالی که پایگاه‌های داده ساختاری مانند بانک داده‌های پروتئین ((PDB) (https://www.rcsb.org/)) مخزن وسیعی از ساختارهای پروتئینی تعیین شده تجربی را برای تجزیه و تحلیل و اعتبارسنجی مقایسه‌ای فراهم می‌کند. علاوه بر این، پیشرفته‌ها در یادگیری ماشینی و هوش مصنوعی این حوزه را متحول کرده است و امکان توسعه مدل‌های پیش‌بینی آموزش دیده<sup>۳</sup> بر روی مجموعه داده‌های وسیعی از ساختارهای پروتئینی شناخته شده و تعاملات پیوندی را فراهم کرده است. این مدل‌ها می‌توانند به طور قابل توجهی دقیق و

<sup>1</sup> Fast Fourier Transform

<sup>2</sup> Reweighted Random Forest

<sup>3</sup> Machine Learning

دقت برای به حداقل رساندن صحت پیش‌بینی پیکربندی شدند.

### اجرا داکینگ

شبیه‌سازی‌های Docking بر روی سرورهای انتخابی اجرا شد که منجر به مجموعه‌ای از کمپلکس‌های پروتئین-پروتئین بالقوه شد. الگوریتم‌های HDOCK و ClusPro فضای ساختاری را برای یافتن مطلوب‌ترین حالت‌های اتصال از نظر انرژی جستجو کردند [۳۱، ۳۲-۳۵].

### امتیازدهی و رتبه‌بندی

سیستم‌های امتیازدهی استفاده شده توسط HDOCK و ClusPro اجزای اساسی در ارزیابی و رتبه‌بندی کمپلکس‌های پروتئین-پروتئین پیش‌بینی شده هستند. این سیستم‌های امتیازدهی نقش مهمی در ارزیابی کیفیت و قابلیت اطمینان نتایج اتصال دارند و محققان را در شناسایی محتمل‌ترین پیکربندی‌های اتصال راهنمایی می‌کنند.

HDOCK از یکتابع امتیازدهی استفاده می‌کند که پارامترهای فیزیکی-شیمیایی مختلف، از جمله برهمکنش‌های واندروالس، نیروهای الکترواستاتیک، انرژی تجزیه و پیوند هیدروژنی را ادغام می‌کند. هدف این تابع امتیازدهی ارزیابی کمی تناسب هر کمپلکس پیش‌بینی شده با در نظر گرفتن مکمل بودن رابطه‌های پروتئین-پروتئین و انرژی برهمکنش‌های اتصال است. علاوه بر این، HDOCK از الگوریتم‌های بهینه‌سازی پیشرفته برای کاوش کارآمد فضای ساختاری و شناسایی مطلوب‌ترین حالت‌های اتصال از نظر انرژی استفاده می‌کند.

از سوی دیگر، ClusPro از یک سیستم امتیازدهی استفاده می‌کند که اصطلاحات انرژی تجربی را با الگوریتم‌های خوش‌بندی ترکیب می‌کند تا کیفیت کمپلکس‌های پیش‌بینی شده را ارزیابی کند. تابع امتیازدهی در ClusPro انرژی برهمکنش، مکمل شکل و مخاطبین رابط هر مجموعه را ارزیابی می‌کند. علاوه بر این، ClusPro از یک الگوریتم خوش‌بندی برای

سیستم‌های امتیازدهی پیشرفته برای ارزیابی نتایج، همه، معیارهای انتخاب بودند.

### انتخاب سرورهای Docking

ClusPro و HDOCK به دلیل رویکردهای متمایز و در عین حال مکمل خود برای داکینگ پروتئین-پروتئین انتخاب شدند. از یک فرآیند دو مرحله‌ای داکینگ استفاده می‌کند، در حالی که HDOCK از یک روش هیبرید استفاده می‌کند که مدل‌سازی مبتنی بر الگو و داکینگ اولیه را با هم ترکیب می‌کند [۳۰-۳۲].

### نحوه استفاده از سرورها

استفاده از سرورهای ClusPro و HDOCK برای مطالعات اتصال پروتئین-پروتئین، با دسترسی به وب سایتهای <http://hdock.phys.hust.edu.cn> و <https://cluspro.org/help.php> امکان‌پذیر است. در ClusPro، ساختارهای پروتئینی در قالب PDB آپلود شده و گزینه‌های docking قبل از ارسال کار انتخاب شدند. پس از اتمام فرآیند اتصال، نتایج با استفاده از ابزارهای ClusPro تجزیه و تحلیل و تجسم شده و مدل‌ها برای تجزیه و تحلیل بیشتر دانلود شدند. به طور مشابه، در HDOCK، ساختارهای پروتئینی آپلود شده، پارامترهای اتصال پیکربندی گردید، و کار ارسال شده و نتایج مرور شد، مدل‌ها تجسم گردید و آن‌ها همراه با هر داده مرتبط دانلود شدند. این مراحل ما را قادر به شبیه‌سازی‌های اتصال کرده و بینش‌هایی را در مورد فعل و انفعالات پروتئین-پروتئین به طور کارآمد در اختیارمان می‌گذارد.

### شبیه‌سازی داکینگ پروتئین-پروتئین

#### آماده‌سازی ورودی<sup>۱</sup>

شبیه‌سازی‌های داکینگ با استفاده از ساختارهای پروتئینی آماده شده و اطلاعات محل اتصال به عنوان ورودی اجرا شد. هر سرور داکینگ به فرمتهای پارامترهای ورودی منحصر به فرد نیاز داشت، که به

<sup>۱</sup> Input Preparation

### تجسم و تفسیر

#### تجسم ساختار

مرحله آخر، مشاهده کمپلکس‌های پروتئین-پروتئین پیش‌بینی شده بود. بدین منظور، ابزارهای تجسم مولکولی مانند Chimera و PyMOL از طور کلی، هر دو ClusPro و HDOCK را اولویت‌بندی کنند. معرفت‌ترین کمپلکس‌ها را اولویت‌بندی کنند. ساختارهای سه‌بعدی کمپلکس‌ها و به دست آوردن بینش‌هایی در مورد برهمکنش‌های مولکولی در سطح اتمی استفاده شد [۳۸].

### یافته‌ها

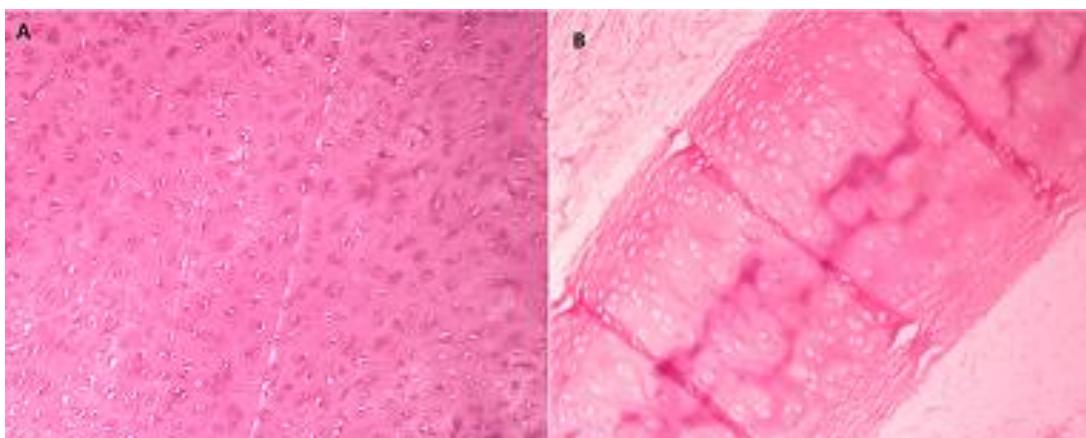
مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده در مقایسه با نای دست‌نخورده با استفاده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین (H&E) نتایج بدست آمده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین-ائوزین نشان دادند که در نمونه داربست در مقایسه با بافت دست‌نخورده به‌طور کامل تمام اجزای سلولی و هسته‌ای حذف شده در حالی که در نمونه کنترل، هسته سلول‌ها قابل مشاهده می‌باشد. با این وجود ماتریکس خارج سلولی دست‌نخورده باقی مانده است (شکل ۱).

گروه‌بندی راه حل‌های اتصال مشابه بر اساس شباهت ساختاری استفاده می‌کند و محققان را قادر می‌سازد تا حالت‌های الزام‌آوری اجماع را شناسایی کرده و معرفت‌ترین کمپلکس‌ها را اولویت‌بندی کنند.

به‌طور کلی، هر دو ClusPro و HDOCK از سیستم‌های امتیازدهی پیچیده برای ارزیابی و رتبه‌بندی کمپلکس‌های پروتئین-پروتئین پیش‌بینی شده استفاده می‌کنند. این سیستم‌های امتیازدهی، بینش‌های ارزشمندی را در مورد بیژگی‌های ساختاری و انرژی برهمنش‌های پروتئین-پروتئین در اختیار محققان قرار می‌دهند و انتخاب پیکربندی‌های پیوندی مرتبط بیولوژیکی را برای تجزیه و تحلیل بیشتر و اعتبارسنجی تجربی تسهیل می‌کنند [۳۶، ۳۷].

### اعتبارسنجی ساختاری

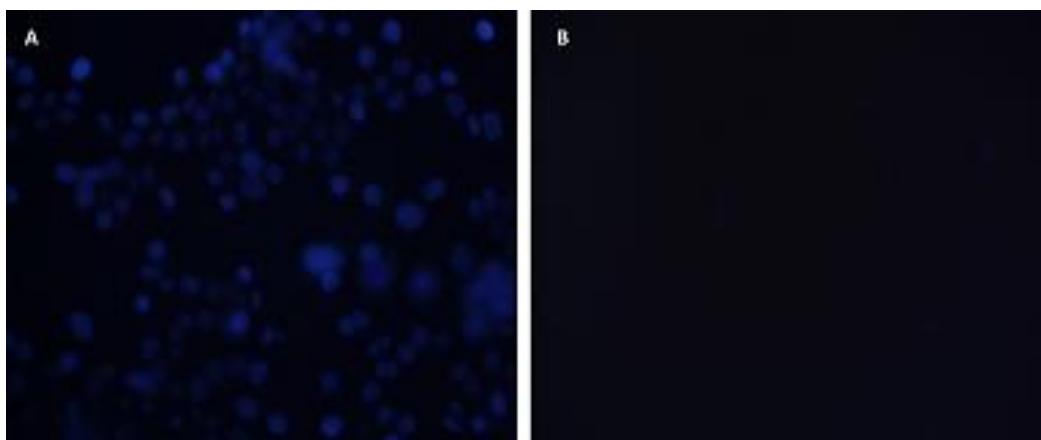
تجزیه و تحلیل ساختاری برای اعتبارسنجی کمپلکس‌های پروتئین-پروتئین پیش‌بینی شده انجام شد. این مستلزم مقایسه نتایج داکینگ با داده‌های تجربی در صورت وجود، و تعیین اهمیت بیولوژیکی حالت‌های اتصال پیش‌بینی شده است.



شکل ۱. مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده با نای دست‌نخورده به کمک رنگ‌آمیزی H&E (بزرگنمایی X100).  
(A) نای دست‌نخورده. (B) داربست سلول‌زدایی شده

نتایج DAPI حذف کامل هسته‌ای از نای سلول‌زدایی شده را در مقایسه با بافت‌های دست‌نخورده نشان داده است که نشانگر انجام سلول‌زدایی به‌طور کامل می‌باشد (شکل ۲).

مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده در مقایسه با نای دست‌نخورده با استفاده از رنگ فلورسنت DAPI

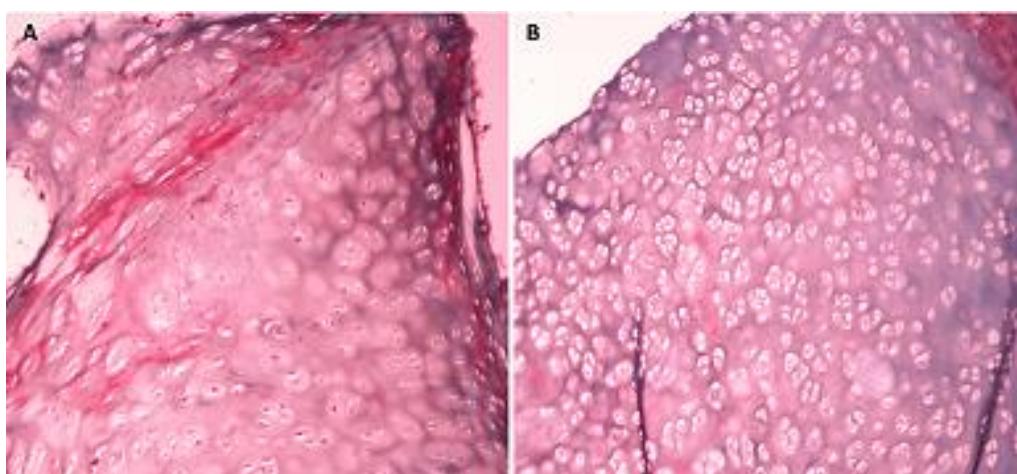


شکل ۲. مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده با نای دست‌نخورده به کمک رنگ آمیزی DAPI و میکروسکوپ فلورسنت (بزرگنمایی  $\times 100$ ). (A) عدم وجود نقاط درخششی در داربست سلول‌زدایی شده هسته‌ها به صورت نقاط آبی درخشان در نای دست‌نخورده. (B) عدم وجود نقاط درخششی در داربست سلول‌زدایی شده

کلازن)، تقریباً حفظ شده و همچنین فرآیند سلول‌زدایی منجر به تخریب قابل توجه ماتریکس خارج سلولی نشده است (شکل ۳).

#### نتایج ماسون تری کروم

در نتایج حاصل از رنگ آمیزی ماسون تری کروم، در نمونه داربست در مقایسه با بافت دست‌نخورده، ساختار پروتئین‌های ماتریکس خارج سلولی (ساختار

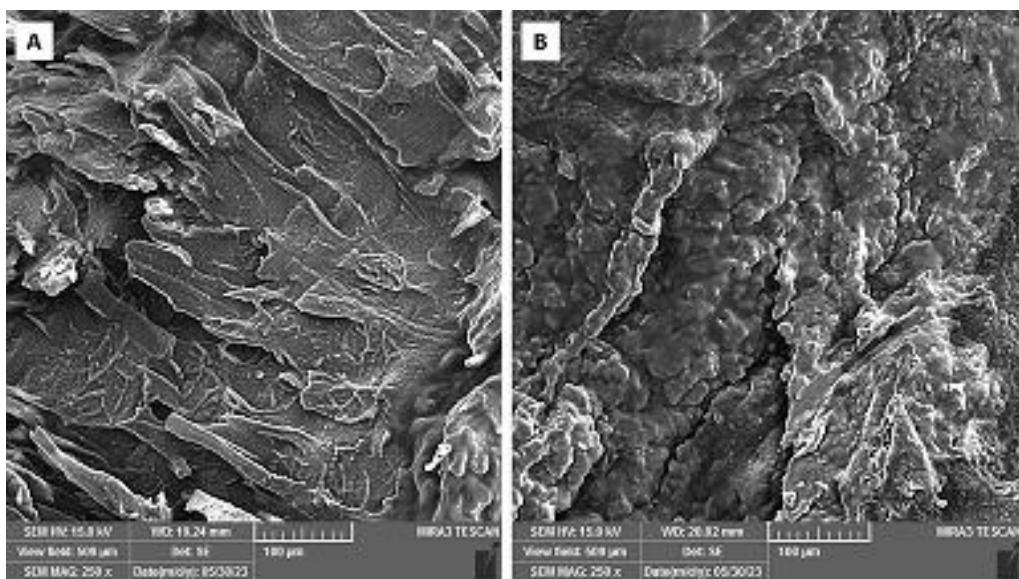


شکل ۳. مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده با نای دست‌نخورده به کمک رنگ آمیزی ماسون تری کروم (بزرگنمایی  $\times 100$ ). (A) نای دست‌نخورده. (B) داربست سلول‌زدایی شده

فراساختار ECM در هر دو نمونه دست‌نخورده و داربست شباخت زیادی را نشان داده‌اند (شکل ۴).

#### نتایج حاصل از ارزیابی فراساختار نای دست‌نخورده و داربست با میکروسکوپ الکترونی نگاره

نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نگاره حاکی از حفظ ساختار ECM نای در اثر سلول‌زدایی بوده و



شکل ۴ تصاویر نای دست‌نخورده (A) و داربست سلول‌زدایی شده (B) حاصل از تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره

اتصال بالقوه بین آلفا-بتا ۱ و فیبرونکتین ۱ ارائه می‌دهند (جدول ۲) (شکل ۳). (D, E, F, G)

جدول ۱. اتصال پروتئین-پروتئین برای اینتگرین ۳ و Alpha5-Beta3 و فیبرونکتین ۱

| Cluster | Members | Representative | Weighted Score |
|---------|---------|----------------|----------------|
| 1       | 42      | Center         | -735.8         |
|         |         | Lowest Energy  | -777.0         |
| 2       | 37      | Center         | -668.0         |
|         |         | Lowest Energy  | -703.2         |
| 3       | 37      | Center         | -728.1         |
|         |         | Lowest Energy  | -728.1         |

جدول ۲. اتصال پروتئین-پروتئین برای اینتگرین ۱ و Alphav-Beta1 و فیبرونکتین ۱

| Cluster | Members | Representative | Weighted Score |
|---------|---------|----------------|----------------|
| 1       | 149     | Center         | -656.2         |
|         |         | Lowest Energy  | -861.1         |
| 2       | 77      | Center         | -672.4         |
|         |         | Lowest Energy  | -744.0         |
| 3       | 52      | Center         | -734.3         |
|         |         | Lowest Energy  | -766.5         |

### برهمکنش اینتگرین و فیبرونکتین

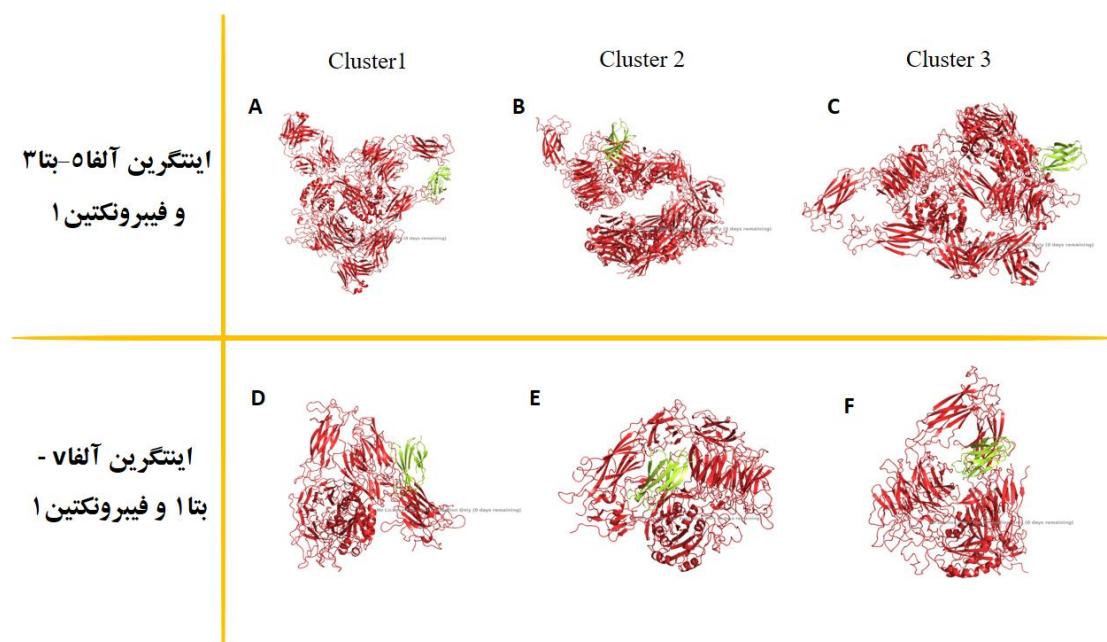
#### تجزیه و تحلیل سرور ClusPro

شبیه‌سازی‌های داکینگ پروتئین-پروتئین در سرور ClusPro برای تعامل بین Alpha5-Beta3 و Fibronectin alphavBeta1 بینش‌های دقیقی را با استفاده از سه معیار متمایز ارائه می‌کند: Hydrophobic-favored Electrostatic-favored VdW+Elec. برای درک جامع‌تر، فقط امتیازات متوازن برای سه Clusters برتر در نظر گرفته شد. نتایج حاصل از آنالیز اتصال پروتئین-پروتئین برای اینتگرین آلفا-۵-بتا ۳ و فیبرونکتین ۱

تصاویر ارائه شده ساختارهای سه‌بعدی مربوط به پیش‌بینی‌های برتر در هر Cluster را نشان می‌دهد که این ساختارها بینش بصری را در مورد حالت‌های اتصال بالقوه بین آلفا-۵-بتا ۳ و فیبرونکتین ۱ ارائه می‌دهند (جدول ۱) (شکل ۱).

#### نتایج حاصل از آنالیز اتصال پروتئین-پروتئین برای اینتگرین آلفا-۱ و فیبرونکتین ۱:

تصاویر ارائه شده ساختارهای سه‌بعدی مربوط به پیش‌بینی‌های برتر در هر Cluster را نشان می‌دهد که این ساختارها بینش بصری را در مورد حالت‌های



شکل ۵. ساختارهای سه بعدی اتصال پروتئین-پروتئین ایнтگرین و فیبرونکتین ۱ مربوط به پیش‌بینی‌های برتر در هر Cluster

۲. امتیاز اطمینان<sup>۳</sup>: امتیاز اطمینان نشان‌دهنده قابلیت اطمینان و سطح اطمینان مجموعه پروتئین-پروتئین پیش‌بینی‌شده است. فاکتورهایی مانند کیفیت ساختارهای ورودی، دقیق‌گرایی اتصال و سازگاری نتایج در چندین شبیه‌سازی را در نظر می‌گیرد. نمره اطمینان بالاتر نشان‌دهنده سطح بالاتری از اطمینان در مجموعه پیش‌بینی شده است.

۳. لیگاند rmsd (انحراف میانگین مربع ریشه): لیگاند rmsd انحراف ساختاری بین وضعیت اتصال پیش‌بینی‌شده لیگاند (در این مورد، فیبرونکتین) و ساختار مرجع یا آزمایشی تعیین شده آن را اندازه‌گیری می‌کند. یک مقدار rmsd لیگاند کمتر نشان‌دهنده همترابی نزدیک‌تر بین ساختارهای پیش‌بینی‌شده و مرجع است، که پیش‌بینی دقیق‌تری از حالت اتصال را نشان می‌دهد.

با ترکیب این معیارهای ارزیابی اضافی، HDOCK ارزیابی تعاملات پروتئین-پروتئین پیش‌بینی‌شده توسط ClusPro را افزایش می‌دهد، و درک

### تجزیه و تحلیل سور

سور HDOCK نتایج ClusPro را با استفاده از Ligand Confidence Score Docking Score Alpha5rmsd به عنوان معیاری برای برهمکنش Fibronectin و Beta3 تکمیل کرد.

سور HDOCK پیش‌بینی‌های ClusPro را با استفاده از معیارهای ارزیابی اضافی برای ارزیابی تعامل بین Fibronectin و Alpha5-Beta3 می‌کند. این معیارها بینش‌هایی را در مورد جنبه‌های مختلف مجتمع‌های پروتئین-پروتئین پیش‌بینی‌شده ارائه می‌دهند:

۱. امتیاز اتصال<sup>۱</sup>: این معیار کیفیت کلی مجموعه پروتئین-پروتئین پیش‌بینی‌شده را بر اساس مشارکت‌های مختلف انرژی، از جمله برهمکنش‌های واندروالس، نیروهای الکترواستاتیکی و پیوند هیدروژنی، کمیت می‌کند. نمره اتصال بالاتر نشان دهنده تعامل اتصال مطلوب‌تر و پایدارتر بین پروتئین‌ها است.

<sup>1</sup> Docking Score

<sup>2</sup> Confidence Score

بصری را در مورد اتصال بالقوه بین آلفا-۵- بتا ۳ و فیبرونکتین ۱ ارائه می‌دهند.

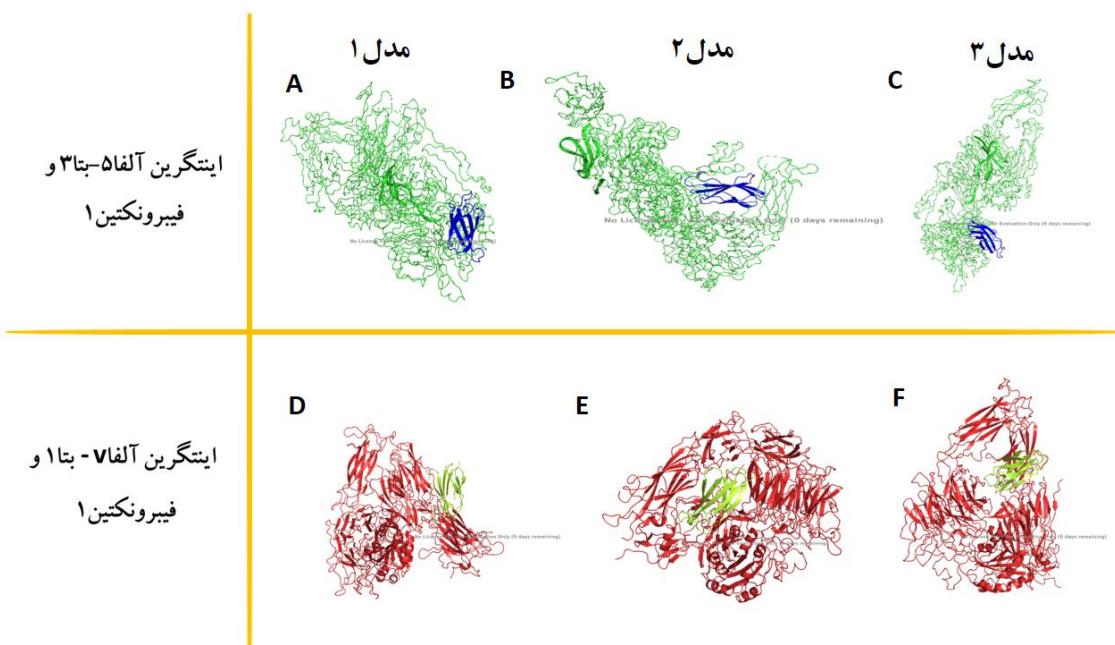
نتایج حاصل از آنالیز اتصال پروتئین-پروتئین برای اینتگرین Alphav-Beta1 و فیبرونکتین ۱

نتایج به دست آمده توسط سرور HDOCK در شکل ۶ آمده است. ساختارهای سه بعدی مربوط به هر مدل از سرور HDOCK مجموعه نتایج را افزایش می‌دهند و نمایشی بصری از حالت‌های اتصال بالقوه ارائه می‌دهند.

دقیق‌تری از حالت‌های اتصال بالقوه بین Fibronectin و Alpha5-Beta3 ارائه می‌دهد.

نتایج حاصل از آنالیز اتصال پروتئین-پروتئین برای اینتگرین آلفا-۵- بتا ۳ و فیبرونکتین ۱

نتایج به دست آمده توسط سرور HDOCK در شکل ۶ آمده است. مشابه نتایج ClusPro، ساختارهای سه بعدی مربوط به هر مدل از سرور HDOCK برای بررسی در دسترس هستند. این ساختارها بینش



شکل ۶. ساختارهای سه بعدی اینتگرین و فیبرونکتین ۱ مربوط به هر مدل از سرور HDOCK (A) مدل ۱ (امتیاز Docking : ۴۷/۵۴ - امتیاز اطمینان: ۰،۸۷۵۵ - و لیگاند (Å) rmsd : ۱۲۴/۲۰ )، (B) مدل ۲ (امتیاز Docking : ۳۹/۴۲ - ، امتیاز اطمینان: ۰،۸۵۴۲۳ - و لیگاند (Å) rmsd : ۲۳۸,۳۹: Docking : ۴۶/۷۳ : rmsd : ۰,۸۵۴۲۳)، (C) مدل ۳ (امتیاز Docking : ۴۶/۷۳ : rmsd : ۰,۸۵۴۲۳)، (D) مدل ۱ (امتیاز Docking : ۹۱/۴۶: rmsd : ۰,۸۵۰۳ - و لیگاند (Å) rmsd : ۲۳۶/۹۴Docking : ۹۱/۴۶: rmsd : ۰,۸۵۰۳ - و لیگاند (Å) rmsd : ۰,۸۵۰۳)، (E) مدل ۲ (امتیاز Docking : ۶۰/۹۰ - ، لیگاند (Å) rmsd : ۰,۹۲۰۸۳ - ۲۷۷/۶۶: Docking : ۶۰/۹۰ - ، لیگاند (Å) rmsd : ۰,۹۲۰۸۳)، (F) مدل ۳ (امتیاز Docking : ۵۸/۶۳(Å) اطمینان: ۰,۸۸۲۹۳ - و لیگاند (Å) rmsd : ۵۵/۹۵: rmsd : ۰,۸۸۲۹۳)

از بافت چربی از طریق رویکردهای محاسباتی برای ارزیابی اتصال پروتئین-پروتئین انجام شد.

ماتریکس خارج سلولی (ECM) جزء غیرسلولی موجود در تمام بافت‌ها و اندام‌ها است و نه تنها داربست فیزیکی ضروری را برای اجزای سلولی فراهم می‌کند، بلکه نشانه‌های بیوشیمیایی و بیومکانیکی حیاتی را آغاز می‌کند که برای مورفوژنیز، تمایز و هموستاز بافت مورد نیاز است و نیچه‌های سلولی بنا بر این بستگی دارند.

## بحث

در مطالعه حاضر، پروتکل سلول‌زدایی بر اساس روش دترجنت-آنزیمی برای بافت‌های نای با منشاء گوسفند انجام گرفت. پروتکل به کارگرفته شده در این مطالعه، با وجود سلول‌زدایی موفق، حفظ اجزاء ماتریکس خارج سلولی و فراساختار آن را نشان داد. همچنین بررسی برهمکنش ماتریکس خارج سلولی نای سلول‌زدایی شده با اینتگرین سلول بنیادی مشتق

آزمایش‌های بیومکانیکی حاکی از آن بود که رویکرد سلول‌زدایی منجر به تغییر قابل توجهی در خواص مکانیکی نشده است [۴۸] که نتایج مطالعات حاکی از هم‌راستا بودن با نتایج سلول‌زدایی مطالعه حاضر می‌باشد.

دانن<sup>۳</sup> و همکاران شکل‌گیری انواع مختلف چسبندگی ماتریکس سلولی را در سلول‌هایی که از طریق  $\alpha 5\beta 1$  یا  $\alpha v\beta 3$  به فیبرونکتین متصل می‌شوند، مطالعه کردند. در هر دو مورد، چسبندگی سلول به فیبرونکتین منجر به کاهش سریع فعالیت RhoA شده بود [۴۹]. چندین گزارش از اتصال بین FN12-14 و اینتگرین‌های مختلف وجود دارد [۵۰]. داده‌های عملکردی نشان می‌دهد که FN12-14 قادر به ترویج فعالیت چسبندگی سلول‌های ملانوما است و به آنتی‌بادی‌های anti- $\alpha 4$  و anti- $\beta 1$  حساس است. که نشان‌دهنده تعامل مستقیم بین FN12-14 و  $\alpha 4\beta 1$  است [۵۱]. همچنین نتایج مشابهی با اتصال سلول‌های خونساز به FN12-14 بدست آمد [۵۰].

مطالعات حاضر برای درک بهتر تعامل اینتگرین آلفا-۵- بتا ۳ و آلفا-۷ بتا ۱ با فیبرونکتین<sup>۱</sup> انجام شد، که این تکنیک امکان بررسی کامل برهمکنش پروتئین-پروتئین در داخل ماتریکس خارج سلولی را فراهم کرد. برای شبیه‌سازی داکینگ پروتئین-پروتئین از دو سرور داکینگ معروف ClusPro و HDOCK استفاده شد و توسط الگوریتم‌های ClusPro و HDOCK فضای ساختاری برای یافتن مطلوب‌ترین حالت‌های اتصال از نظر انرژی، از بین انواع اتصالات برتر جستجو گردید. خروجی سرورهای docking تحت ارزیابی‌های گسترده امتیازدهی و رتبه‌بندی قرار گرفتند و جهت شبیه‌سازی‌های داکینگ پروتئین-پروتئین در سرور ClusPro برای تعامل بین Fibronectin، alphavBeta1، Alpha5-Beta3 و Lowest Energy آنهایی که امتیاز مرکز و امتیاز

می‌باشد [۴۹، ۵۰]. ECM از دو دسته اصلی ماکرومولکول‌ها تشکیل شده است: پروتئوگلیکان‌ها (PGs) و پروتئین‌های فیبری [۴۱]. پروتئین‌های فیبری ECM اصلی شامل کلژن‌ها، الاستین‌ها، فیبرونکتین‌ها و لامینین‌ها هستند [۴۲]. PG‌ها اکثر فضای بینایینی خارج سلولی داخل بافت را به شکل یک ژل هیدراته پر می‌کنند [۴۳]. سومین پروتئین فیبری، فیبرونکتین (FN) به‌طور مستقیم در هدایت سازمان‌دهی ECM بینایینی نقش دارد و علاوه‌بر این، نقش مهمی در اتصال و عملکرد سلول دارد. و به عنوان یک جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی، چسبندگی سلولی با واسطه اینتگرین را از طریق اتصال اینتگرین‌های  $\alpha IIb\beta 3.\alpha 5\beta 1$  و کلاس  $\alpha V$  به یک موتیف RGD امکان پذیر می‌کند [۴۴].

اینتگرین‌ها گیرنده‌های گذرگشایی هترودیمری هستند. یک مولکول اینتگرین از دو زیر واحد گلیکوپروتئین  $\alpha$  و  $\beta$  تشکیل شده است. اینتگرین‌ها در چسبندگی سلول-سلول / سلول-ECM، انتقال سیگنال و پاسخ‌های گیرنده فاکتور رشد نقش مهمی ایفا می‌کنند [۴۵].

در یک مطالعه، بایگورا<sup>۱</sup> و همکاران از یک روش شیمیایی-آنزیمی برای سلول‌زدایی نای انسان استفاده کردند تا یک داربست کاملاً سلول‌زدایی به دست آید [۴۶]. همچنین، سان و همکاران سلول‌زدایی نای را طبق پروتکل DEM انجام دادند که نتایج رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین و اثوزین (H&E) نشان داد که هسته‌ها تقریباً به طور کامل در بافت غیرغضروفی حذف شدند، تعداد کمی از هسته‌ها و بقایای سلولی در لکون‌ها باقی ماندند [۴۷]. در آزمایشات گیرالدو-گومز<sup>۲</sup> و همکاران پس از انجام مراحل سلول‌زدایی نای، تصاویر و داده‌های به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، حفظ ساختارهای ماتریکس خارج سلولی نای (ECM) را نشان داده و

<sup>3</sup> Danen

<sup>1</sup> Baiguera

<sup>2</sup> Giraldo-Gomez

### نتیجه‌گیری

به طور کلی، یافته‌های این مطالعه و مدل‌سازی چسبندگی سلولی، حفظ اجزای ماتریکس خارج سلولی و فراساختار داربست و همچنین برهمکنش‌های پایدار و مطلوب اینتگرین آلفا-۵- بتا ۳ و آلفا-۷- بتا ۱ با فیبرونکتین ۱ را از طریق مدل‌سازی محاسباتی با سرورهای ClusPro و HDOCK نشان داد که نتایج حاکی از آشکارسازی مکانیسم‌های چسبندگی و سیگنالدهی سلولی بود و به طور کلی داربست‌های آماده شده می‌تواند مدلی ایده‌آل برای کاربردهای مهندسی بافت باشد.

### تشکر و قدردانی

نویسندهای بدبینو سیله از تمامی افرادی که در دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این تحقیق یاری کردند تشکر می‌کنند.

### تعارض منافع

مقاله قادر هرگونه تعارض منافع است.

کمتری داشتند به علت شباهت ساختاری و پایداربودن برهمکنش آنها به عنوان کاندیدهایی برای مطالعه شناسایی شدند. که در این مطالعه فقط امتیازات متوازن برای سه Clusters برتر در نظر گرفته شد. با سرور HDOCK نتایج ClusPro با استفاده از Ligand Confidence Score Docking Score Alpha5- rmsd به عنوان معیاری برای برهمکنش Fibronectin و Beta3 تکمیل شد. در نهایت برهمکنش‌هایی که امتیاز داکینگ و امتیاز Ligand rmsd بالاتری و Confidence پایین‌تری را به خود اختصاص داده بودند به عنوان برهمکنش پایدار و مطلوب انتخاب گردیدند.

تولید ماتریکس‌های بدون سلول از بافت نای توسط سلول‌زدایی یک رویکرد جایگزین امیدوارکننده برای جایگزینی بافت عملکردی ارائه می‌دهد. در آینده مطالعات بیشتری در زمینه مدل‌سازی چسبندگی سلولی در ارتباط با علم مهندسی بافت، می‌تواند انجام شود. که بینش در این زمینه ممکن است به معنای پیشرفت وسیع در پژوهشی احیاکننده و زمینه‌های تهیه اندام مصنوعی باشد.

### References

- 1- Khalid T, Soriano L, Lemoine M, Cryan S-A, O'Brien FJ, O'Leary C. Development of tissue-engineered tracheal scaffold with refined mechanical properties and vascularisation for tracheal regeneration. *Front Bioeng Biotechnol*. 2023;11:1187500.
- 2- Xu Y, Duan L, Li Y, She Y, Zhu J, Zhou G, et al. Nanofibrillar decellularized wharton's jelly matrix for segmental tracheal repair. *Adv Funct Mater*. 2020; 30(14):1910067.
- 3- Xia D, Jin D, Wang Q, Gao M, Zhang J, Zhang H, et al. Tissue-engineered trachea from a 3D-printed scaffold enhances whole-segment tracheal repair in a goat model. *J Tissue Eng Regener Med*. 2019; 13(4):694-703.
- 4- Schwarz S, Koerber L, Elsaesser AF, Goldberg-Bockhorn E, Seitz AM, Dürselen L, et al. Decellularized cartilage matrix as a novel biomatrix for cartilage tissue-engineering applications. *Tissue Eng Part A*. 2012; 18(21-22):2195-2209.
- 5- Lei C, Mei S, Zhou C, Xia C. Decellularized tracheal scaffolds in tracheal reconstruction: An evaluation of different techniques. *J Appl Biomater Funct Mater*. 2021; 19:22808000211064948.
- 6- Busch SM, Lorenzana Z, Ryan AL. Implications for extracellular matrix interactions with human lung basal stem cells in lung development, disease, and airway modeling. *Front Pharmacol*. 2021; 12:645858.
- 7- Multhaupt HA, Leitinger B, Gullberg D, Couchman JR. Extracellular matrix component signaling in cancer. *Adv Drug Deliv Rev*. 2016; 97:28-40.

- 8- Nicolas J, Magli S, Rabbachin L, Sampaolesi S, Nicotra F, Russo L. 3D extracellular matrix mimics: fundamental concepts and role of materials chemistry to influence stem cell fate. *Biomacromolecules*. 2020; 21(6):1968-1994.
- 9- Bonnans C, Chou J, Werb Z. Remodelling the extracellular matrix in development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15(12):786-801.
- 10- Naba A, Clouser KR, Ding H, Whittaker CA, Carr SA, Hynes RO. The extracellular matrix: Tools and insights for the “omics” era. *Matrix Biol*. 2016; 49:10-24.
- 11- Dzamba BJ, DeSimone DW. Extracellular matrix (ECM) and the sculpting of embryonic tissues. *Curr Top Dev Biol*. 2018; 130:245-274.
- 12- Kim S-H, Turnbull J, Guimond S. Extracellular matrix and cell signalling: the dynamic cooperation of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J Endocrinol*. 2011; 209(2):139-151.
- 13- Pankov R, Yamada KM. Fibronectin at a glance. *J Cell Sci*. 2002; 115(20):3861-3863.
- 14- Occhetta P, Isu G, Lemme M, Conficconi C, Oertle P, Räz C, et al. A three-dimensional in vitro dynamic micro-tissue model of cardiac scar formation. *Integr Biol*. 2018; 10(3): 174–183.
- 15- Iozzo RV, Schaefer L. Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol*. 2015; 42:11-55.
- 16- Legate KR, Wickström SA, Fässler R. Genetic and cell biological analysis of integrin outside-in signaling. *Genes Dev*. 2009; 23(4):397-418.
- 17- Brizzi MF, Tarone G, Defilippi P. Extracellular matrix, integrins, and growth factors as tailors of the stem cell niche. *Curr Opin Cell Biol*. 2012; 24(5):645-651.
- 18- Gattazzo F, Urciuolo A, Bonaldo P. Extracellular matrix: a dynamic microenvironment for stem cell niche. *Biochim Biophys Acta-Gen Subj*. 2014; 1840(8):2506-2519.
- 19- Marsico G, Russo L, Quondamatteo F, Pandit A. Glycosylation and integrin regulation in cancer. *Trends Cancer*. 2018; 4(8):537-552.
- 20- Weber GF, Bjerke MA, DeSimone DW. Integrins and cadherins join forces to form adhesive networks. *J Cell Sci*. 2011; 124(8):1183-1193.
- 21- Popov C, Radic T, Haasters F, Prall W, Aszodi A, Gullberg D, et al . Integrins  $\alpha 2\beta 1$  and  $\alpha 11\beta 1$  regulate the survival of mesenchymal stem cells on collagen I. *Cell Death Dis*. 2011; 2(7):e186-e186.
- 22- Novoseletskaya ES, Evdokimov PV, Efimenko AY. Extracellular matrix-induced signaling pathways in mesenchymal stem/stromal cells. *Cell Commun. Signaling*. 2023; 21(1):244.
- 23- Du J, Zu Y, Li J, Du S, Xu Y, Zhang L, et al . Extracellular matrix stiffness dictates Wnt expression through integrin pathway. *Sci Rep*. 2016; 6(1):20395.
- 24- Olivares-Navarrete R, Lee EM, Smith K, Hyzy SL, Doroudi M, Williams JK, et al . Substrate stiffness controls osteoblastic and chondrocytic differentiation of mesenchymal stem cells without exogenous stimuli. *PloS one*. 2017; 12(1):e0170312.
- 25- Nagae M, Re S, Mihara E, Nogi T, Sugita Y, Takagi J. Crystal structure of  $\alpha 5\beta 1$  integrin ectodomain: Atomic details of the fibronectin receptor. *J Cell Biol*. 2012; 197(1):131-140.
- 26- Xiong J-P, Stehle T, Diefenbach B, Zhang R, Dunker R, Scott DL, et al . Crystal structure of the extracellular segment of integrin  $\alpha V\beta 3$ . *Science*. 2001; 294(5541):339-345.
- 27- Dickinson CD, Veerapandian B, Dai X-P, Hamlin RC, Xuong N-h, Ruoslahti E, et al . Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin. *J Mol Biol*. 1994; 236(4):1079-1092.
- 28- Horton MA. The  $\alpha v\beta 3$  integrin “vitronectin receptor”. *Int J Biochem Cell Biol*. 1997; 29(5):721-725.
- 29- Bachman H, Nicosia J, Dysart M, Barker TH. Utilizing fibronectin integrin-binding specificity to control cellular responses. *Adv Wound Care*. 2015; 4(8):501-511.
- 30- Yan Y, Wen Z, Wang X, Huang SY. Addressing recent docking challenges: A hybrid strategy to integrate template-based and free protein-protein docking. *Proteins*. 2017; 85(3):497-512.
- 31- Vajda S, Yueh C, Beglov D, Bohnuud T, Mottarella SE, Xia B, et al . New additions to the ClusPro server motivated by CAPRI. *Proteins*. 2017; 85(3):435-444.
- 32- Kozakov D, Hall DR, Xia B, Porter KA, Padhorny D, Yueh C, et al . The ClusPro web server for protein–protein docking. *Nat Protoc*. 2017; 12(2):255-278.

- 33- Yan Y, Tao H, He J, Huang S-Y. The HDOCK server for integrated protein–protein docking . Nat Protocol. 2020; 15(5):1829-1852.
- 34- Yan Y, Zhang D, Zhou P, Li B, Huang S-Y. HDOCK: a web server for protein–protein and protein–DNA/RNA docking based on a hybrid strategy. Nucleic Acids Res. 2017; 45(W1):W365-W373.
- 35- Desta IT, Porter KA, Xia B, Kozakov D, Vajda S. Performance and its limits in rigid body protein-protein docking. Structure. 2020; 28(9):1071-1081. e1073.
- 36- Huang S-Y, Zou X. A knowledge-based scoring function for protein-RNA interactions derived from a statistical mechanics-based iterative method. Nucleic Acids Res. 2014; 42(7):e55-e55.
- 37- Huang SY, Zou X. An iterative knowledge-based scoring function for protein–protein recognition. Proteins. 2008; 72(2):557-579.
- 38- Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. The extracellular matrix at a glance. J Cell Sci. 2010;123(24):4195-4200.
- 39- Singh P, Carraher C, Schwarzbauer JE. Assembly of fibronectin extracellular matrix. Annu Rev Cell Dev Biol. 2010; 26:397-419.
- 40- Schaefer L, Schaefer RM. Proteoglycans :from structural compounds to signaling molecules. Cell Tissue Res. 2010; 339(1):237-246.
- 41- Kular JK, Basu S, Sharma RI. The extracellular matrix: Structure, composition, age-related differences, tools for analysis and applications for tissue engineering. J Tissue Eng. 2014; 5:2041731414557112.
- 42- Järveläinen H, Sainio A, Koulu M, Wight TN, Penttinen R. Extracellular matrix molecules: potential targets in pharmacotherapy. Pharmacol Rev. 2009; 61(2):198-223.
- 43- Benito-Jardón M, Klapproth S, Gimeno-LLuch I, Petzold T, Bharadwaj M, Müller DJ, et al. The fibronectin synergy site re-enforces cell adhesion and mediates a crosstalk between integrin classes. Elife. 2017; 6:e22264.
- 44- Wang H, Luo X, Leighton J. Extracellular matrix and integrins in embryonic stem cell differentiation. Biochem Insights. 2015; 8(Suppl 2):15-21.
- 45- Baiguera S, Jungebluth P, Burns A, Mavilia C, Haag J, De Coppi P, et al. Tissue engineered human tracheas for in vivo implantation. Biomaterials. 2010; 31(34):8931-8938.
- 46- Shin YS, Choi JW, Park J-K, Kim YS, Yang SS, Min B-H, et al. Tissue-engineered tracheal reconstruction using mesenchymal stem cells seeded on a porcine cartilage powder scaffold. Ann Biomed Eng. 2015; 43:1003-1013.
- 47- Giraldo-Gomez DM, García-López SJ, Tamay-de-Dios L, Sánchez-Sánchez R, Villalba-Caloca J, Sotres-Vega A, et al. Fast cyclical-decellularized trachea as a natural 3D scaffold for organ engineering. Mater Sci Eng C. 2019; 105:110142.
- 48- Danen EH, Sonneveld P, Brakebusch C, Fässler R, Sonnenberg A. The fibronectin-binding integrins  $\alpha 5\beta 1$  and  $\alpha v\beta 3$  differentially modulate RhoA–GTP loading, organization of cell matrix adhesions, and fibronectin fibrillogenesis. J Cell Biol. 2002; 159(6):1071-1086.
- 49- Mohri H, Katoh K, Iwamatsu A, Okubo T. The novel recognition site in the C-terminal heparin-binding domain of fibronectin by integrin  $\alpha 4\beta 1$  receptor on HL-60 cells. Exp Cell Res. 1996; 222(2):326-332.
- 50- Mould AP, Humphries MJ. Identification of a novel recognition sequence for the integrin alpha 4 beta 1 in the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. EMBO J. 1991; 10(13):4089-4095.