

Original Article

Computational Modeling and Validation of the Alpha Chain and Structural Modeling of Mature Macrophage-Stimulating Protein

Asrin Rashidi¹, Hadi Mohammadi², Bayazid Ghaderi³, Omid Zarei^{4*}

1. Ph.D. in Molecular Medicine, Department of Pediatrics, Besat Hospital, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

2. Associate Professor, Cancer and Immunology Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

3. Associate Professor, Cancer and Immunology Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

4. Assistant Professor, Cancer and Immunology Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

Article history:

Received: September 7, 2023

Revised: January 10, 2024

Accepted: January 17, 2024



***Corresponding author:** Omid Zarei, Assistant Professor, Cancer and Immunology Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

E-mail: o.zarei@muk.ac.ir

Abstract

Background and Aim: The receptor tyrosine kinase RON plays important roles in various biological processes, including cell proliferation, migration, and survival, and its dysregulation has been associated with various types of cancer. Macrophage-stimulating protein (MSP) consists of alpha and beta chains and activates RON upon binding. Despite structural studies on MSP, complete experimental structural information on its alpha chain is not available. This study aimed to model and validate the MSP alpha chain structure and the structure of mature MSP.

Materials and Methods: Models 1-3 of the MSP alpha chain were generated using SWISS-MODEL, I-TASSER, and AlphaFold. The mature MSP sequence, comprising amino acids 19–711, was modeled as a continuous sequence using AlphaFold to generate Model 4. The models were validated using Verify3D, PROCHECK, and ERRAT.

Results: In Models 1-3, 81.32%, 86.88%, and 82.58% of the amino acid residues, respectively, had 3D-1D scores of ≥ 0.1 , while this value was 79.37% for Model 4. According to the Ramachandran plots, 86.0%, 65.4%, and 84.5% of the residues in Models 1–3, respectively, were located in the most favored regions, compared to 88.2% in Model 4. No residues were located in the disallowed region. The ERRAT score for Model 4 was 93.15.

Conclusion: Modeling of MSP, particularly Model 4, provides more comprehensive coverage of the mature protein and may serve as a basis for future structural and computational studies of MSP and RON. Experimental validation of the MSP structure is necessary to complement the structural information obtained through computational modeling.

Keywords: Cancer, Computational modeling, Macrophage-stimulating protein (MSP), RON receptor, Three-dimensional protein structure

Please cite this article as follows: Rashidi A, Mohammadi H, Ghaderi B, Zarei O. Computational Modeling and Validation of the Alpha Chain and Structural Modeling of Mature Macrophage-Stimulating Protein. SJKUMS. 2026;31(4):339-352. DOI: 10.22034/31.4.339

مدل سازی و اعتبارسنجی محاسباتی زنجیره آلفا و مدل سازی ساختاری پروتئین محرک ماکروفاژ بالغ

اسرین رشیدی^۱ ID، هادی محمدی^۲ ID، بایزید قادری^۳ ID، امید زارعی^۴ * ID

۱. دکتری تخصصی پزشکی مولکولی، گروه کودکان، بیمارستان بعثت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان و ایمونولوژی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات سرطان و ایمونولوژی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران
۴. استادیار، مرکز تحقیقات سرطان و ایمونولوژی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

چکیده

زمینه و هدف: گیرنده تیروزین کینازی RON در فرایندهای زیستی، مانند تکثیر سلولی، مهاجرت و بقا، نقش دارد و اختلال در تنظیم آن با سرطان‌ها مرتبط است. پروتئین محرک ماکروفاژ (MSP) از دو زنجیره آلفا و بتا تشکیل شده است و با اتصال به RON، آن را فعال می‌کند. باوجود مطالعات ساختاری انجام شده در MSP، اطلاعات ساختاری تجربی کاملی از زنجیره آلفای آن در دسترس نیست. هدف این مطالعه، مدل سازی و اعتبارسنجی زنجیره آلفای MSP و مدل سازی ساختاری MSP بالغ بود.

مواد و روش‌ها: مدل های ۱ تا ۳ زنجیره آلفای MSP با استفاده از AlphaFold، I-TASSER، SWISS-MODEL، TASSER و I-TASSER، شامل اسیدهای آمینه ۱۹ تا ۷۱۱ به صورت توالی پیوسته با AlphaFold مدل سازی و مدل ۴ ایجاد شد. اعتبار مدل ها با استفاده از PROCHECK، Verify3D و ERRAT ارزیابی شد.

یافته‌ها: در مدل های ۱ تا ۳، به ترتیب ۸۱/۳۲، ۸۶/۸۸ و ۸۲/۵۸ درصد از اسیدهای آمینه امتیاز 3D-1D برابر یا بیشتر از ۰/۱ داشتند؛ این مقدار در مدل ۴ برابر ۷۹/۳۷ درصد بود. براساس نمودار رامچاندرا، ۸۶/۰، ۶۵/۴ و ۸۴/۵ درصد از اسیدهای آمینه مدل های ۱ تا ۳ در ناحیه مطلوب ترین قرار داشتند؛ این مقدار در مدل ۴ برابر ۸۸/۲ درصد بود و هیچ اسید آمینه ای در ناحیه غیرمجاز قرار نداشت. امتیاز ERRAT مدل ۴ برابر ۹۳/۱۵ بود.

نتیجه گیری: مدل سازی MSP، به ویژه مدل ۴، پوشش کامل تری از پروتئین بالغ فراهم می‌کند و می‌تواند مبنایی برای مطالعات ساختاری و محاسباتی آینده درباره MSP و RON باشد. تأیید تجربی ساختار MSP برای تکمیل اطلاعات حاصل از مدل سازی ضروری است.

واژگان کلیدی: سرطان، مدل سازی محاسباتی، پروتئین محرک ماکروفاژ (MSP)، گیرنده RON، ساختار سه بعدی پروتئین

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۱۴۰۲/۰۶/۱۶

ویرایش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۰

پذیرش: ۱۴۰۲/۱۰/۲۷

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی کردستان محفوظ است.

***نویسنده مسئول:** امید زارعی، استادیار، مرکز تحقیقات سرطان و ایمونولوژی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

ایمیل: o.zarei@muk.ac.ir

استناد: رشیدی، اسرین؛ محمدی، هادی؛ قادری، بایزید؛ زارعی، امید. مدل سازی و اعتبارسنجی محاسباتی زنجیره آلفا و مدل سازی ساختاری پروتئین محرک ماکروفاژ بالغ. مجله علمی دانشگاه علوم پزشکی کردستان، مهر و آبان ۱۴۰۵؛ ۳۱(۴): ۳۳۹-۳۵۲.

مقدمه

مولکولی در سرطان، توجه زیادی معطوف شده است. هدف اصلی از توسعه این درمان‌ها، هدف گیری اختصاصی تر سلول های سرطانی با هدف افزایش اثربخشی ضدتوموری و کاهش سمیت در سلول ها و بافت های طبیعی است [۳]. در درمان های هدفمند، عوامل درمانی می توانند به صورت مستقیم مولکول ها یا مسیرهای مولکولی دخیل در رشد و بقای سلول های سرطانی را هدف قرار دهند، یا به صورت غیرمستقیم از مولکول های اختصاصی یا

سرطان یکی از مهم ترین بیماری های تهدیدکننده زندگی است و براساس برآوردهای سال ۲۰۲۰، بیش از ده میلیون مورد مرگ در سراسر جهان به این بیماری نسبت داده شده است [۱]. امروزه، طیف وسیعی از روش ها برای درمان سرطان به کار گرفته می شوند که شامل جراحی، پرتودرمانی و درمان های دارویی، از جمله شیمی درمانی، هورمون درمانی، ایمنی درمانی و درمان های هدفمندند [۲]. در سال های اخیر، به توسعه درمان های هدفمند

اصلی تولید MSP هستند [۱۳]. پروتئین اولیه Pro-MSP با پروتئازهای سلولی به فرم بالغ و از نظر بیولوژیکی فعال MSP پردازش می‌شود که این فرم فعال متشکل از زنجیره‌های آلفا و بتا (α و β) است [۱۴، ۱۵].

زنجیره آلفای MSP از چهار دومین kringle تشکیل شده است، درحالی‌که زنجیره بتا ساختاری شبیه دومین سرین پروتئازی دارد؛ با این حال، سه اسید آمینه کلیدی در جایگاه فعال این دومین تغییر یافته‌اند. اگرچه زنجیره بتا در برهم‌کنش MSP با گیرنده RON نقش مهمی دارد، برای ایجاد فعالیت کامل بیولوژیکی MSP به تنهایی کافی نیست و فعالیت کامل لیگاند به ساختار MSP بالغ متشکل از هر دو زنجیره آلفا و بتا وابسته است [۱۶، ۱۷]. گرچه MSP به دلیل نقش آن در تحریک مهاجرت و فاگوسیتوز ماکروفاژها و تنظیم پاسخ‌های التهابی مورد توجه قرار گرفته است [۱۸]، نقش محور MSP-RON در فعال‌سازی مسیرهای مرتبط با تومورزایی موجب شده است که این محور به عنوان هدف بالقوه در درمان سرطان مورد توجه قرار گیرد. درباره شیوه‌های جلوگیری از فعال‌شدن محور RON-MSP به عنوان راهبرد بالقوه درمان سرطان، به طور گسترده مطالعه شده و تاکنون، مطالعات متعددی با هدف شناسایی مهارکننده‌های اختصاصی برای جلوگیری از فعال‌شدن محور RON-MSP در سلول‌های سرطانی با استفاده از آنتی‌بادی‌های مونوکلونال، پپتیدها و مولکول‌های کوچک انجام شده که نشان‌دهنده اهمیت این گیرنده به عنوان هدف درمانی است [۱۹]. همان‌طور که ذکر شد، MSP بالغ از دو زنجیره آلفا و بتا تشکیل شده است و برهم‌کنش این لیگاند با RON موجب تغییرات ساختاری و فعال‌سازی گیرنده و در ادامه، فعال‌شدن مسیرهای پیام‌رسانی پایین‌دستی می‌شود.

بنابراین، شناسایی نحوه اتصال بین RON-MSP در سطح مولکولی با استفاده از روش‌های مختلف، از جمله مطالعات محاسباتی، می‌تواند به درک بهتر برهم‌کنش RON-MSP و در نهایت، توسعه راهبردهای درمانی کمک کند. دسترسی به ساختار سه‌بعدی قابل اعتماد پروتئین‌ها یکی از عوامل مهم در بسیاری از مطالعات ساختاری و روش‌های مبتنی بر ساختار است. در مواردی که ساختار تجربی سه‌بعدی یک پروتئین در دسترس نباشد، روش‌های محاسباتی پیش‌بینی ساختار می‌توانند برای ایجاد یک مدل ساختاری و فراهم کردن چهارچوبی برای مطالعات بعدی استفاده شوند [۲۰]. درحالی‌که ساختار سه‌بعدی زنجیره بتای MSP با استفاده از کریستالوگرافی تعیین شده است [۲۱]، ساختار تجربی سه‌بعدی زنجیره آلفای MSP در دسترس نیست. بنابراین، با توجه به اهمیت محور RON-MSP به عنوان هدف بالقوه درمانی و دسترسی‌نداشتن به ساختار تجربی سه‌بعدی زنجیره آلفای MSP، هدف این مطالعه پیش‌بینی و ارزیابی ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای MSP با استفاده از روش‌های محاسباتی مختلف بود. پیش‌بینی این ساختار می‌تواند به

بیش‌بیان‌شده در سلول‌های سرطانی برای رساندن عوامل درمانی به این سلول‌ها استفاده کنند [۴، ۵].

امروزه، با پیشرفت چشمگیر در زمینه زیست‌شناسی سرطان، اهداف درمانی متعددی شناسایی شده‌اند و از مهم‌ترین موضوعات در درمان هدفمند، انتخاب مولکول هدف مناسب از میان این اهداف است. در میان اهداف درمانی شناخته‌شده، گیرنده‌های تیروزین کینازی در توسعه داروهای ضدسرطان اهمیت ویژه‌ای دارند [۶]. در انسان، ۵۸ گیرنده تیروزین کینازی شناخته شده است که در بیست خانواده طبقه‌بندی می‌شوند. گیرنده‌های تیروزین کینازی، گیرنده‌های غشایی تک‌گذری هستند که از لحاظ ساختاری سه قسمت خارج‌سلولی، غشاگذر و داخل‌سلولی دارند که قسمت خارج‌سلولی مسئول اتصال به لیگاند است و قسمت‌های داخل‌سلولی فعالیت تیروزین کینازی دارند [۷]. معمول‌ترین راه برای فعال‌سازی گیرنده‌های تیروزین کینازی، فعال‌سازی با واسطه لیگاند است، بدین صورت که پس از اتصال لیگاند اختصاصی به بخش خارج‌سلولی گیرنده، تغییرات ساختاری و در بسیاری از موارد، دایمریزاسیون گیرنده رخ می‌دهد و موجب فعال‌شدن حوزه تیروزین کینازی داخل‌سلولی و اتوفسفریلاسیون باقی‌مانده‌های تیروزین می‌شود. در ادامه، این فسفریلاسیون‌ها جایگاه‌هایی را برای اتصال پروتئین‌های دخیل در مسیرهای پیام‌رسانی داخل‌سلولی فراهم می‌کنند و مسیرهای مختلف مرتبط با تکثیر، بقا، تمایز، مهاجرت و تنظیم چرخه سلولی فعال می‌شوند [۸]. افزایش بیان، جهش، تقویت ژنی یا فعالیت نابه‌جای گیرنده‌های تیروزین کینازی در طیف وسیعی از سرطان‌ها مشاهده شده و همین موضوع سبب شده است که این گیرنده‌ها به عنوان یکی از اهداف درمانی مهم برای توسعه داروهای ضدسرطان مورد توجه قرار گیرند [۹].

گیرنده تیروزین کینازی (Recepteur d'Origine Nantais) RON، که از اعضای خانواده گیرنده تیروزین کینازی MET است و در سال ۱۹۹۳ شناسایی شد، یکی از این گیرنده‌های تیروزین کینازی است که نقش آن در القای تومورزایی به خوبی نشان داده شده است. مطالعات زیادی افزایش بیان و فعالیت نابه‌جای آن را در طیف وسیعی از سرطان‌ها، شامل سرطان‌های سینه، ریه، دستگاه گوارش، تخمدان، کبد، پروستات و کلیه، نشان داده‌اند. بنابراین، شواهد زیادی وجود دارد که محور RON-MSP می‌تواند هدف درمانی امیدبخشی برای توسعه داروهای ضد سرطانی باشد [۱۰].

لیگاند اختصاصی گیرنده تیروزین کینازی RON، پروتئینی با نام پروتئین محرک ماکروفاژ (Macrophage-stimulating protein; MSP) است که با عناوین دیگری، از جمله hepatocyte growth factor-like protein نیز شناخته می‌شود و پروتئینی است که با ژن (Macrophage Stimulating 1) MST1 کدگذاری می‌شود و برای اولین بار در سال ۱۹۷۶ شناسایی شد [۱۱، ۱۲]. هپاتوسیت‌ها یکی از منابع

فراهم کردن چهارچوب ساختاری برای بررسی برهم‌کنش MSP با گیرنده RON کمک کند و در مطالعات آینده برای بررسی ساختاری محور RON-MSP و طراحی محاسباتی ترکیبات ضدسرطان استفاده شود.

روش کار

جست‌وجو و آماده‌سازی توالی اسیدهای آمینه زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ: در مرحله اول، با هدف انجام مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ، توالی اسیدهای آمینه پروتئین محرک ماکروفاژ انسانی در پایگاه داده UniProt [۲۲] جست‌وجو و پروتئین مدنظر شناسایی شد. با استفاده از توضیحات مربوطه در این پایگاه داده، کل توالی این پروتئین و نیز محدوده اسیدهای آمینه ۱۹ تا ۴۸۳، مربوط به زنجیره آلفا، شناسایی و استخراج و با فرمت FASTA برای انجام مراحل بعدی ذخیره شد.

مدل‌سازی همولوژی (homology modeling) ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ: برای انجام مدل‌سازی همولوژی ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ، توالی اسیدهای آمینه‌های زنجیره آلفای این پروتئین، که در مرحله قبل ذخیره شده بود، در وب سرور SWISS-MODEL وارد شد [۲۳]. پس از جست‌وجوی الگوهای مرتبط و انتخاب مناسب‌ترین الگو براساس میزان شباهت توالی و معیارهای ارائه‌شده با سامانه، مدل ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ تولید شد. ساختار مدل منتخب، با فرمت PDB برای انجام آنالیزهای بعدی ذخیره شد.

مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ با استفاده از I-TASSER: با هدف پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ با استفاده از وب سرور I-TASSER، توالی اسیدهای آمینه زنجیره آلفا در این وب سرور وارد شد [۲۴]. پس از آماده‌شدن نتایج، ساختار مدل‌های تولیدشده با فرمت PDB ذخیره و برای انجام آنالیزهای بعدی استفاده شدند.

مدل‌سازی ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ با استفاده از AlphaFold: به‌منظور پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ، از سامانه AlphaFold استفاده شد [۲۵]. بدین ترتیب، توالی اسیدهای آمینه زنجیره آلفای این پروتئین، که در مرحله قبل استخراج و

ذخیره شده بود، در سامانه AlphaFold وارد و ساختار سه‌بعدی زنجیره آلفا با این سامانه پیش‌بینی شد. پس از تکمیل فرایند پیش‌بینی، ساختار مدل تولیدشده در قالب فایل PDB دریافت و برای انجام آنالیزهای بعدی ذخیره شد.

با توجه به اینکه پروتئین بالغ MSP از دو زنجیره آلفا و بتا تشکیل شده است و هدف از مدل‌سازی، دستیابی به اطلاعات ساختاری کامل‌تر از این پروتئین بود، در ادامه، ساختار سه‌بعدی شامل نواحی متناظر با هر دو زنجیره آلفا و بتا به‌صورت هم‌زمان با استفاده از سامانه AlphaFold پیش‌بینی شد. بدین منظور، توالی مربوط به هر دو زنجیره در سامانه به‌صورت توالی پیوسته وارد و مدل سه‌بعدی حاصل پس از تکمیل فرایند پیش‌بینی در قالب فایل PDB دریافت و ذخیره شد.

اعتبار سنجی مدل‌های تولیدشده: کیفیت ساختاری و اعتبار مدل‌های ساختار سه‌بعدی تولیدشده زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ با استفاده از سه وب‌سرویس Verify3D [۲۶]، PROCHECK [۲۷] و ERRAT [۲۸] ارزیابی شد. بدین صورت که فایل PDB هریک از مدل‌ها در این وب‌سرویس‌ها بارگذاری شد و نتایج ارزیابی هر ساختار به‌طور جداگانه ثبت و بررسی شد. در نهایت، نتایج حاصل از ارزیابی‌های ساختاری مدل‌ها با یکدیگر مقایسه و براساس مجموع نتایج آزمون‌های اعتبارسنجی، مدل دارای ویژگی‌های ساختاری مطلوب‌تر به‌عنوان مدل منتخب تعیین شد. برای نمایش ساختارها و تولید تصاویر مربوط به ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها نیز از نرم‌افزار PyMOL استفاده شد.

نتایج

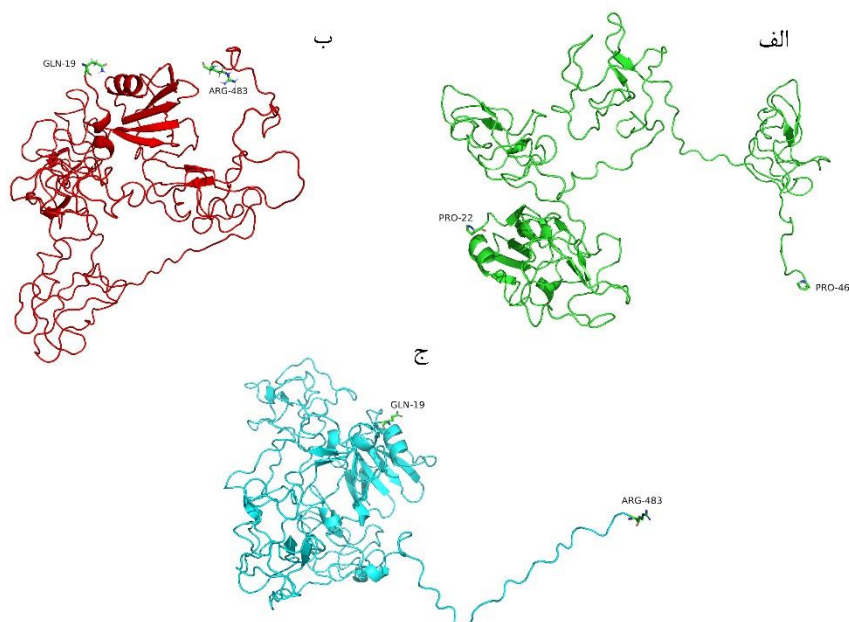
در ابتدا، با استفاده از جست‌وجو در پایگاه داده UniProt، توالی اسیدهای آمینه پروتئین محرک ماکروفاژ در انسان با کد اختصاصی P26927 شناسایی و استخراج شد. این پروتئین دارای ۷۱۱ اسید آمینه است که اسیدهای آمینه شماره ۱۹ تا ۴۸۳، زنجیره آلفای این پروتئین را تشکیل می‌دهند. این ناحیه شامل ۴۶۵ اسید آمینه است که هدف این مطالعه بود. اسیدهای آمینه شماره ۴۸۴ تا ۷۱۱ نیز زنجیره بتا را تشکیل می‌دهند و اسیدهای آمینه شماره ۱ تا ۱۸ مربوط به پپتید سیگنال هستند. در شکل ۱، توالی اسیدهای آمینه پروتئین محرک ماکروفاژ نمایش داده شده است که در آن، ناحیه مربوط به زنجیره آلفا با رنگ سبز مشخص شده است.

```
>sp|P26927|HGFL_HUMAN Hepatocyte growth factor-like protein
MGWLPLLLLLTQCLGVPGQ1RSPLNDFQVLRGTELQHLLHAVVPGPWQEDVADAE2ECAGRC
GPLMDCRAFHYNVSSHGCQLLPWTQHSPHTRLRRSGRCDLFQKKDYVRTCIMNNGVGYRG
TMATTVGGLPCQAWSHKFPNDHKYTPTLRNGLEENFCRNPDPGDPGGPW3CYTTDP4AVRFQS
CGIKSCREAACVWCNGEEYRGAVDRTESGRECQRWDLQHPHQHPFEPGKFLDQGLDDNYC
RNPDGSERPW5CYTTDPQIEREFCDLPRCGSEAQPRQEATTVSCFRGKGE6GYRG7TANTTTA
GVPCQRWDAQIPHQHRFTPEKYACKDLRENFCRNPDPGSEAPWCFTLRPGMRAAF8CYQIRR
CTDDVRPQDCYHGAGEQYRGTVSKTRKGVQCQRWSAETPHKPQFTTFTSEPHAQLEENFCR
NPDGDSHG9PWCYTMDPRT10PF11DYCALRR12CADDQPPSILDP13PDQVQFEK14CGKRV15DR16LDQRRS
KLRVVG17GHPGNSPWTVSLRNRQ18GQHFCG19SLVKEQWILTARQCFSSCHMPLTGYEVWLGT
LFQNPQHGEPSLQ20RVPVAKMVC21GPSGSQ22LVLLK23LSVTLNQRVALICLPPEWYVVP24PGT
KCEIAGWGETKGTGNDTVL25NVALLN26VISNQE27CNIK28HRGRVRESEMCTEGLLAPVGACEGD
YGGPLACFTHNCWVLEGIIPN29RV30CARS31RWPAVFTRVSVFVDWIHKV32MR33LG
```

شکل ۱. توالی اسید آمینه پروتئین محرک ماکروفاژ (رنگ سبز: اسیدهای آمینه مربوط به زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ؛ گلوتامین شماره ۱۹ تا آرژنین شماره ۴۸۳)

پلاسمینوژن با کد 4DUR در پایگاه داده پروتئین (PDB) به عنوان الگو انتخاب شد که میزان همسانی توالی آن با زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ ۴۶/۷۱ درصد بود. سپس، با اجرای دستور ساخت مدل، مدل سه بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ تولید و با فرمت PDB ذخیره شد. نمایی از این مدل در شکل ۲ (الف) نشان داده شده است. برای ساخت مدل با استفاده از وب سرور I-TASSER، توالی مدنظر وارد شد. از میان چهار مدل تولیدشده با این وب سرور، مدل دارای بالاترین C-score به عنوان مدل منتخب انتخاب شد (شکل ۲؛ ب)

در این مطالعه، از سه روش مدل سازی همولوژی، مدل سازی با روش Threading و پیش بینی ساختار با استفاده از AlphaFold برای ساخت مدل سه بعدی زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ استفاده شد. ابتدا، توالی اسیدهای آمینه شماره ۱۹ تا ۴۸۳ (شامل ۴۶۵ اسید آمینه)، که تشکیل دهنده زنجیره آلفای این پروتئین هستند، به منظور ساخت مدل همولوژی در وب سرور SWISS-MODEL وارد شد. از میان الگوهای شناسایی شده، که با توالی اسیدهای آمینه ۱۹ تا ۴۸۳ پروتئین محرک ماکروفاژ هم پوشانی داشتند، ساختار سه بعدی پروتئین



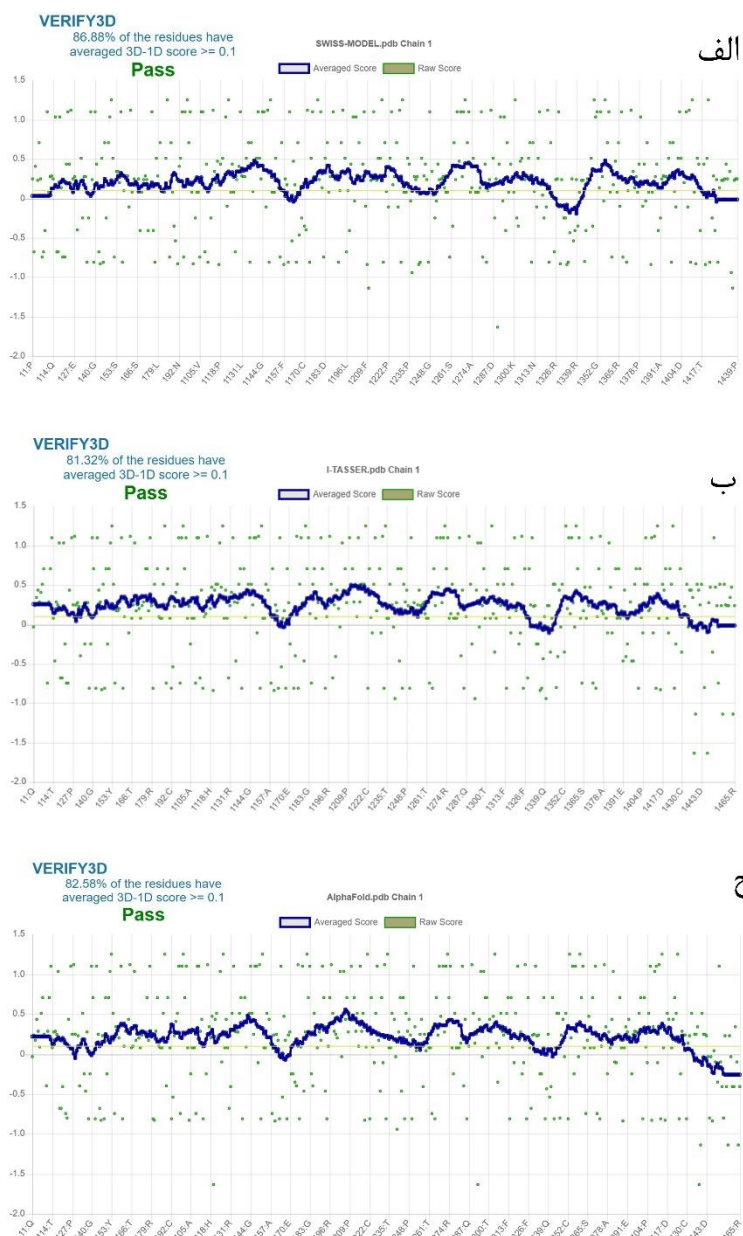
شکل ۲. ساختار سه بعدی مدل های ساخته شده از زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ (MSP)

(الف. مدل ۱، ساخته شده با روش مدل سازی همولوژی و استفاده از وب سرور SWISS-MODEL، در این مدل، سه اسید آمینه ابتدایی و ۲۳ اسید آمینه انتهایی زنجیره آلفا در ساختار وجود ندارند؛ ب. مدل ۲، ساخته شده با روش Threading و استفاده از وب سرور I-TASSER که در آن تمام اسیدهای آمینه زنجیره آلفا از گلوتامین ۱۹ تا آرژنین ۴۸۳ حضور دارند؛ ج. مدل ۳، ساخته شده با روش AlphaFold که در آن نیز تمام اسیدهای آمینه زنجیره آلفا از گلوتامین ۱۹ تا آرژنین ۴۸۳ در ساختار وجود دارند) این سامانه، ساختار پروتئین را با استفاده از روش های مبتنی بر درباره مدل پیش بینی شده با AlphaFold، با توجه به اینکه

همولوژی، I-TASSER و AlphaFold، به منظور اعتبارسنجی و ارزیابی کیفیت ساختاری مدل های تولید شده، هر سه مدل با استفاده از وب سرورهای Verify3D، PROCHECK و ERRAT ارزیابی شدند.

نتایج ارزیابی مدل ها با استفاده از وب سرور Verify3D نشان داد که در مدل ۱، به طور میانگین ۸۶/۸۸ درصد از اسیدهای آمینه این مدل دارای امتیاز 3D-1D بالاتر از ۰/۱ بودند، درحالی که این مقدار در مدل ۲ و مدل ۳ به ترتیب ۸۱/۳۲ و

شبکه های عصبی عمیق و بدون نیاز به انتخاب الگوی ساختاری توسط کاربر پیش بینی می کند، مدل حاصل به طور مستقیم با سامانه تولید شد. به منظور سهولت در مقایسه روش های مدل سازی، مدل ساخته شده براساس روش همولوژی تحت عنوان مدل ۱، مدل ساخته شده براساس روش Threading به عنوان مدل ۲ و ساختار پیش بینی شده با AlphaFold به عنوان مدل ۳ نام گذاری شدند. نمای کلی ساختار سه بعدی مدل ۳ نیز در شکل ۲ (ج) نشان داده شده است.



۸۲/۵۸ درصد بود (شکل ۳).

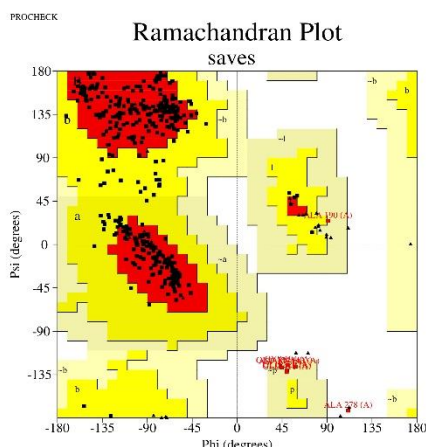
پس از ساخت سه مدل با استفاده از روش مدل سازی

شکل ۳. نمودار آنالیز ساختار مدل های ساخته شده برای زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفا: با استفاده از Verify3D

(الف. نتایج مربوط به مدل ۱، ساخته شده با روش مدل سازی همولوژی و استفاده از وب سرور SWISS-MODEL که نشان می دهد ۸۱/۳۲ درصد از اسیدهای آمینه این مدل امتیاز 3D-1D بالاتر از ۰/۱ دارند؛ ب. نتایج مربوط به مدل ۲، ساخته شده با روش Threading و استفاده از وب سرور I-TASSER که نشان می دهد ۸۶/۸۸ درصد از اسیدهای آمینه این مدل امتیاز 3D-1D بالاتر از ۰/۱ دارند؛ ج. نتایج مربوط به مدل ۳، ساخته شده با روش AlphaFold که نشان می دهد ۸۲/۵۸ درصد از اسیدهای آمینه این مدل امتیاز 3D-1D بالاتر از ۰/۱ دارند)

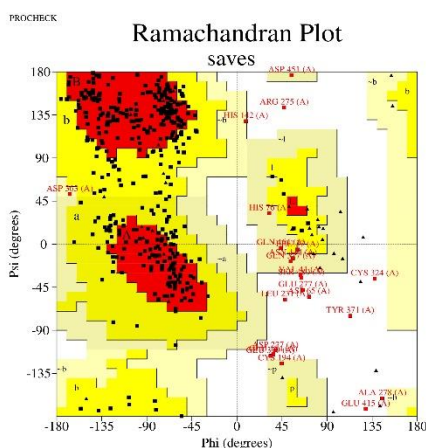
سه‌بعدی مدل ۱ وجود نداشتند. از میان ۳۶۴ اسید آمینه ارزیابی‌شده، ۳۱۳ اسید آمینه (۸۶ درصد) در ناحیه مطلوب‌ترین، ۴۳ اسید آمینه در ناحیه مجاز و ۷ اسید آمینه در ناحیه مجاز سخاوتمندانه قرار داشتند، درحالی‌که تنها یک اسید آمینه در ناحیه غیرمجاز نمودار رامچاندرا قرار گرفت.

براساس نمودار رامچاندرا به‌دست‌آمده از وب‌سرور PROCHECK (شکل ۴؛ الف)، مدل ۱ دارای ۴۳۹ اسید آمینه بود. با توجه به اینکه اسیدهای آمینه گلیسین و پرولین در ارزیابی نمودار رامچاندرا در نظر گرفته نشدند، تعداد اسیدهای آمینه ارزیابی‌شده در این مدل ۳۶۴ اسید آمینه بود. بنابراین، سه اسید آمینه ابتدایی و ۲۳ اسید آمینه انتهایی زنجیره آلفا در ساختار



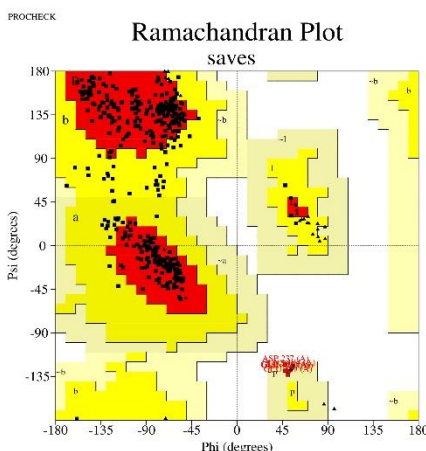
Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	313	86.0%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	43	11.8%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	7	1.9%
Residues in disallowed regions	1	0.3%
Number of non-glycine and non-proline residues	364	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	0	
Number of glycine residues (shown as triangles)	36	
Number of proline residues	39	
Total number of residues	439	

الف



Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	253	65.4%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	112	28.9%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	9	2.3%
Residues in disallowed regions	13	3.4%
Number of non-glycine and non-proline residues	387	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	37	
Number of proline residues	39	
Total number of residues	465	

ب



Plot statistics		
Residues in most favoured regions [A,B,L]	327	84.5%
Residues in additional allowed regions [a,b,l,p]	54	14.0%
Residues in generously allowed regions [-a,-b,-l,-p]	6	1.6%
Residues in disallowed regions	0	0.0%
Number of non-glycine and non-proline residues	387	100.0%
Number of end-residues (excl. Gly and Pro)	2	
Number of glycine residues (shown as triangles)	37	
Number of proline residues	39	
Total number of residues	465	

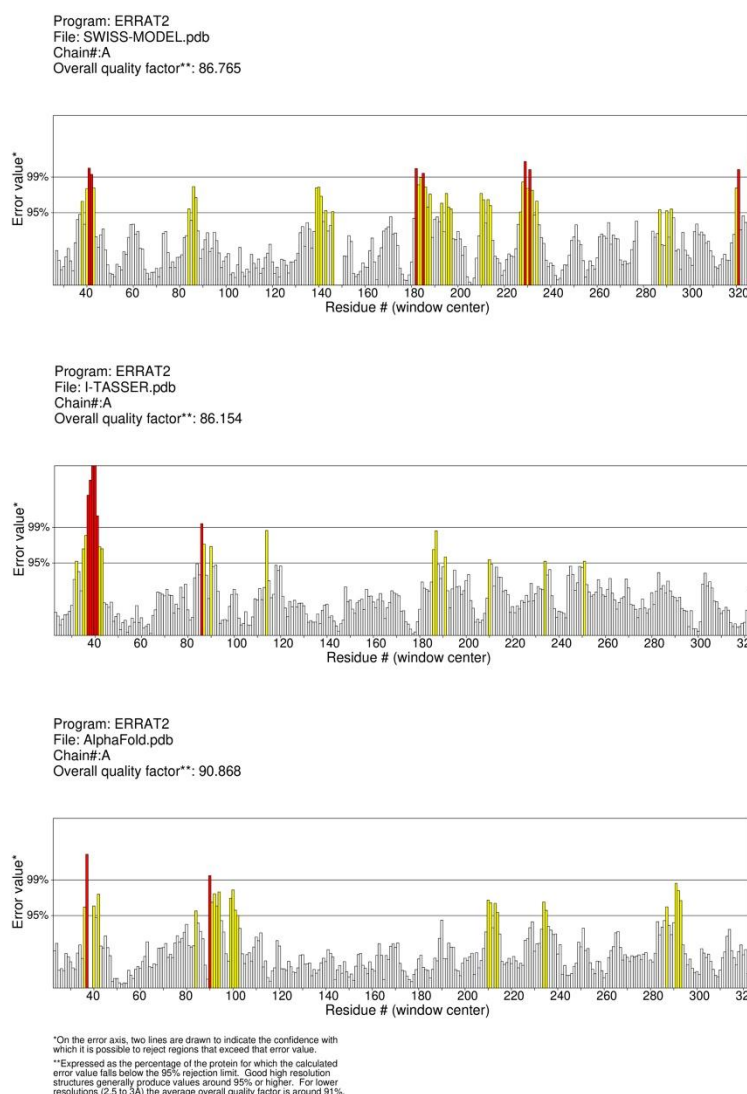
ج

شکل ۴. نمودار رامچاندرا مدل‌های ساخته‌شده برای زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ با استفاده از PROCHECK

(الف) مدل ۱، ساخته‌شده با روش مدل‌سازی همولوژی و استفاده از وب‌سرور SWISS-MODEL؛ ب. مدل ۲، ساخته‌شده با روش Threading و استفاده از وب‌سرور I-TASSER؛ ج. مدل ۳، ساخته‌شده با روش AlphaFold. درصد اسیدهای آمینه واقع در نواحی مطلوب‌ترین، مجاز، مجاز سخاوتمندانه و غیرمجاز نمودار رامچاندرا برای هر مدل در شکل نشان داده شده است)

تعداد کل اسیدهای آمینه، با احتساب اسیدهای آمینه گلیسین و پرولین، در مدل های به دست آمده با روش های Threading و AlphaFold برابر با ۴۶۵ اسید آمینه بود که با تعداد اسیدهای آمینه زنجیره آلفا مطابقت داشت. در مقابل، همان طور که پیش تر ذکر شد، در مدل ۱ حاصل از مدل سازی همولوژی، ۲۶ اسید آمینه از ساختار زنجیره آلفا وجود نداشت. به منظور ارزیابی بیشتر کیفیت ساختاری مدل های تولید شده، هر سه مدل زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ با استفاده از وب سرور ERRAT بررسی شدند. نتایج Overall Quality Factor براساس شاخص Overall Quality Factor نشان داد که امتیاز کیفیت کلی برای مدل های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۶/۷۶، ۸۶/۱۵ و ۹۰/۸۶ بود (شکل ۵).

برای مدل به دست آمده با روش Threading (مدل ۲)، نتایج نشان دهنده قرارگیری ۶۵/۴ درصد (۲۵۳) اسید آمینه از میان ۳۸۷ اسید آمینه مدل، بدون در نظر گرفتن اسیدهای آمینه گلیسین و پرولین در نواحی مطلوب ترین بود. از لحاظ قرارگیری اسیدهای آمینه در نواحی مجاز و مجاز سخاوتمندانه، این تعداد برای مدل ۲ به ترتیب ۱۱۲ اسید آمینه (۲۸/۹ درصد) و ۹ اسید آمینه (۲/۳ درصد) بود. همچنین، ۱۳ اسید آمینه (۳/۴ درصد) در ناحیه غیرمجاز قرار داشتند (شکل ۴؛ ب). در مدل ۳، از مجموع ۳۸۷ اسید آمینه ارزیابی شده، ۳۲۷ اسید آمینه (۸۴/۵ درصد) در ناحیه مطلوب ترین، ۵۴ اسید آمینه (۱۴ درصد) در ناحیه مجاز و ۶ اسید آمینه (۱/۶ درصد) در ناحیه مجاز سخاوتمندانه قرار داشتند. هیچ اسید آمینه ای در ناحیه غیرمجاز نمودار رامچاندرا قرار نگرفت (شکل ۴؛ ج).



الف

ب

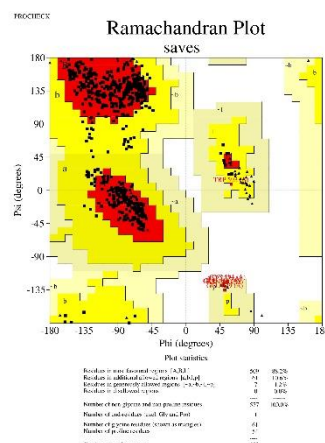
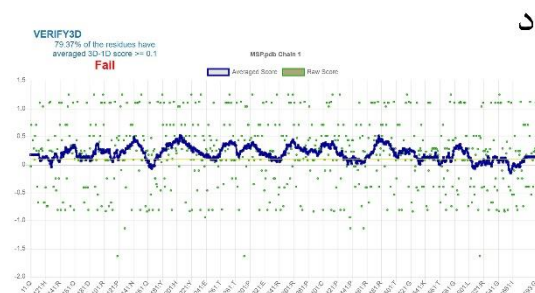
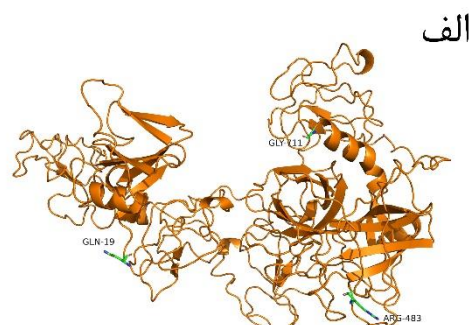
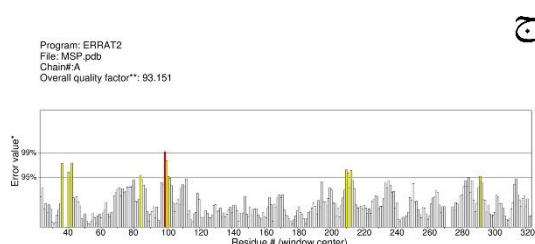
ج

شکل ۵. نمودار تحلیل کیفیت ساختاری مدل های ساخته شده برای زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ با استفاده از وب سرور ERRAT

(الف). نتایج مربوط به مدل ۱، ساخته شده با روش مدل سازی همولوژی و استفاده از وب سرور SWISS-MODEL؛ ب. نتایج مربوط به مدل ۲، ساخته شده با روش Threading و استفاده از وب سرور I-TASSER؛ ج. نتایج مربوط به مدل ۳، ساخته شده با روش AlphaFold. امتیاز کیفیت کلی (Overall Quality Factor) برای مدل های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۶/۷۶، ۸۶/۱۵ و ۹۰/۸۶ بود.

سامانه وارد و مدل سه بعدی حاصل، شامل ۶۹۳ اسید آمینه، در قالب فایل PDB ذخیره شد. این مدل به عنوان مدل ۴ در ادامه مطالعه در نظر گرفته شد (شکل ۶؛ الف) و از نظر کیفیت و اعتبار ساختاری، با استفاده از وبسرویس های Verify3D، PROCHECK و ERRAT ارزیابی شد.

با توجه به نتایج حاصل از ارزیابی سه مدل اولیه و با در نظر گرفتن اینکه پروتئین بالغ MSP از دو زنجیره آلفا و بتا تشکیل شده است، در ادامه، ساختار سه بعدی توالی بالغ MSP، شامل نواحی متناظر با هر دو زنجیره آلفا و بتا به صورت هم زمان با استفاده از AlphaFold پیش بینی شد. بدین منظور، توالی اسیدهای آمینه شماره ۱۹ تا ۷۱۱ به صورت توالی پیوسته در



شکل ۶. ساختار و ارزیابی کیفیت مدل ۴ پروتئین محرک ماکروفاژ (MSP) پیش بینی شده با استفاده از سامانه AlphaFold

(الف). ساختار سه بعدی مدل ۴، شامل نواحی متناظر با زنجیره های آلفا و بتا؛ ب. نمودار رامچاندرا حاصل از تحلیل با استفاده از PROCHECK؛ ج. نتایج ارزیابی کیفیت ساختاری با استفاده از وبسرویس ERRAT؛ د. نتایج ارزیابی سازگاری ساختار و توالی با استفاده از وبسرویس Verify3D

بر اساس معیار پذیرش مورد استفاده در این سامانه، مدل ۴ در ارزیابی Verify3D در وضعیت Fail قرار گرفت (شکل ۶؛ د). با این حال، نتایج حاصل از PROCHECK و ERRAT نشان دادند که مدل ۴ از نظر توزیع زوایای دی هدرال و کیفیت برهم کنش های غیریپوندی وضعیت مطلوبی دارد. بنابراین، ارزیابی کیفیت مدل ۴ بر اساس مجموعه ای از شاخص های ساختاری انجام گرفت و نتیجه Verify3D به عنوان یکی از محدودیت های مدل ۴ در نظر گرفته شد.

بحث

روش های محاسباتی امروزه در مطالعات زیستی، از جمله در طراحی و توسعه داروهای ضد سرطان، جایگاه مهمی پیدا کرده اند.

نتایج حاصل از ارزیابی مدل ۴ با استفاده از PROCHECK نشان داد که ۸۸/۲ درصد از اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب ترین، ۱۰/۶ درصد در ناحیه مجاز و ۱/۲ درصد در ناحیه مجاز سخاوتمندانه نمودار رامچاندرا قرار داشتند. همچنین، هیچ اسید آمینه ای در ناحیه غیرمجاز مدل ۴ مشاهده نشد (شکل ۶؛ ب). در ارزیابی کیفیت ساختاری مدل ۴ با استفاده از ERRAT، امتیاز ۹۳/۱۵ به دست آمد که از نظر برهم کنش های غیریپوندی و سازگاری هندسی ساختار، نشان دهنده کیفیت مناسب مدل ۴ بود (شکل ۶؛ ج)

در ادامه، مدل ۴ با استفاده از وبسرویس Verify3D ارزیابی شد. نتایج نشان داد که ۳۷/۷۹ درصد از اسیدهای آمینه مدل ۴ امتیاز میانگین 3D-1D برابر یا بیشتر از ۰/۱ داشتند.

در این زمینه، پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها اهمیت ویژه‌ای دارد [۲۹]؛ زیرا بسیاری از پروتئین‌ها به‌عنوان اهداف دارویی در بیماری‌های مختلف، ازجمله سرطان، مورد توجه قرار دارند [۳۰]. ازاین‌رو، دستیابی به اطلاعات ساختاری مناسب درباره پروتئین‌های دخیل در سرطان می‌تواند زمینه را برای انجام مطالعات ساختاری و در مراحل بعد، مطالعات محاسباتی مبتنی بر ساختار و طراحی دارو فراهم کند.

یکی از پروتئین‌های مورد توجه در این زمینه، پروتئین محرک ماکروفاژ (MSP) است که به‌عنوان لیگاند گیرنده تیروزین کینازی RON شناخته می‌شود. اتصال MSP به RON موجب القای تغییرات ساختاری و فعال‌شدن گیرنده و در پی آن، فعال‌شدن مسیرهای پیام‌رسانی داخل سلولی مرتبط با رشد، مهاجرت و تومورزایی می‌شود. ازاین‌رو، محور MSP/RON می‌تواند از نظر مطالعات مربوط به هدف‌گیری مولکولی و توسعه راهکارهای درمانی مورد توجه قرار گیرد [۱۹].

با توجه به نبود اطلاعات ساختاری تجربی کامل برای زنجیره آلفای MSP، در مطالعه حاضر ساختار سه‌بعدی این زنجیره، شامل اسیدهای آمینه ۱۹ تا ۴۸۳، با استفاده از سه رویکرد محاسباتی شامل مدل‌سازی همولوژی با SWISS-MODEL و پیش‌بینی ساختار با استفاده از I-TASSER و AlphaFold بررسی و ارزیابی شد. مدل‌سازی همولوژی یکی از روش‌های رایج برای پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌هایی است که ساختار تجربی آن‌ها تعیین نشده و بر استفاده از ساختار پروتئین‌های مشابه به‌عنوان الگو استوار است [۳۱].

در مطالعه حاضر، پس از جست‌وجوی الگوهای ساختاری مناسب در وب‌سرور SWISS-MODEL، ساختار پروتئین پلاسمینوژن با کد 4DUR به‌عنوان الگوی مدل‌سازی انتخاب شد. میزان همسانی توالی بین الگوی انتخاب‌شده و توالی زنجیره آلفای MSP برابر با ۴۶/۷۱ درصد بود. اگرچه در میان الگوهای شناسایی‌شده، ساختار فاکتور رشد سلول کبدی (Hepatocyte Growth Factor; HGF)، که لیگاند گیرنده MET و از نظر ساختاری با MSP مرتبط است، نیز مشاهده شد، الگوی 4DUR به‌دلیل برخورداری از ویژگی‌های مناسب‌تر در ارزیابی سامانه و میزان همسانی توالی، برای ساخت مدل انتخاب شد. MSP و HGF هر دو در خانواده فاکتورهای رشد مرتبط با پلاسمینوژن قرار دارند و وجود شباهت ساختاری و توالی میان این پروتئین‌ها با الگوهای ساختاری شناسایی‌شده، ازجمله پلاسمینوژن، قابل‌انتظار است [۳۲].

مدل‌سازی با روش Threading نیز رویکردی متفاوت برای پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌هاست که در آن، جست‌وجو برای یافتن الگوهای تاخوردگی مشابه پروتئین هدف انجام می‌شود. در مطالعه حاضر، از وب‌سرور I-TASSER استفاده شد که سامانه یکپارچه‌ای برای پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین

براساس هم‌ترازی‌های Threading، مونتاژ قطعات ساختاری و شبیه‌سازی‌های تکرارشونده و پالایش ساختاری است. I-TASSER برای تولید مدل‌های تمام‌طول از الگوهای شناسایی‌شده از طریق Threading استفاده می‌کند و مدل‌های حاصل را طی فرایند مونتاژ و پالایش ساختاری ارزیابی می‌کند [۲۴]. در حالت معمول، این سامانه می‌تواند چندین مدل نهایی را گزارش کند و مدل‌های حاصل براساس معیارهای داخلی سامانه برای ادامه بررسی انتخاب می‌شوند. در مطالعه حاضر، چهار مدل با I-TASSER تولید شد و از میان آن‌ها، مدل دارای بالاترین امتیاز برای ارزیابی‌های بعدی انتخاب شد.

مدل‌سازی با استفاده از AlphaFold نیز به‌عنوان یکی از روش‌های نوین پیش‌بینی ساختار سه‌بعدی پروتئین‌ها در این مطالعه استفاده شد. AlphaFold با بهره‌گیری از اطلاعات حاصل از توالی پروتئین و اطلاعات تکاملی موجود در توالی‌های همولوگ و با استفاده از روش‌های مبتنی بر یادگیری عمیق، ساختار سه‌بعدی پروتئین را پیش‌بینی می‌کند. این روش در ارزیابی‌های ساختار پروتئینی نشان داده است که می‌تواند در بسیاری از موارد ساختارهایی با دقت زیاد تولید کند [۲۵]. در مطالعه حاضر، ابتدا ساختار زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ با استفاده از AlphaFold پیش‌بینی و مدل حاصل به‌عنوان مدل ۳ بررسی شد. مدل ۳ شامل تمامی ۴۶۵ اسید آمینه زنجیره آلفا بود و در ادامه، کیفیت ساختاری آن در کنار دو مدل دیگر با استفاده از PROCHECK، Verify3D و ERRAT ارزیابی شد.

با توجه به اینکه پروتئین بالغ MSP از نواحی متناظر با زنجیره‌های آلفا و بتا تشکیل شده است، در ادامه مطالعه، مدل ساختاری MSP بالغ نیز با استفاده از AlphaFold پیش‌بینی شد. در این مرحله، توالی اسیدهای آمینه شماره ۱۹ تا ۷۱۱ به‌صورت توالی پیوسته وارد سامانه شد که دربرگیرنده نواحی متناظر با زنجیره‌های آلفا و بتا و در مجموع، شامل ۶۹۳ اسید آمینه بود. مدل حاصل در ادامه مطالعه به‌عنوان مدل ۴ در نظر گرفته شد. شایان ذکر است که در این مرحله، آلفا و بتا به‌صورت دو زنجیره مستقل وارد سامانه نشدند و مدل حاصل، نوعی مدل محاسباتی از توالی بالغ MSP است و بازنمایی صریح فرایند برش پروتئولیتیک و تشکیل دو زنجیره مستقل را انجام نمی‌دهد. باین‌حال، مدل ۴ امکان بررسی هم‌زمان نواحی متناظر با زنجیره‌های آلفا و بتا را در یک مدل ساختاری فراهم می‌کند.

در مدل ۱ ساخته‌شده با استفاده از SWISS-MODEL، تعداد ۲۶ اسید آمینه، شامل سه اسید آمینه ابتدایی و ۲۳ اسید آمینه انتهایی زنجیره آلفا، در ساختار نهایی وجود نداشت. بنابراین، تعداد اسیدهای آمینه موجود در مدل ۱ کمتر از دو مدل دیگر بود. ازاین‌رو، در مقایسه نتایج حاصل از ارزیابی‌های ساختاری مدل ۱ با مدل‌های ۲ و ۳، باید به این تفاوت در تعداد اسیدهای آمینه توجه شود.

آمین، شامل سه اسید آمینه ابتدایی و ۲۳ اسید آمینه انتهایی زنجیره آلفا در ساختار نهایی آن وجود نداشت، درحالی که مدل ۲ و ۳ شامل تمامی ۴۶۵ اسید آمینه زنجیره آلفا بودند. بنابراین، اگرچه درصد اسیدهای آمینه قرار گرفته در ناحیه مطلوب‌ترین در مدل ۱ بیشتر از دو مدل دیگر بود، این تفاوت به‌تنهایی نمی‌تواند نشان‌دهنده برتری مدل ۱ باشد.

در بررسی اسیدهای آمینه قرار گرفته در ناحیه غیرمجاز نیز تفاوت قابل‌توجهی میان سه مدل مشاهده شد. در مدل ۱، تنها یک اسید آمینه در ناحیه غیرمجاز قرار داشت، درحالی که این تعداد در مدل ۲ به ۱۳ اسید آمینه رسید. در مقابل، در مدل ۳ هیچ اسید آمینه‌ای در ناحیه غیرمجاز مشاهده نشد. وجود اسیدهای آمینه بیشتر در ناحیه غیرمجاز می‌تواند نشان‌دهنده وجود بخش‌هایی با زوایای دی‌هدرال نامطلوب و هندسه فضایی کمتر مطلوب در مدل باشد. از این نظر، مدل ۲ در مقایسه با مدل‌های ۱ و ۳، در ارزیابی نمودار رامچاندرا و وضعیت نامطلوب‌تری را نشان داد.

در مجموع، اگرچه مدل ۱ بالاترین درصد اسیدهای آمینه را در ناحیه مطلوب‌ترین نشان داد، با توجه به حذف ۲۶ اسید آمینه از ساختار آن، مقایسه مستقیم این مدل با مدل‌های ۲ و ۳ باید با احتیاط انجام شود. از سوی دیگر، مدل ۳ با وجود داشتن درصدی اندکی کمتر از مدل ۱ در ناحیه مطلوب‌ترین، تمامی ۴۶۵ اسید آمینه زنجیره آلفا را در بر داشت و هیچ اسید آمینه‌ای در ناحیه غیرمجاز مشاهده نشد. بنابراین، یافته‌های حاصل از نمودار رامچاندرا نشان داد که مدل‌های ۱ و ۳ از نظر توزیع اسیدهای آمینه در نواحی مطلوب و غیرمجاز در مقایسه با مدل ۲، وضعیت مناسب‌تری داشتند و مدل ۳ از این نظر وضعیت مطلوبی را نشان داد.

در ارزیابی مدل ۴، که شامل توالی بالغ MSP و نواحی متناظر با زنجیره‌های آلفا و بتا بود، ۸۸/۲ درصد از اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب‌ترین، ۱۰/۶ درصد در ناحیه مجاز و ۱/۲ درصد در ناحیه مجاز سخاوتمندانه نمودار رامچاندرا قرار داشتند و هیچ اسید آمینه‌ای در ناحیه غیرمجاز مشاهده نشد. بنابراین، از نظر توزیع زوایای دی‌هدرال و شاخص‌های حاصل از نمودار رامچاندرا، مدل ۴ وضعیت مطلوبی را نشان داد.

به‌طور کلی، براساس نتایج حاصل از ارزیابی‌های ساختاری، هر سه مدل اولیه تولیدشده می‌توانند اطلاعات ساختاری ارزشمندی درباره زنجیره آلفای پروتئین محرک ماکروفاژ فراهم کنند. با این حال، تفاوت در تعداد اسیدهای آمینه موجود در مدل ۱ و همچنین نتایج متفاوت حاصل از معیارهای مختلف اعتبارسنجی باید در انتخاب مدل مناسب برای مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد. در میان مدل‌های ۱ تا ۳، مدل ۳، که با استفاده از AlphaFold تولید شده بود، ضمن دربرگرفتن تمامی ۴۶۵ اسید آمینه زنجیره آلفا، در ارزیابی نمودار رامچاندرا هیچ اسید آمینه‌ای در ناحیه غیرمجاز نداشت و در ارزیابی ERRAT

ساختارهای ساخته‌شده با هر سه روش (مدل‌های ۱ تا ۳) با استفاده از وب‌سرورهای PROCHECK، Verify3D، و ERRAT ارزیابی شدند. در روش Verify3D، سازگاری مدل سه‌بعدی با توالی اسیدهای آمینه متناظر آن براساس میزان سازگاری ویژگی‌های ساختاری محیط هر اسید آمینه با ویژگی‌های مورد انتظار برای آن توالی ارزیابی می‌شود. این روش با استفاده از پروفایل‌های سه‌بعدی، میزان سازگاری ساختار سه‌بعدی مدل با توالی یک‌بعدی متناظر را بررسی و برای هر ناحیه از ساختار، امتیاز 3D-1D تعیین می‌کند [۲۶]. نتایج حاصل از این ارزیابی نشان داد که درصد اسیدهای آمینه دارای امتیاز 3D-1D برابر یا بیشتر از ۰/۱ در مدل‌های ۱، ۲ و ۳ به‌ترتیب ۸۱/۳۲، ۸۶/۸۸ و ۸۲/۵۸ درصد بود. بنابراین، هر سه مدل توانستند معیار مورد بررسی در Verify3D را تأمین کنند، هرچند مدل ۲ در این ارزیابی، در مقایسه با دو مدل دیگر امتیاز بالاتری نشان داد. از آنجا که تأیید یک ساختار براساس یک معیار یا یک وب‌سرور به‌تنهایی نمی‌تواند اعتبار کلی یک مدل پروتئینی را مشخص کند، برای ارزیابی بیشتر، ساختارهای مورد مطالعه با استفاده از نمودار رامچاندرا در وب‌سرور PROCHECK و همچنین روش ERRAT بررسی شدند. نتایج حاصل از این ارزیابی‌های تکمیلی تفاوت‌های بیشتری را میان سه مدل نشان دادند.

در مورد مدل ۴، درصد اسیدهای آمینه دارای امتیاز 3D-1D برابر یا بیشتر از ۰/۱ برابر با ۷۹/۳۷ درصد بود. بنابراین، برخلاف مدل‌های ۱ تا ۳، مدل ۴ براساس معیار پذیرش مورد استفاده در Verify3D در وضعیت Fail قرار گرفت. این نتیجه نشان می‌دهد که اگرچه بخش قابل توجهی از توالی مدل ۴ از نظر سازگاری توالی-ساختار امتیاز قابل قبول دریافت کرده است، مدل در مجموع نتوانسته است آستانه مورد استفاده در این ارزیابی را تأمین کند. با این حال، این نتیجه به‌تنهایی به معنای نامعتبر بودن کل مدل نیست؛ زیرا Verify3D تنها یکی از شاخص‌های ارزیابی کیفیت ساختاری است و در مدل ۴، نتایج حاصل از PROCHECK و ERRAT نیز باید در کنار آن مورد توجه قرار گیرند.

براساس یافته‌های به‌دست‌آمده از نمودار رامچاندرا در وب‌سرور PROCHECK، مدل ۱، یعنی مدل ساخته‌شده با روش مدل‌سازی همولوژی، براساس زوایای دی‌هدرال فی (φ) و سای (ψ)، دارای ۸۶ درصد اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب‌ترین بود، درحالی که این مقدار برای مدل‌های ۲ و ۳، که به‌ترتیب با استفاده از I-TASSER و AlphaFold تولید شده بودند، ۶۵/۴ و ۸۴/۵ درصد به دست آمد. اگرچه براساس این شاخص، مدل ۱ درصد بالاتری از اسیدهای آمینه را در ناحیه مطلوب‌ترین نشان داد، اما در تفسیر این نتیجه باید تعداد اسیدهای آمینه موجود در ساختار هر مدل نیز مورد توجه قرار گیرد. همان‌طور که پیش‌تر اشاره شد، مدل ۱ شامل ۴۳۹ اسید آمینه بود و ۲۶ اسید

نیز در مقایسه با دو مدل دیگر، امتیاز بالاتری نشان داد. از این رو، مدل ۳ را می توان به عنوان مدل ساختاری مناسبی برای مطالعات بعدی مربوط به زنجیره آلفای MSP در نظر گرفت.

با توجه به اینکه مدل های ۱ تا ۳ تنها ساختار زنجیره آلفا را پوشش می دهند، در حالی که مدل ۴ شامل کل توالی بالغ MSP و نواحی متناظر با زنجیره های آلفا و بتاست، انتخاب میان این مدل ها باید براساس هدف مطالعه انجام شود. بنابراین، مدل ۳ می تواند برای مطالعاتی مناسب باشد که صرفاً بر ساختار زنجیره آلفا متمرکزند، در حالی که مدل ۴ امکان بررسی ساختاری گسترده تر MSP بالغ و نواحی متناظر با هر دو زنجیره آلفا و بتا را فراهم می کند؛ این تمایز در استفاده از مدل ها برای مطالعات ساختاری و برهم کنش MSP/RON اهمیت دارد.

در ارزیابی کیفیت ساختاری با استفاده از ERRAT نیز تفاوت هایی میان مدل های مورد بررسی مشاهده شد. ERRAT با بررسی الگوهای برهم کنش های غیرپیوندی میان اتم ها، بخش هایی از ساختار را شناسایی می کند که ممکن است خطاهای ساختاری داشته باشند و از این طریق شاخصی برای ارزیابی کیفیت مدل فراهم می کند [۳۶]. در مطالعه حاضر، امتیاز ERRAT برای مدل های ۱، ۲ و ۳ به ترتیب ۸۶/۷۶، ۸۶/۱۵ و ۹۰/۸۶ به دست آمد. بنابراین، مدل ۳ در میان مدل های مربوط به زنجیره آلفا بالاترین امتیاز ERRAT را نشان داد و این نتیجه در کنار یافته های حاصل از PROCHECK، از مناسب بودن نسبی مدل ۳ برای نمایش ساختار زنجیره آلفا حمایت می کند.

درخصوص مدل ۴، امتیاز ERRAT برابر با ۹۳/۱۵ به دست آمد که از امتیاز هر سه مدل اولیه بیشتر بود. این یافته نشان می دهد که مدل ۴ از نظر الگوی برهم کنش های غیرپیوندی و شاخص مورد استفاده در ERRAT وضعیت مطلوبی دارد. با این حال، امتیاز بالاتر ERRAT در مدل ۴ نباید به تنهایی به عنوان اثبات صحت کامل مدل تفسیر شود؛ زیرا ارزیابی کیفیت ساختاری باید براساس مجموعه ای از معیارهای مستقل انجام گیرد. درخصوص مدل ۴، این موضوع اهمیت بیشتری دارد؛ زیرا درحالی که PROCHECK و ERRAT نتایج مطلوبی نشان دادند، Verify3D مدل را براساس آستانه استفاده شده در وضعیت Fail قرار داد. بنابراین، مجموعه نتایج نشان می دهد که مدل ۴ از نظر هندسه کلی و الگوی برهم کنش های غیرپیوندی وضعیت مناسبی دارد، اما همچنان در سازگاری توالی-ساختار محدودیت دارد که باید هنگام استفاده از آن در مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد.

اگرچه تعیین ساختار سه بعدی پروتئین ها، با استفاده از روش های تجربی، مانند کریستالوگرافی، اطلاعات ساختاری با دقت زیادی را فراهم می کند، پیچیدگی مراحل انجام این روش ها، نیاز به آماده سازی نمونه مناسب و هزینه بر بودن آن ها باعث شده است روش های محاسباتی پیش بینی ساختار نیز جایگاه مهمی

در مطالعات ساختاری پروتئین ها داشته باشند. روش های مبتنی بر مدل سازی محاسباتی معمولاً در مقایسه با برخی روش های تجربی، به زمان و هزینه کمتری نیاز دارند و می توانند در شرایطی که ساختار تجربی پروتئین در دسترس نیست، اطلاعات ساختاری اولیه و قابل استفاده ای فراهم کنند. با این حال، مدل های محاسباتی جایگزین ساختار تجربی نیستند و اعتبار آن ها باید با استفاده از معیارهای ساختاری و در صورت امکان، با داده های تجربی ارزیابی شود.

در مطالعات ساختاری انجام شده روی گیرنده MET و لیگاند آن، یعنی فاکتور رشد سلول کبدی (Hepatocyte Growth Factor; HGF) و همچنین، پروتئین پلاسمینوژن، که در این مطالعه به عنوان الگوی ساختاری استفاده شد، اطلاعات ساختاری متعددی با استفاده از روش های کریستالوگرافی به دست آمده است [۳۳-۳۵]. با این حال، درباره تعیین ساختار کامل MSP و بررسی برهم کنش آن با گیرنده RON با استفاده از روش های کریستالوگرافی، اطلاعات تجربی موجود عمدتاً بر بخش های خاصی از MSP متمرکز بوده است. از جمله این مطالعات، کارافولی و همکاران در سال ۲۰۰۵ با تولید پروتئین نو ترکیب و انجام مطالعات کریستالوگرافی، ساختار زنجیره بتای MSP را تعیین کردند [۲۱]. با این حال، این مطالعه اطلاعات ساختاری کاملی از زنجیره آلفای MSP، شامل اسیدهای آمینه شماره ۱۹ تا ۴۸۳، فراهم نمی کند.

چاو و همکاران در سال ۲۰۱۴ مطالعه جامع تری انجام دادند که در آن، ساختار ناحیه خارج سلولی RON در کمپلکس با زنجیره بتای MSP با استفاده از کریستالوگرافی بررسی شد. در این مطالعه، ساختار RON Sema-PSI-IPT1 در کمپلکس با MSPβ با وضوح ۳/۰ آنگستروم تعیین شد و درباره نحوه شناسایی MSPβ با ناحیه Sema گیرنده RON اطلاعات ساختاری مهمی به دست آمد. با این حال، بخش مربوط به MSP در ساختار کریستالوگرافی همچنان عمدتاً به زنجیره بتا محدود بود و ساختار کامل زنجیره آلفای MSP در این کمپلکس تعیین نشد [۳۶].

بنابراین، اگرچه ساختارهای تجربی موجود اطلاعات مهمی درباره زنجیره بتای MSP و نحوه برهم کنش آن با RON فراهم کرده اند، این ساختارها درباره آرایش فضایی کل MSP بالغ، شامل نواحی متناظر با زنجیره های آلفا و بتا، اطلاعات کاملی فراهم نمی کنند. این موضوع اهمیت استفاده از مدل های محاسباتی را برای ارائه دیدگاه ساختاری گسترده تر از MSP، در کنار محدودیت های ذاتی این مدل ها، نشان می دهد.

اگرچه بررسی هریک از نواحی متناظر با زنجیره های آلفا و بتا به صورت جداگانه می تواند اطلاعات ارزشمندی درباره ویژگی های ساختاری MSP و نحوه برهم کنش آن با گیرنده RON فراهم کند، در نظر گرفتن هر دو ناحیه در یک مدل

نتیجه‌گیری

درمجموع، یافته‌های این مطالعه نشان داد که مدل‌سازی محاسباتی می‌تواند اطلاعات ساختاری ارزشمندی از پروتئین محرک ماکروفاژ (MSP) فراهم کند، به‌ویژه در شرایطی که اطلاعات ساختاری تجربی کامل از این پروتئین در دسترس نیست. درنظرگرفتن ساختار بالغ MSP، شامل نواحی متناظر با هر دو زنجیره آلفا و بتا، امکان بررسی ساختاری پروتئین با پوشش کامل‌تری را فراهم می‌کند و می‌تواند درباره بررسی زنجیره آلفا به‌تنهایی، دیدگاه جامع‌تری ارائه دهد.

مدل‌های ساختاری حاصل می‌توانند به‌عنوان منابع محاسباتی برای مطالعات آینده درباره ویژگی‌های ساختاری MSP و برهم‌کنش آن با گیرنده RON استفاده شوند. بااین‌حال، با توجه به ماهیت پیش‌بینی‌شده این ساختارها، تأیید تجربی ساختار MSP شامل هر دو زنجیره آلفا و بتا همچنان برای تعیین دقیق آرایش فضایی پروتئین و تکمیل اطلاعات حاصل از مدل‌سازی محاسباتی ضروری است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان از دانشگاه علوم پزشکی کردستان به‌دلیل حمایت از انجام این پژوهش قدردانی می‌کنند.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه حاصل طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی کردستان با کد اخلاق IR.MUK.REC.1401.106 است.

تعارض منافع

نویسندگان اعلام می‌کنند که درخصوص انتشار این مقاله هیچ‌گونه تعارض منافی وجود ندارد.

حمایت مالی

این پژوهش هیچ‌گونه حمایت مالی از سوی سازمان‌ها، مؤسسات یا نهادهای دولتی یا خصوصی دریافت نکرده است.

ساختاری می‌تواند دیدگاه کامل‌تری از سازمان فضایی پروتئین بالغ MSP ایجاد کند. این موضوع به‌ویژه در مطالعات بیوانفورماتیکی و بررسی‌های ساختاری برهم‌کنش MSP/RON اهمیت دارد؛ زیرا MSP بالغ پس از پردازش پروتئولیتیکی به زنجیره‌های آلفا و بتا تبدیل می‌شود و این دو زنجیره همچنان از طریق پیوندهای دی‌سولفیدی با یکدیگر مرتبط باقی می‌مانند [۳۵]. بنابراین، پیش‌بینی ساختار MSP، با درنظرگرفتن هم‌زمان نواحی متناظر با زنجیره‌های آلفا و بتا، می‌تواند از نظر ارائه مدل ساختاری با پوشش کامل‌تر در مقایسه با مدل زنجیره آلفا به‌تنهایی، اطلاعات بیشتری فراهم کند.

نتایج حاصل از ارزیابی مدل ۴ با استفاده از Verify3D، PROCHECK و ERRAT نشان داد که اگرچه مدل در ارزیابی Verify3D، براساس معیار پذیرش این سامانه در وضعیت Fail قرار گرفت، در ارزیابی PROCHECK، ۸۸/۲ درصد از اسیدهای آمینه در ناحیه مطلوب‌ترین قرار داشتند و هیچ اسید آمینه‌ای در ناحیه غیرمجاز مشاهده نشد. همچنین، امتیاز ERRAT مدل ۴ برابر با ۹۳/۱۵ به دست آمد. این نتایج نشان می‌دهند که مدل ۴ از نظر برخی شاخص‌های مهم هندسی و کیفیت ساختاری وضعیت مطلوبی دارد، هرچند محدودیت مشاهده‌شده در Verify3D باید در تفسیر نتایج و استفاده از مدل برای مطالعات بعدی مورد توجه قرار گیرد. بااین‌حال، از آنجاکه مدل ۴ حاصل پیش‌بینی محاسباتی براساس توالی بالغ MSP است و جایگزین تعیین ساختار تجربی پروتئین نمی‌شود، دستیابی به ساختار تجربی MSP، شامل نواحی متناظر با هر دو زنجیره آلفا و بتا، می‌تواند اطلاعات دقیق‌تری درباره آرایش فضایی این دو بخش و ارتباط آن‌ها با یکدیگر فراهم کند. همچنین، تعیین ساختار تجربی می‌تواند امکان بررسی دقیق‌تر نحوه سازمان‌یافتگی MSP بالغ و ارتباط ساختاری آن با گیرنده RON را فراهم کند. از این‌رو، تعیین ساختار تجربی MSP با روش‌هایی مانند کریستالوگرافی یا دیگر روش‌های مناسب تعیین ساختار پروتئین همچنان می‌تواند به‌عنوان مسیر مهمی برای تأیید و تکمیل اطلاعات ساختاری حاصل از مدل‌های محاسباتی در نظر گرفته شود.

REFERENCES

- Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021;71(3):209-49. [DOI: 10.3322/caac.21660]
- Debela DT, Muzazu SG, Heraro KD, Ndalama MT, Mesele BW, Haile DC, et al. New approaches and procedures for cancer treatment: current perspectives. *SAGE Open Med*. 2021;9:20503121211034366. [DOI: 10.1177/20503121211034366]
- Lee YT, Tan YJ, Oon CE. Molecular targeted therapy: treating cancer with specificity. *Eur J Pharmacol*. 2018;834:188-96. [DOI: 10.1016/j.ejphar.2018.07.034]
- Veselov VV, Nosyrev AE, Jicsinszky L, Alyautdin RN, Cravotto G. Targeted delivery methods for anticancer drugs. *Cancers (Basel)*. 2022;14(3):622. [DOI: 10.3390/cancers14030622]
- Min H-Y, Lee H-Y. Molecular targeted therapy for anticancer treatment. *Exp Mol Med*. 2022;54(10):1670-94. [DOI: 10.1038/s12276-022-00864-3v]
- Yamaoka T, Kusumoto S, Ando K, Ohba M, Ohmori T. Receptor tyrosine kinase-targeted cancer therapy. *Int J Mol Sci*. 2018;19(11):3491. [DOI: 10.3390/ijms19113491]
- Hubbard SR, Till JH. Protein tyrosine kinase structure and function. *Annu Rev Biochem*. 2000;69(1):373-98. [DOI: 10.1146/annurev.biochem.69.1.373]
- Trenker R, Jura N. Receptor tyrosine kinase activation: from the ligand perspective. *Curr Opin Cell Biol*. 2020;63:174-85. [DOI: 10.1016/j.ceb.2020.01.016]
- Lemmon MA, Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell*. 2010;141(7):1117-34. [DOI: 10.1016/j.cell.2010.06.011]
- Hunt BG, Fox LH, Davis JC, Jones A, Lu Z, Waltz SE. An introduction and overview of RON receptor tyrosine

- kinase signaling. *Genes (Basel)*. 2023;14(2):517. [DOI: [10.3390/genes14020517](https://doi.org/10.3390/genes14020517)]
11. Leonard EJ, Skeel AH. Isolation of macrophage stimulating protein (MSP) from human serum. *Exp Cell Res*. 1978;114(1):117-26. [DOI: [10.1016/0014-4827\(78\)90043-5](https://doi.org/10.1016/0014-4827(78)90043-5)]
 12. Leonard E, Skeel A. A serum protein that stimulates macrophage movement, chemotaxis and spreading. *Exp Cell Res*. 1976;102(2):434-8. [DOI: [10.1016/0014-4827\(76\)90065-3](https://doi.org/10.1016/0014-4827(76)90065-3)]
 13. Bezerra JA, Witte DP, Aronow BJ, Friezner Degen SJ. Hepatocyte-specific expression of the mouse hepatocyte growth factor-like protein. *Hepatology*. 1993;18(2):394-9. [Link]
 14. Skeel A, Yoshimura T, Showalter SD, Tanaka S, Appella E, Leonard E. Macrophage stimulating protein: purification, partial amino acid sequence, and cellular activity. *J Exp Med*. 1991;173(5):1227-34. [DOI: [10.1084/jem.173.5.1227](https://doi.org/10.1084/jem.173.5.1227)]
 15. Yoshimura T, Yuhki N, Wang M, Skeel A, Leonard E. Cloning, sequencing, and expression of human macrophage stimulating protein (MSP, MST1) confirms MSP as a member of the family of kringle proteins and locates the MSP gene on chromosome 3. *J Biol Chem*. 1993;268(21):15461-8. [Link]
 16. Wang M-H, Yoshimura T, Skeel A, Leonard EJ. Proteolytic conversion of single chain precursor macrophage-stimulating protein to a biologically active heterodimer by contact enzymes of the coagulation cascade. *J Biol Chem*. 1994;269(5):3436-40. [Link]
 17. Wang M-H, Gonias SL, Skeel A, Wolf BB, Yoshimura T, Leonard EJ. Proteolytic activation of single-chain precursor macrophage-stimulating protein by nerve growth factor-gamma and epidermal growth factor-binding protein, members of the kallikrein family. *J Biol Chem*. 1994;269(19):13806-10. [Link]
 18. Wang MH, Zhou YQ, Chen YQ. Macrophage-stimulating protein and RON receptor tyrosine kinase: potential regulators of macrophage inflammatory activities. *Scand J Immunol*. 2002;56(6):545-53. [DOI: [10.1046/j.1365-3083.2002.01177.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-3083.2002.01177.x)]
 19. Yao H-P, Zhou Y-Q, Zhang R, Wang M-H. MSP-RON signalling in cancer: pathogenesis and therapeutic potential. *Nat Rev Cancer*. 2013;13(7):466-81. [DOI: [10.1038/nrc3545](https://doi.org/10.1038/nrc3545)]
 20. França TCC. Homology modeling: an important tool for drug discovery. *J Biomol Struct Dyn*. 2015;33(8):1780-93. [DOI: [10.1080/07391102.2014.971429](https://doi.org/10.1080/07391102.2014.971429)]
 21. Carafoli F, Chirgadze DY, Blundell TL, Gherardi E. Crystal structure of the β -chain of human hepatocyte growth factor-like/macrophage stimulating protein. *FEBS J*. 2005;272(22):5799-807. [DOI: [10.1111/j.1742-4658.2005.04968.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04968.x)]
 22. Pundir S, Martin MJ, O'Donovan C. UniProt protein knowledgebase. In: *Protein bioinformatics: from protein modifications and networks to proteomics*. 2017. p. 41-55. [DOI: [10.1007/978-1-4939-6783-4_2](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6783-4_2)]
 23. Waterhouse A, Bertoni M, Bienert S, Studer G, Tauriello G, Gumienny R, et al. SWISS-MODEL: homology modelling of protein structures and complexes. *Nucleic Acids Res*. 2018;46(W1):W296-W303. [DOI: [10.1093/nar/gky427](https://doi.org/10.1093/nar/gky427)]
 24. Yang J, Zhang Y. I-TASSER server: new development for protein structure and function predictions. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(W1):W174-W81. [DOI: [10.1093/nar/gkv342](https://doi.org/10.1093/nar/gkv342)]
 25. Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, et al. Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature*. 2021;596(7873):583-9. [DOI: [10.1038/s41586-021-03819-2](https://doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2)]
 26. Eisenberg D, Lüthy R, Bowie JU. [20] VERIFY3D: assessment of protein models with three-dimensional profiles. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 277. Elsevier; 1997. p. 396-404. [Link]
 27. Laskowski R, MacArthur M, Thornton J. PROCHECK: validation of protein-structure coordinates. 2006. [Link]
 28. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci*. 1993;2(9):1511-9. [DOI: [10.1002/pro.5560020916](https://doi.org/10.1002/pro.5560020916)]
 29. Takeda-Shitaka M, Takaya D, Chiba C, Tanaka H, Umeyama H. Protein structure prediction in structure-based drug design. *Curr Med Chem*. 2004;11(5):551-8. [DOI: [10.2174/0929867043455837](https://doi.org/10.2174/0929867043455837)]
 30. Bull SC, Doig AJ. Properties of protein drug target classes. *PLoS One*. 2015;10(3):e0117955. [DOI: [10.1371/journal.pone.0117955](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117955)]
 31. Muhammed MT, Aki-Yalcin E. Homology modeling in drug discovery: overview, current applications, and future perspectives. *Chem Biol Drug Des*. 2019;93(1):12-20. [DOI: [10.1111/cbdd.13388](https://doi.org/10.1111/cbdd.13388)]
 32. Donate LE, Gherardi E, Srinivasan N, Sowdhamini R, Aparicio S, Blundell TL. Molecular evolution and domain structure of plasminogen-related growth factors (HGF/SF and HGF1/MSP). *Protein Sci*. 1994;3(12):2378-94. [DOI: [10.1002/pro.5560031222](https://doi.org/10.1002/pro.5560031222)]
 33. Stamos J, Lazarus RA, Yao X, Kirchhofer D, Wiesmann C. Crystal structure of the HGF β -chain in complex with the Sema domain of the Met receptor. *EMBO J*. 2004;23(12):2325-35. [DOI: [10.1038/sj.emboj.7600243](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600243)]
 34. Uchikawa E, Chen Z, Xiao G-Y, Zhang X, Bai X-C. Structural basis of the activation of c-MET receptor. *Nat Commun*. 2021;12(1):4074. [DOI: [10.1038/s41467-021-24367-3](https://doi.org/10.1038/s41467-021-24367-3)]
 35. Law RH, Caradoc-Davies T, Cowieson N, Horvath AJ, Quek AJ, Encarnacao JA, et al. The X-ray crystal structure of full-length human plasminogen. *Cell Rep*. 2012;1(3):185-90. [DOI: [10.1016/j.celrep.2012.02.012](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2012.02.012)]
 36. Chao KL, Gorlatova NV, Eisenstein E, Herzberg O. Structural basis for the binding specificity of human Recepteur d'Origine Nantais (RON) receptor tyrosine kinase to macrophage-stimulating protein. *J Biol Chem*. 2014;289(43):29948-60. [DOI: [10.1074/jbc.m114.594341](https://doi.org/10.1074/jbc.m114.594341)]