

Original article

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

Nahumi A¹, Peymani M*¹, Asadi A*², Abdolmaleki A³, Panahi Y⁴, Shahmohammadi M²

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, Khoj University of Medical Sciences, Khoj, 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 $\alpha\beta1$ and $\alpha5\beta3$ 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 α and β 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^۱، مریم پیمانی^{۱*}، اسداله اسدی^{۲*}، آرش عبدالملکی^۳، یاسین پناهی^۴، محمدعلی شاه محمدی^۲

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

۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران

۳. گروه بیوفیزیک، دانشکده فناوری‌های نوین، دانشگاه محقق اردبیلی، نمین، ایران

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

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۴۵ ۳۱۵۰۵۱۹۳، فاکس: ۰۴۵ ۳۱۵۰۵۱۸۷، پست الکترونیک: asady@uma.ac.ir، m.peymani@iaushk.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 سلول‌زایی 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 سلول‌زایی نای گوسفند از طریق روش دترجنت-آنزیمی، ارزیابی‌های بافت‌شناسی و عکس‌برداری از فراساختار نمونه‌ها به وسیله میکروسکوپ الکترونی نگاره انجام گرفت. همچنین شبیه‌سازی‌های اتصال پروتئین فیبرونکتین ۱ ماتریکس خارج سلولی با اینتگرین $\alpha 5\beta 3$ و $\alpha v\beta 1$ 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 HDOCK و ClusPro اعمال شد.

یافته‌ها: یافته‌ها حاکی از حفظ اجزای ماتریکس خارج سلولی و فراساختار داربست بود. همچنین برای یافتن مطلوب‌ترین حالت‌های 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.

نتیجه‌گیری: داربست‌های تهیه شده، برای کاربردهای مهندسی ایده‌آل بوده و با تحلیل‌های محاسباتی و داده‌های تجربی، حالت‌های 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 داشته‌است [۱]. مهندسی بافت، علمی است که با ترکیب سلول‌ها و داربست یک جایگزین بالقوه برای ترمیم ضایعات نای می‌باشد. یک داربست ایده آل برای مهندسی بافت نای، باید شکل لوله‌ای خاص برای تنفس، استحکام مکانیکی کافی برای جلوگیری از فروپاشی، ساختار ماتریکس خارج‌سلولی (ECM^۱) بیومیمتیک برای چسبندگی و تکثیر سلولی و زیست‌فعالی مطلوب برای بازسازی غضروف را دارا باشد [۲،۳]. داربست سلول زدایی‌شده (DTS^۲) با حذف اجزای سلولی و هسته‌ای از نای دهنده از طریق روش‌های شیمیایی، فیزیکی و آنزیمی به دست می‌آید و به دلیل عدم پاسخ ایمنی، زیست‌سازگاری بالایی 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 خارج سلولی (ECM) یک شبکه سه بعدی (3-D) از ماکرومولکول‌های خارج‌سلولی است که پشتیبانی ساختاری، مکانیکی و بیوشیمیایی را برای سلول‌ها و بافت‌هایی که ارگان‌های پیچیده را تشکیل می‌دهند، فراهم می‌کند. به طور فزاینده‌ای 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-سلول (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^۳ 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 خارج سلولی شامل اجزای متعددی است که از جمله آن‌ها می‌توان به پروتئین‌های فیبری، گلیکوپروتئین‌ها و پروتئوگلیکان‌ها اشاره کرد [۸].

چندین خانواده از پروتئین‌ها با منشأ و عملکردهای متنوع، گلیکوپروتئین‌های غیر کلاژنی ECM را تشکیل می‌دهند. در میان آن‌ها، گلیکوپروتئین‌های چسبنده^۴، دسته‌ای از ماکرومولکول‌های ECM هستند که به اشکال مختلف وجود دارند که با دمین‌های^۵ اتصال متعددی قادر به تعامل با کلاژن و پروتئوگلیکان‌ها و اتصال سطوح سلولی هستند [۱۱]. گلیکوپروتئین‌های چسبنده شامل فیبرونکتین^۶ (FN)، لامینین^۷ (LM)، ویترونکتین^۸ (VN)، ترومبوسپوندین‌ها^۹ (TSPs) و تناسین^{۱۰} (TN) هستند. بیشتر گلیکوپروتئین‌های ECM با اینتگرین‌ها و سایر گیرنده‌های بیان شده در سطح سلول و با کلاژن یا سایر اجزای تعامل دارند [۱۲].

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

³ Martin

⁴ Adhesive Glycoproteins

⁵ Domain

⁶ Fibronectin

⁷ Laminin

⁸ Vitronectin

⁹ Thrombospondins

¹⁰ Tenascin

¹ Extracellular Matrix

² Decellularized Tracheal Scaffold

چسبندگی سلول‌های بنیادی، سرنوشت سلول و تعامل سلول-ECM به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار گرفته‌اند [۱۳]. به همین دلیل، فیبرونکتین اغلب به‌عنوان 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 چسبنده و ساختاری است که اینتگرین‌ها و سایر گیرنده‌های سلول چسبنده می‌توانند 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 فزاینده‌ای از مطالعات نشان داده‌اند که اینتگرین‌ها گیرنده‌های 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 شده است. آن‌ها در چسبندگی سلولی نقش دارند و بسیاری از عملکردهای سلولی را کنترل می‌کنند و اعمال خود را با اتصال گلیکوپروتئین‌های ECM مانند LM، FN و کلاژن و غیره انجام می‌دهند [۱۹]. ویژگی تعامل اینتگرین-لیگاند توسط ایزوفرم‌های مختلف اینتگرین در زنجیره‌های α و β 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

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

در مطالعات پیشین نشان داده شده است که اینتگرین $\alpha 2\beta 1$ یا $\alpha 11\beta 1$ برهمکنش کافی MSC مغز استخوان انسان با کلاژن نوع I را فراهم می‌کند که با فعال کردن مسیر بقای پروتئین کیناز B (PKB/Akt) بقای سلول و تمایز استخوانی را تضمین می‌کند [۲۱]. همچنین نتایج مشابهی در مطالعه آبخارهای 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 MSC مغز استخوان موش، فسفوریلاسیون FAK- β GSK3 را فعال می‌کند که از تخریب- β کاتین و انتقال هسته‌ای برای اتصال به پروموتور $wnt1$ جلوگیری می‌کند [۲۳]. علاوه بر این، خاموش کردن زیر واحد $\beta 1$ باعث کاهش تمایز استخوان‌زایی 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، پروتئین فیبرونکتین است که در فیبریل‌هایی جمع می‌شود که سلول‌ها را به ECM متصل می‌کنند، هدف ما بررسی برهمکنش فیبرونکتین ۱ ماتریکس خارج سلولی نای سلول‌زایی شده با اینتگرین $\alpha v\beta 3$ 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

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 تهیه داربست‌های نای سلول‌زدایی‌شده، نای‌های گوسفند خریداری شده به طور کامل پاکسازی شدند. سپس نمونه‌ها سه مرتبه با آب شستشوداده شدند و در بافر فسفات (PBS) به مدت ۳۰ دقیقه غوطه‌ور شدند. نای‌ها به قطعات کوچک‌تر برش داده شدند و در سه چرخه انجماد و ذوب به مدت ۵ دقیقه در نیتروژن مایع قرار گرفتند. سپس به مدت ۲۴ ساعت در بافر فسفات حاوی ۰/۲۵٪ تریتون ایکس-۱۰۰ (مرک) و ۰/۲۵٪ سدیم دئوکسی‌کولات (سیگما آلدریج) 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 DNase-I ۱۵۰ U/ml و ۵۰ میلی‌مولار MgCl₂ روی شیکر قرار گرفت. پس از تیمار با DNase، قطعات نای به مدت یک شب به ایزوپروپانول انتقال یافت و پس از آن، سه بار شستشو با بافر فسفات هر کدام به مدت ۱۰ دقیقه انجام گردید. در نهایت، قطعات سلول‌زدایی‌شده نای در بافر فسفات حاوی ۱٪ آنتی‌بیوتیک/ضدقارچ در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد ذخیره گردید.

ارزیابی‌های بافتی داربست‌های نای سلول‌زدایی‌شده

از نمونه‌ها پس از انجام مراحل فیکس کردن، آب‌گیری و قالب‌گیری با پارافین به‌وسیله میکروتوم برش‌هایی به ضخامت ۵ میکرون تهیه گردید. در ادامه جهت رنگ‌آمیزی مقاطع بافتی، پارافین‌زدایی مقاطع انجام شده و بافت‌ها روی لام‌ها با هماتوکسیلین و ائوزین (سیگما آلدریج) رنگ‌آمیزی شدند. علاوه بر این، نمونه‌های نای دست‌نخورده و سلول‌زدایی‌شده، جهت شناسایی رشته‌های کلاژن و مواد هسته‌ای به ترتیب توسط ماسون تری کروم

(سیگما آلدریج) و DAPI^۱ (ترمو فیشر ساینتیفیک) رنگ‌آمیزی شدند.

بررسی فراساختاری داربست سلول‌زدایی‌شده با نای دست‌نخورده در سطح میکروسکوپ الکترونی نگاره

نمونه‌های نای دست‌نخورده و سلول‌زدایی‌شده، به مدت یک شب در دمای اتاق در گلوکار آلدهید (سیگما آلدریج) ۲/۵٪ تثبیت شدند و سه مرتبه با همان بافر شستشو داده شدند. سپس با درصدهای مختلف اتانول (۱۰۰٪، ۷۰٪، ۵۰٪، ۳۰٪) آبگیری شدند. در نهایت پس از خشک کردن، با پوشش طلا-پالادیوم پوشانده شده و سپس از طریق میکروسکوپ الکترونی روبشی (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) شناسایی شد: اینتگرین آلفا ۵-بتا ۳ با کد PDB (3VI3) و آلفا ۷-بتا ۱ با کد PDB (1JV2). این انتخاب‌ها بر اساس بالاترین میزان تعامل آنها با پروتئین فیبرونکتین ۱ در ماتریکس خارج سلولی (PDB کد FNA1) بود. این پروتئین‌ها به دلیل نقش حیاتی آنها در چسبندگی و سیگنال‌دهی سلولی، به ویژه در تعامل با فیبرونکتین ماتریکس خارج سلولی، برای مطالعه انتخاب شدند [۲۸-۲۵].

آماده‌سازی ساختار

آماده‌سازی ساختارهای پروتئینی:

آماده‌سازی 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، بهینه‌سازی جهت‌گیری زنجیره‌های جانبی، اختصاص دادن و مشخص کردن بارها و انواع

^۱ 4',6-diamidino-2-phenylindole

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

تجزیه و تحلیل برهمکنش فیبرونکتین ۱ و اینتگرین‌ها

تحقیقات بیشتری برای افزایش درک ما از تعامل بین اینتگرین $\alpha 5\beta 3$ و $\alpha v\beta 1$ با فیبرونکتین ۱ انجام شد. با استفاده از تکنیک‌های محاسباتی، ساختار سه بعدی فیبرونکتین ۱ از بانک داده‌های پروتئین (PDB) به‌دست آمد. پس از آن، الگوریتم‌های پیش‌بینی‌کننده 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 تعبیه‌شده 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 به‌طور قطعی مکان‌های اتصال بهینه اینتگرین $\alpha 5\beta 3$ و $\alpha v\beta 1$ 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 [۲۹].

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 طراحی‌شده مانند روش (FFT)^۱ برای سرور Cluspro و روش (RRF)^۲ برای سرور HDOCK، تشخیص نواحی برهمکنش بالقوه بر اساس عوامل مختلفی، از جمله ویژگی‌های سطح، پتانسیل‌های الکترواستاتیک، و موتیف‌های اتصال شناسایی شده ذاتی پروتئین‌های مورد بررسی، استفاده می‌کنند.

همچنین، این فرآیند اغلب ابزارهای محاسباتی و پایگاه داده‌های مختلف را برای افزایش دقت 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 تعیین‌شده تجربی را برای تجزیه و تحلیل و اعتبارسنجی مقایسه‌ای فراهم می‌کنند. علاوه بر این، پیشرفت‌ها در یادگیری ماشینی و هوش مصنوعی این حوزه را متحول کرده است و امکان توسعه مدل‌های پیش‌بینی آموزش‌دیده^۳ بر روی مجموعه داده‌های وسیعی از ساختارهای پروتئینی شناخته شده و تعاملات پیوندی را فراهم کرده است. این مدل‌ها می‌توانند به‌طور قابل توجهی دقت و

¹ Fast Fourier Transform

² Reweighted Random Forest

³ Machine Learning

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

انتخاب سرورهای Docking

ClusPro و HDOCK، دو سرور داکینگ معروف، به دلیل رویکردهای متمایز و در عین حال مکمل خود برای داکینگ پروتئین- پروتئین انتخاب شدند. ClusPro 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. به‌طور 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 به‌طور کارآمد در اختیارمان می‌گذارد.

شبیه‌سازی داکینگ پروتئین- پروتئین

آماده‌سازی ورودی^۱

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

¹ Input Preparation

دقت برای به حداکثر رساندن صحت پیش‌بینی پیکربندی شدند.

اجرای 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، ۳۳-۳۵].

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 یک تابع 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 رابط‌های 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 خوشه‌بندی 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 خوشه‌بندی برای

تجسم و تفسیر

تجسم ساختار

مرحله آخر، مشاهده کمپلکس‌های پروتئین- پروتئین پیش‌بینی شده بود. بدین منظور، ابزارهای تجسم مولکولی مانند PyMOL و Chimera برای بررسی ساختارهای سه‌بعدی کمپلکس‌ها و به‌دست 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)

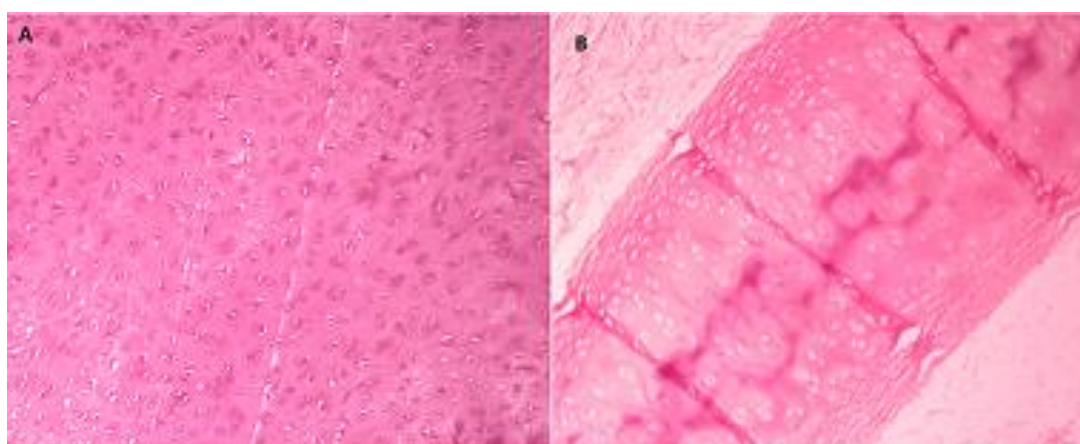
نتایج بدست آمده از رنگ‌آمیزی هماتوکسیلین- ائوزین نشان دادند که در نمونه داربست در مقایسه با بافت دست‌نخورده به‌طور کامل تمام اجزای سلولی و هسته‌ای حذف شده در حالی که در نمونه کنترل، هسته سلول‌ها قابل مشاهده می‌باشند. با این وجود ماتریکس خارج سلولی دست‌نخورده باقی مانده است (شکل ۱).

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

به‌طور کلی، هر دو HDOCK و ClusPro از سیستم‌های امتیازدهی پیچیده برای ارزیابی و رتبه‌بندی کمپلکس‌های پروتئین- پروتئین پیش‌بینی شده استفاده می‌کنند. این سیستم‌های امتیازدهی، بینش‌های ارزشمندی را در مورد ویژگی‌های ساختاری و انرژی برهم‌کنش‌های پروتئین- پروتئین در اختیار محققان قرار می‌دهند و انتخاب پیکربندی‌های پیوندی مرتبط بیولوژیکی را برای تجزیه و تحلیل بیشتر و اعتبارسنجی تجربی تسهیل می‌کنند [۳۲،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 ۱۰۰X)

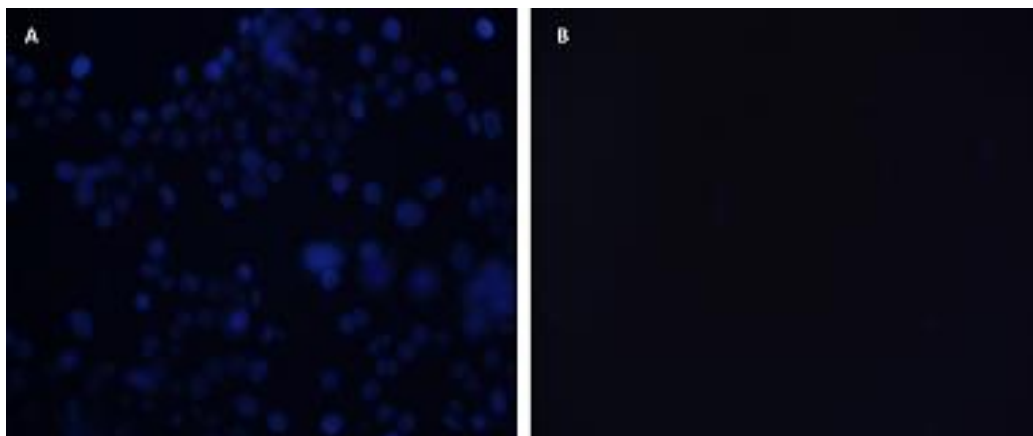
(A) نای دست‌نخورده. (B) داربست سلول‌زدایی شده

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

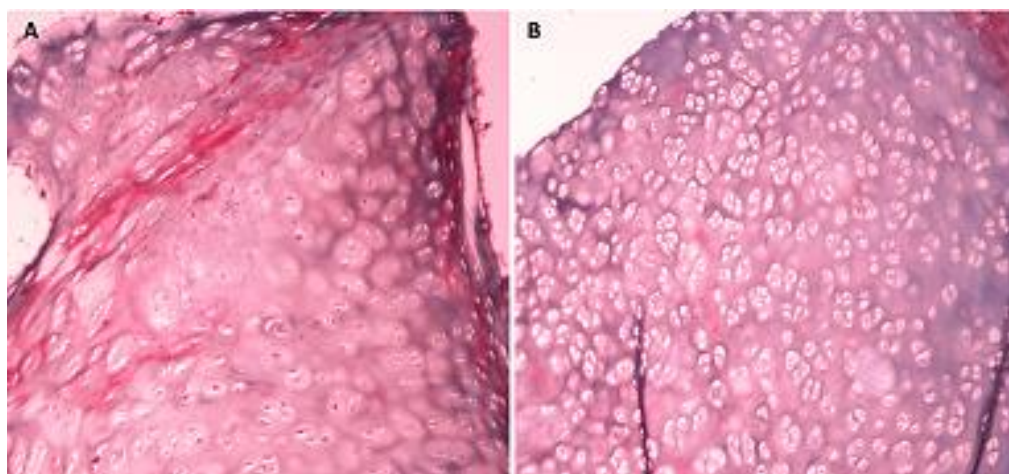


شکل ۲. مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده با نای دست‌نخورده به کمک رنگ‌آمیزی DAPI و میکروسکوپ فلورسنت (بزرگنمایی ۱۰۰X) (A) هسته‌ها به صورت نقاط آبی درخشان در نای دست‌نخورده. (B) عدم وجود نقاط درخشان در داربست سلول‌زدایی شده

نتایج ماسون تری کروم

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

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



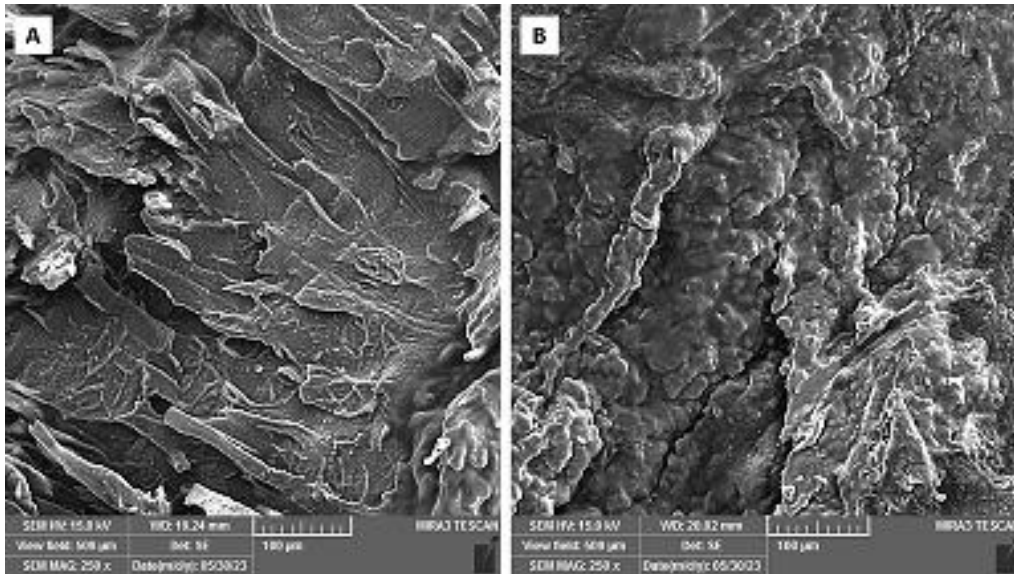
شکل ۳. مقایسه بافت‌شناسی داربست سلول‌زدایی شده با نای دست‌نخورده به کمک رنگ‌آمیزی ماسون تری کروم (بزرگنمایی ۱۰۰X) (A) نای دست‌نخورده. (B) داربست سلول‌زدایی شده

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

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



شکل ۴. تصاویر نای دست نخورده (A) و داربست سلول زدایی شده (B) حاصل از تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی نگاره

اتصال بالقوه بین آلفا-۷-بتا ۱ و فیبرونکتین ۱ ارائه می‌دهند (جدول ۲) (شکل ۵، F, E, D).

جدول ۱. اتصال پروتئین - پروتئین برای اینتگرین 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 Alpha-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

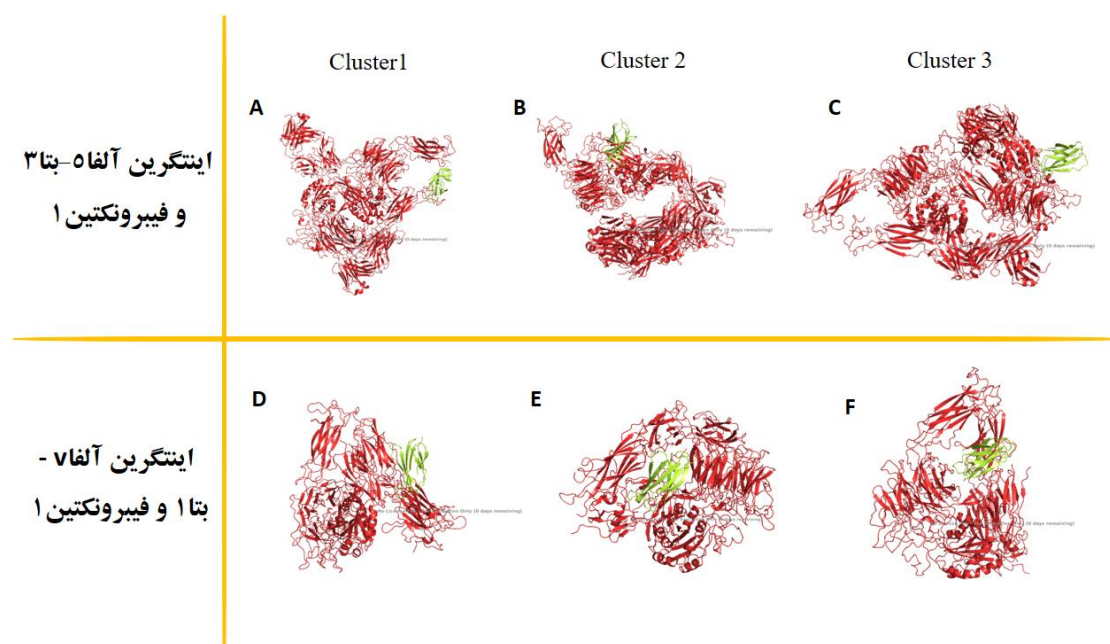
شبیه‌سازی‌های داکینگ پروتئین - پروتئین در سرور ClusPro برای تعامل بین Alpha5-Beta3، Fibronectin و alphaBeta1 بینش‌های دقیقی را با استفاده از سه معیار متمایز ارائه می‌کنند: Electrostatic-favored، Hydrophobic-favored، و VdW+Elec. برای درک جامع‌تر، فقط امتیازات متوازن برای سه Clusters برتر در نظر گرفته 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 ۵، A, B, C).

نتایج حاصل از آنالیز اتصال پروتئین - پروتئین برای اینتگرین آلفا-۷- بتا 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 اینتگرین و فیبرونکتین ۱ مربوط به پیش‌بینی‌های برتر در هر Cluster

تجزیه و تحلیل سرور HDOCK

سرور HDOCK نتایج ClusPro را با استفاده از Docking Score، Confidence Score و Ligand rmsd به عنوان معیاری برای برهمکنش Alpha5-Beta3 و Fibronectin تکمیل کرد.

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

۱. امتیاز اتصال^۱: 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 پایداری بین پروتئین‌ها است.

۲. امتیاز اطمینان^۲: امتیاز اطمینان نشان‌دهنده قابلیت اطمینان و سطح اطمینان مجموعه پروتئین- پروتئین پیش‌بینی‌شده است. فاکتورهایی مانند کیفیت ساختارهای ورودی، دقت الگوریتم 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 تعیین‌شده آن را اندازه‌گیری می‌کند. یک مقدار rmsd لیگاند کمتر نشان‌دهنده هم‌ترازی 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

¹ Docking Score

² Confidence Score

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

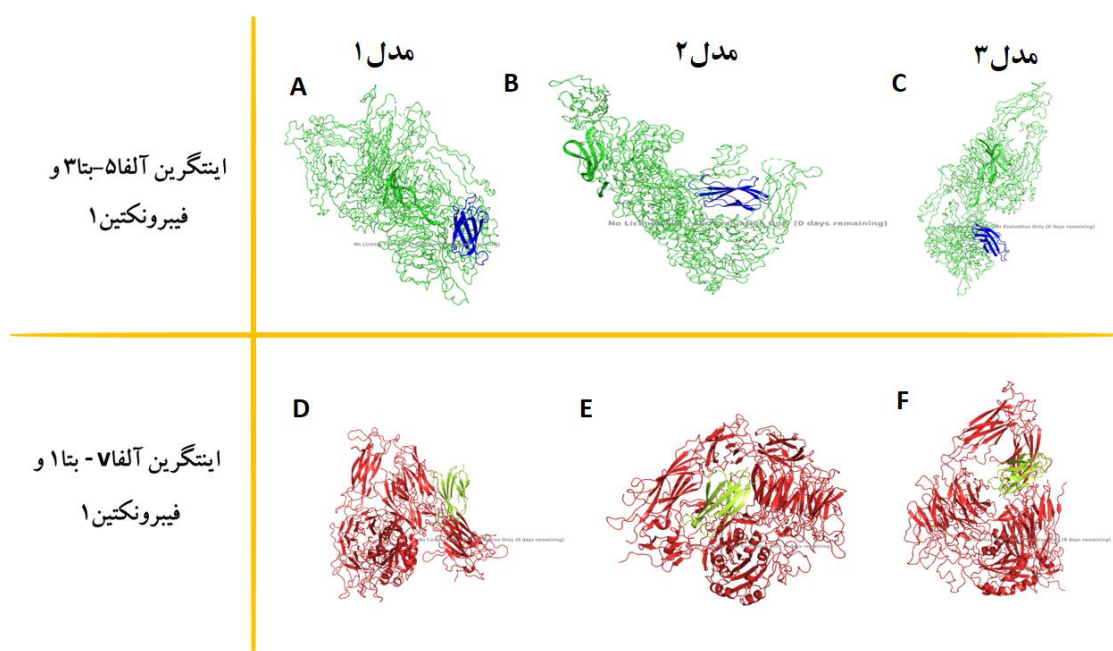
نتایج حاصل از آنالیز اتصال پروتئین-پروتئین برای اینتگرین $\alpha 1$ - $\beta 1$ و فیبرونکتین ۱

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 $\alpha 5$ - $\beta 3$ 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: $247/54$ - امتیاز اطمینان: 0.8755 و لیگاند rmsd (\AA): $1.24/2.0$)، (B) مدل ۲ (امتیاز Docking: 238.39 - امتیاز اطمینان: 0.85423 و لیگاند rmsd (\AA): $0.46/0.73$)، (C) مدل ۳ (امتیاز Docking: $236/94$ - امتیاز اطمینان: 0.85053 و لیگاند rmsd (\AA): $0.91/0.46$)، (D) مدل ۱ (امتیاز Docking: $275/89$ - امتیاز اطمینان: 0.9254 و لیگاند rmsd (\AA): $0.58/0.63$)، (E) مدل ۲ (امتیاز Docking: $272/66$ - امتیاز اطمینان: 0.92083 و لیگاند rmsd (\AA): $0.6/0.90$)، (F) مدل ۳ (امتیاز Docking: 251.01 - امتیاز اطمینان: 0.88293 و لیگاند rmsd (\AA): $0.55/0.95$)

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 مورفوژنز، تمایز و هموستاز بافت مورد نیاز است و نیچ‌های سلول‌های بنیادی

بحث

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

می‌باشد [۳۹،۴۰]. ECM از دو دسته اصلی ماکرومولکول‌ها تشکیل شده است: پروتئوگلیکان‌ها (PGs) و پروتئین‌های فیبری [۴۱]. پروتئین‌های فیبری ECM اصلی شامل کلاژن‌ها، الاستین‌ها، فیبرونکتین‌ها و لامینین‌ها هستند [۴۲]. PGها اکثر فضای بینابینی خارج سلولی داخل بافت را به شکل یک ژل هیدراته پر می‌کنند [۴۳]. سومین پروتئین فیبری، فیبرونکتین (FN) به‌طور مستقیم در هدایت سازمان‌دهی ECM بینابینی نقش دارد و علاوه‌براین، نقش مهمی در اتصال و عملکرد سلول دارد. و به‌عنوان یک جزء اصلی ماتریکس خارج سلولی، چسبندگی سلولی با واسطه اینتگرین را از طریق اتصال اینتگرین‌های $\alpha 5\beta 1$ ، $\alpha IIb\beta 3$ و کلاس αv به یک موتیف RGD امکان پذیر می‌کند [۴۴].

اینتگرین‌ها گیرنده‌های گذرغشایی هترودمیری هستند. یک مولکول اینتگرین از دو زیر واحد کلیکوپروتئین α و β 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^۱ 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 ائوزین (H&E) نشان داد که هسته‌ها تقریباً به‌طور کامل در بافت غیرغضروفی حذف شدند، تعداد کمی از هسته‌ها و بقایای سلولی در لکون‌ها باقی ماندند [۴۷]. در آزمایشات گیرالدو-گومز^۲ و همکاران پس از انجام مراحل سلول‌زدایی نای، تصاویر و داده‌های به‌دست‌آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)، حفظ ساختارهای ماتریکس خارج سلولی نای (ECM) را نشان داده و

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

دانن^۳ 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 $\alpha 4$ و $\beta 1$ 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 به‌دست آمد [۵۰].

مطالعات حاضر برای درک بهتر تعامل اینتگرین آلفا-۵-بتا ۳ و آلفا-۷-بتا ۱ با فیبرونکتین 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 HDOCK و ClusPro استفاده شد و توسط الگوریتم‌های HDOCK و ClusPro 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 $\alpha 5\beta 1$ ، $\alpha v\beta 3$ و Fibronectin، $\alpha 4\beta 1$ که امتیاز مرکز و امتیاز Lowest Energy

³ Danen

¹ Baignera

² Giraldo-Gomez

نتیجه گیری

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 به‌طور کلی داربست‌های آماده شده می‌تواند مدلی ایده‌آل برای کاربردهای مهندسی بافت باشند.

تشکر و قدردانی

نویسندگان بدینوسیله از تمامی افرادی که در دانشگاه محقق اردبیلی در انجام این تحقیق یاری کردند تشکر می‌کنند.

تعارض منافع

مقاله فاقد 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 Docking Score و Confidence Score و Ligand rmsd به عنوان معیاری برای برهمکنش -5-Alpha rmsd به عنوان معیار برای برهمکنش -3-Beta و Fibronectin تکمیل شد. در نهایت برهمکنش‌هایی که امتیاز داکینگ و امتیاز Confidence بالاتری و (Å) Ligand rmsd 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 پزشکی 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 Regen 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- Mulhaupt 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, Clauser 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, Räs 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- Novoseletskaia 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 $\alpha \nu \beta 3$ 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.