Affinity maturation of Herceptin via rational design of a point mutation: a molecular dynamic simulation study

M. Jamalan*

Shoushtar Branch, Islamic Azad University, Shuoshtar, Iran

ABSTRACT

Overexpression and malfunction of human epidermal receptors (HERs) is associated with occurrence of malignancy in various tissues. Among EGFRs, HER2 as an orphan receptor could dimerize and activate without presence of any kind of ligands. Overexpression of HER2 has significant role in incidence of breast cancer. Herceptin, an approved therapeutic monoclonal antibody, targets extracellular domain of HER2 which result to inhibition of dimerization and consequently blocking induction of intracellular signaling cascades. Efficiency of point mutation, which is offered based on rational design approach for affinity maturation of Herceptin, was investigated by 10 ns of molecular dynamic simulation. According to our results, Herceptin with mutated light chain make a more stable complex with HER2 compared to wild type. Asp92 in mutated VL of Herceptin constructs a stable salt bridge with Lys569 on HER2 which decreases the electrostatic energy between VL of Herceptin and HER2 thereby affects RMSD values of IV-HER2 during 10 ns of MD simulation. Herceptin (VL; Tyr92Asp)-HER2 complex showed lower level of total energy during allover of MD simulation in comparison with Herceptin-HER2 complex. Our molecular modeling investigation demonstrated that affinity maturation of Herceptin through rational design could be improved via mutation of Tyr92 to Asp in VL chain of antibody. Affinity improvement of Herceptin for HER2 could lead to increase efficiency and reduction in dose or frequency of administrations.

Keywords: EGFRs, HER2, Herceptin, Rational design of point mutation, Molecular dynamic simulation.

مجله علمي پژوهشي زيست شناسي جانوري تجربي
سال اول، شماره دوم، پائيز ۱۳۹۱ (۲۴- ۱۲)

طراحی جهش نقطه‌ای به منظور افزایش تمایل آنتی‌بادی درمانی هرسپتین به HER2 با استفاده از روش‌های مدل‌سازی دینامیک مولکولی

مصطفی جمالان*، ابراهیم برزگری اسد آبادی[۱]

[۱]دانشگاه آزاد اسلامی، واحد شوشتر، شوشتر، ایران

چکیده

بیان غیرمعمول و عملکرد نامتعارف گیرنده‌ی فاکتورهای رشد اپیدرمی (EGFRs) می تواند عامل ایجاد کننده بدخیمی در بافت های مختلف باشد. از میان تمامی اعضای خانواده EGFRs، HER2 گیرنده‌ای می-باشد که در عدم حضور لیگاند نیز می تواند دیمر شده و فعال گردد. HER2 دارای نقش مهمی در ایجاد سرطان پستان است. داروی هرسپتین یک آنتی بادی مونوکلونال می‌باشد که دمین خارجی HER2 را هدف قرار داده و مانع از ایجاد دیمرهای فعال و القای آبشار پیام رسانی درون سلولی می‌گردد. در این پژوهش جهش‌های نقطه‌ای به منظور افزایش تمایل هرسپتین به HER2 با استفاده از روش‌های مدل‌سازی منطقی طراحی شده و در نهایت میزان کارایی موثرترین جهش نقطه‌ای با استفاده از روش مدل‌سازی دینامیک مولکولی مورد بررسی قرار گرفت. براساس نتایج به دست آمده هرسپتین دارای جهش Tyr92Asp در زنجیره سبک، کمپلکس پایدارتری را نسبت به شکل وحشی با HER2 ایجاد کرده و Asp92 می تواند یک پل نمکی پایدار با Lys596 از HER2 ایجاد کند که باعث کاهش انرژی الکتروستاتیک بین آنتی‌بادی هرسپتین با HER2 گردد. با توجه به مطالعات انجام شده به نظر می‌رسد که هرسپتین به عنوان یک آنتی بادی مونوکلونال دارای پتانسیل لازم به منظور افزایش تمایل به HER2 می باشد.

واژگان کلیدی: گیرنده فاکتور رشد اپیدرمی، HER2، هرسپتین، طراحی هوشمند جهش نقطه‌ای، مدل سازی دینامیک مولکولی.

---

[۱]*نویسنده مسئول: مصطفی جمالان

Email:mjamalan@ibb.ut.ac.ir

مقدمه

گیرنده‌های فاکتور رشد به همراه قسمت درون سلولی خود که دارای نقش کینازی می‌باشد دارای نقش بسیار مهمی در رشد سلول‌ها، زنده ماندن، میزان چسبندگی، مهاجرت و تمایز سلول ها می‌باشند (Yarden 2001). خانواده گیرنده های فاکتور رشد اپیدرمی (EGFRs) که در انسان HER خوانده می شوند از چهار گیرنده تراغشایی تشکیل شده است (Yarden 2001). خانواده EGFRs دارای سه قسمت با عملکرد متفاوت می‌باشد که عبارتند از دمین خارجی متصل شونده به لیگاند، دمین هیدروفوبیک تراغشایی و یک دمین سیتوپلاسمی با قابلیت تیروزین کینازی (Yarden 2001).

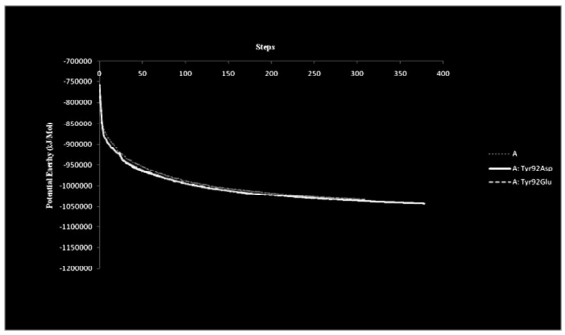
اتصال لیگاند به EGFR باعث القا و کنار هم قرار گرفتن گیرنده‌ها و در نهایت باعث شکل‌گیری ساختارهای همو و یا هترودیمری گیرنده‌ها می‌گردد (Yarden and Sliwkowski 2001; Wiley 2003). شکل‌گیری ساختارهای دیمری به فعال شدن خصوصیت تیروزین کینازی گیرنده‌ها و فسفریله شدن ساختارهای درون سلولی گیرنده‌ها می انجامد که فعال سازی مسیر-های پیام رسانی درون سلولی به دنبال دارد (Qu 2002). HER2 (که ERBB2 نیز خوانده می شود) دارای هیچگونه لیگاند اختصاصی نمی‌باشد و هیچکدام از لیگاندهای اختصاصی خانواده HER قابلیت اتصال به آن را ندارند. به همین دلیل HER2 تنها می‌تواند در حضور فعال دیگر خانواده‌های EGFR (مانند HER3) دارای فعالیت قابل توجه باشد (Stern and Kamps 1988) بنابراین در حضور لیگاندهای متفاوت شکل‌گیری هترودیمرهای HER2 بسیار محتمل‌تر از دیگر هترومرها و یا هومرها می‌باشد (Tzahar, Waterman et al. 1996). HER2 همواره به همراه دیگر اعضای خانواده EGFR بیان می‌گردد از این رو به عنوان یک عامل اصلی در انتقال پیام توسط خانواده EGFR شناخته می‌شود (Klapper, Glathe et al. 1999). تا به امروز از انواع مختلف آنتی‌بادی‌های مونوکلونال و همچنین ساختارهای شیمیایی مهار کننده‌ی فعالیت تیروزین کینازی (TKIs) جهت کنترل فعالیت EGFRs در سلول‌های سرطانی استفاده شده است. آنتی-بادی‌های مونوکلونال از طریق اتصال به قسمت خارج سلولی EGFRs و تحریک ایجاد واکنش‌های ایمونولوژیک مانند فعال ساختن سیستم کمپلمان و یا واکنش های ADCC و القای بازجذب کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن از طریق غشا، باعث مهار عملکرد این گیرنده می‌گردند (Harari 2004). هرسپتین، آنتی بادی مونوکلونالی می باشد

که به شکل اختصاصی دمین IV از قسمت خارج سلولی HER2 را هدف قرار داده و بدین ترتیب مانع دیمر شدن و انتقال سیگنال به درون سلول و در نهایت مانع از رشد و تکثیر سلول می گردد (Shepard, Jin et al. 2008). افزایش تمایل آنتی‌بادی‌های درمانی نسبت به آنتی‌ژن مورد نظر نه‌تنها می‌تواند باعث کاهش دز مصرفی و به دنبال آن کاهش اثرات جانبی گردد بلکه در عین حال می تواند باعث کاهش دفعات تیمار و کاهش چشمگیر هزینه گردد (Carter 2006). استفاده از جهش های نقطه‌ایی طراحی شده از طریق روش‌های مدل‌سازی به منظور افزایش تمایل آنتی‌بادی به آنتی‌ژن روشی موثر (Lippow, Wittrup et al. 2007) و در عین حال بسیار ساده تر در قیاس با روش هایی مانند تولید کتابخانه های ژنی می باشد (Carter 2006).

روش‌ها

شبیه سازی دینامیک مولکولی کمپلکس - HER2 هرسپتین

در اولین مرحله، فایل 1N8Z.pdb که حاوی ساختار بلوری کمپلکس -HER2 هرسپتین می‌باشد از بانک اطلاعات پروتئین تهیه گردید (Rose, Bi et al. 2013). به منظور صرفه جویی در زمان انجام فرآیند شبیه سازی، تنها دمین‌های Fv از آنتی‌بادی هرسپتین و دمین IV از HER2 (IV-HER2) موجود در ساختار بلوری انتخاب شده و با استفاده از نرم‌افزار Gromacs شبیه‌سازی انجام شد. پس از اضافه نمودن اتم‌های هیدروژن و بهینه سازی اولیه، کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن در درون یک قفس آبی مکعبی شکل (مدل SPC) قرار گرفت. به منظور خنثی‌سازی میزان بار پروتئین به تعداد مورد نیاز از یون‌های Na^+ و CL^- استفاده گردید و به این ترتیب میزان بار سیستم به صفر رسانده شد. پس از خنثی شدن کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن ساختار پروتئینی با استفاده از الگوریتم Steepest descent (SD) بهینه‌سازی گردید. پس از انجام فرآیند بهینه سازی دمای ساختار کمپلکس HER2-هرسپتین به ۳۰۰ درجه کلوین رسانده شد و در طی ۱۰۰ پیکوثانیه از فرآیندشبیه سازی دینامیک مولکولی و با استفاده از NVT ensemble متعادل شده و پس از آن در طی آخرین مرحله آماده‌سازی، ساختار پروتئینی در طی ۲۰۰ پیکوثانیه با استفاده از روش NPT ensemble به تعادل رسانده شد. در نهایت ساختار به تعادل رسیده در طی ۱۰ نانوثانیه و با استفاده از GROMOS96 43a1 force field شبیه سازی گردید. به منظور شبیه‌سازی ساختار های جهش یافته نیز از روش ذکر شده برای ساختار فوق استفاده شد. تمامی مراحل شبیه‌سازی و آنالیزهای انجام شده با استفاده



از نرم افزار Gromacs 4.5.4 انجام شد (Van Der Spoel, Lindahl et al. 2005) و تصاویر ارائه شده از ساختار بلوری با استفاده از نرم افزار VMD 1.8.7 تهیه گردید.

نتایج

جستجوی موقعیت مناسب برای ایجاد جهش نقطه‌ای

زنجیره سبک با داشتن برهم کنش‌های اندک با دمین IV از HER2 (IV-ERBB) می تواند دارای پتانسیل بالایی به منظور ایجاد جهش‌های هوشمند و در نتیجه افزایش تعداد برهمکنش‌ها با IV-HER2 باشد. اگر چه پیوندهای هیدروژنی دارای نقش بسیار مهمی در اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن هستند اما پل‌های نمکی می‌توانند دارای نقش موثرتری در اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن باشند (Sinha, Li et al. 2007). از میان آمینواسیدهای متداول در ساختارهای پروتئینی، آمینواسیدهای دارای گروه‌های جانبی با خاصیت بازی (مانند لیزین، آرژنین) و آمینواسیدهای دارای گروه‌های جانبی با خاصیت اسیدی (مانند گلوتامیک اسید و آسپارتیک اسید) می توانند پل های یونی پایداری را ایجاد کنند. از میان موقعیت‌های موجود برای ایجاد جهش به نظر می رسد که با جایگزینی یک آمینواسید با زنجیره اسیدی (گلوتامیک اسید و یا آسپارتیک اسید) بتوان یک پل یونی پایدار را با آمینو اسید Lys569 از IV-HER2 ایجاد نمود.

با توجه به نکات ذکر شده، به منظور افزایش

تصویر ۱. میزان انرژی پتانسیل کمپلکس HER2-هرسپتین و اشکال جهش یافته (Tyr92Asp و Tyr92Glu) هرسپتین در طی فرآیند بهینه سازی.

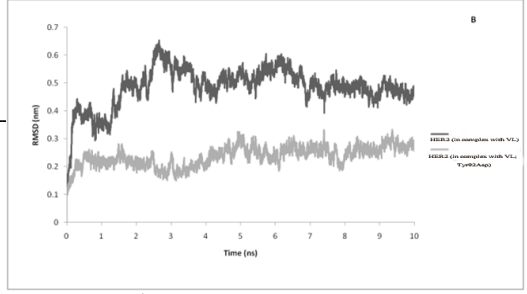
تمایل آنتی بادی هرسپتین از طریق ایجاد پل‌های نمکی، جهش‌های Tyr92Asp (تصویر شماره ۳) و Tyr92Glu در زنجیره سبک آنتی بادی هرسپتین مدل‌سازی شدند و برهمکنش‌های اشکال جهش یافته (پیوندهای هیدروژنی و پل‌های نمکی) با HER2 پس از بهینه سازی ساختارهای تولید شده محاسبه گردید. همانگونه که در تصویر شماره ۱ نشان داده شده است ساختارهای جهش یافته نه تنها باعث ناپایداری کمپلکس HER2-هرسپتین نمی‌گردند، بلکه ساختارهایی پایدارتر را ایجاد می‌کنند. با توجه به تعداد محاسبه شده پیوندهای

هیدروژنی، پل‌های یونی و میزان پایداری کمپلکس‌های مختلف آنتی‌بادی-آنتی‌ژن (جدول شماره ۱) به نظر می رسد که شکل جهش یافته آنتی بادی (VL; Tyr92Asp) هرسپتین پایدارترین کمپلکس را با HER2 ایجاد می کند و بنابراین می‌تواند دارای بالاترین تمایل به منظور اتصال به HER2 باشد. بررسی RMSD کمپلکسHER2-هرسپتینRMSD مربوط به HER2 در حضور زنجیره سبک آنتی بادی هرسپتین و شکل جهش‌یافته آن (VL; Tyr92Asp) به حالت کمپلکسHER2-هرسپتین در طول ۱۰ نانوثانیه از فرآیند شبیه سازی در تصویر شماره ۲ نشان داده شده است. همانگونه که در تصویر شماره ۲A نشان داده است RMSD مربوط به زنجیره سبک هرسپتین و شکل جهش یافته آن (VL: Tyr92Asp) در طول فرآیند شبیه سازی مشابه می‌باشد و به نظر می‌رسد که ایجاد جهش باعث ایجاد تغییرات عمده ای در ساختار زنجیره سبک آنتی‌بادی نمی‌گردد در حالی که ساختار جهش یافته هرسپتین می تواند اثرات گسترده ای را بر روی ساختار HER2 القا کند. همانگونه که در قسمت B تصویر ۲ نشان داده شده است RMSD متفاوت HER2 در حضور شکل جهش یافته هرسپتین (VL; Tyr92Asp) نشان می‌دهد که ایجاد جهش نقطه ای Tyr92Asp می‌تواند باعث ایجاد تغییرات گسترده ای در ساختار HER2 در طول فرآیند شبیه سازی در مقایسه با ساختار HER2 در حضور آنتی بادی وحشی گردد.

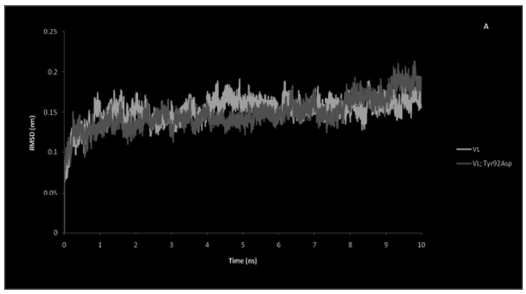
بحث

آنتی‌بادی‌ها غالبا با استفاده از آمینواسیدهای موجود در نواحی CDRs خود و از طریق پیوندهای هیدروژنی، ایجاد برهم‌کنش‌های الکتروستاتیک و نیروهای هیدروفوب به اپی‌توپ‌های خود که بر روی سطح آنتی‌ژن قرار دارند متصل می گردند (Davies and Cohen 1996). هرسپتین به دمین IV در ناحیه ای در نزدیکی C ترمینال HER2 متصل می‌گردد. آمینو اسیدهای HER2 در نواحی (a) ۵۵۱-۵۶۱، (b)۵۷۰-۵۷۳ و (c) ۵۹۳-۶۰۲ دارای نقش بسیار مهمی در اتصال HER2 به هرسپتین می‌باشند. از میان نواحی مورد اشاره نواحی a و c با استفاده از برهمکنش‌های

الکتروستاتیک و ناحیه b توسط نیروهای هیدروفوب با هرسپتین واکنش می دهند (Cho, Mason et al. 2003). میزان کارایی افزایش تمایل آنتی بادی به آنتی ژن مربوطه با استفاده از روش های محاسباتی پیش از



تصویر ۲. RMSD مربوط به اسکلت زنجیره سبک آنتی‌بادی (VL) هرسپتین و شکل جهش‌یافته Tyr92Asp آن در طول ۱۰ نانوثانیه از فرآیند شبیه سازی دینامیک مولکولی (A). RMSD مربوط به اسکلت HER2 در حضور زنجیره سبک از هرسپتین و و شکل جهش یافته زنجیره

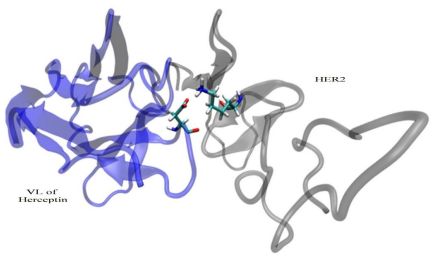


سبک (Tyr92Asp) B)

این توسط لیپو و همکاران به اثبات رسیده است (Lippow, Wittrup et al. 2007). لیپو و همکاران به منظور طراحی جهش های هوشمند از روشی تعریف شده استفاده نمودند که مهمترین اصول گزارش شده عبارت بودند از: (۱) جهش‌ها تنها در مناطق CDRs و یا مناطق مجاور بر روی ساختارهای پروتئینی ایجاد شدند. (۲) به منظور بررسی ساختار جهش‌یافته و بررسی برهم‌کنش های آنتی‌بادی-آنتی‌ژن تنها از فرآیندهای بهینه‌سازی و روش بررسی ساختار استفاده گردید. (۳) جهش‌ها نباید باعث ناپایدار شدن ساختار پروتئینی (بیش از kCal ۳ در مقایسه با ساختار بلوری) گردند. (۴) معمولا تنها اثرات جهش‌های نقطه ای می‌تواند با استفاده از این روش به خوبی بررسی گردد و با افزایش تعداد جهش‌ها به دو، سه و یا بیشتر شانس بررسی دقیق آن‌ها با استفاده از این روش به شدت پایین می آید. (۵) مهمترین نیروی تاثیرگذار بر اتصال یک آنتی‌بادی به آنتی ژن اختصاصی آن نیروهای الکتروستاتیک می-باشند و استفاده از چنین نیروهایی به منظور بررسی توانایی اتصال آنتی‌بادی به آنتی‌ژن باعث کاهش میزان خطا و افزایش صحت تخمین تا ۶۰ درصد می‌گردد و در نهایت (۶) به منظور طراحی جهش‌های نقطه‌ای و همچنین بررسی برهم‌کنش‌های ایجاد شده بین آنتی‌ژن و آنتی‌بادی جهش یافته با استفاده از روش های محاسباتی تنها حضور Fv از آنتی بادی کفایت می‌کند (Lippow, Wittrup et al. 2007).

زنجیره سنگین آنتی‌بادی هرسپتین دارای نقش بسیار پررنگ‌تری در اتصال آنتی‌بادی هرسپتین به IV-HER2 نسبت به زنجیره سبک آنتی بادی می‌باشد. زنجیره سنگین آنتی‌بادی هرسپتین با استفاده از هشت پیوند مستقیم هیدروژنی و سه پیوند هیدروژنی با واسطه‌ی مولکول‌های آب به عنوان پل و چهار پل یونی به IV-HER2 متصل می گردد در حالی که زنجیره سبک آنتی بادی هرسپتین تنها با استفاده از چهار پیوند هیدروژنی مستقیم و یک پیوند هیدروژنی با

واسطه‌ی یک مولکول آب به عنوان پل به IV-HER2 متصل می گردد. محاسبات مدل سازی نشان دهنده آن است که ایجاد جهش نقطه ای (Tyr92Asp) اگر چه باعث کاهش تعداد پیوند های هیدروژنی مابین آنتی‌بادی هرسپتین و IV-HER2 می گردد (از ۲۰ پیوند هیدروژنی به ۱۹ پیوند) اما ایجاد پل یونی بین Asp92 با Lys569 از HER2 می تواند در عین حال باعث افزایش تعداد پل های یونی (از ۵ به ۸) گشته و در حالی که میزان انرژی الکتروستاتیک برای برهم کنش زنجیره سنگین آنتی‌بادی با IV-HER2 ثابت می ماند (جدول شماره ۱). انرژی الکتروستاتیک برای برهم کنش زنجیره سبک آنتی‌بادی با IV-HER2 از ۱۶۶/۳۱- به ۱۷۴/۹۴۳- در شکل جهش یافته (VL; Tyr92Asp) کاهش می یابد. بنابر موارد یاد شده به نظر می رسد که ایجاد جهش نقطه‌ای Tyr92Asp در زنجیره سبک هرسپتین می-تواند در نهایت منجر به افزایش تمایل آنتی بادی به IV-HER2 شود. از سوی دیگر ایجاد جهش Tyr92Glu در زنجیره سبک آنتی‌بادی هرسپتین اگر چه به افزایش تعداد پل های یونی می انجامد اما زنجیره طویل زیرواحد گلوتامات جایگزین شده باعث از میان رفتن تعداد زیادی از پیوند های هیدروژنی می‌گردد که در مجموع باعث ناپایدار شدن (افزایش انرژی الکتروستاتیک بین زیرواحد سبک آنتی بادی به IV-HER2) کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن می شود. اگر چه ایجاد جهش Tyr92Glu در زنجیره سبک آنتی‌بادی هرسپتین به افزایش تعداد پل های یونی می انجامد، اما زنجیره طویل باقی‌مانده‌ی گلوتامات جایگزین شده، باعث از میان رفتن تعداد زیادی از پیوند-های هیدروژنی می‌گردد که در نهایت باعث ناپایدار شدن (افزایش انرژی الکتروستاتیک بین زیرواحد سبک آنتی بادی به IV-HER2) کمپلکس آنتی‌بادی-آنتی‌ژن می شود. همانگونه که در جدول شماره ۱ نیز نشان داده شده است آنتی بادی جهش یافته VL; Tyr92Asp پایدارترین ساختار کمپلکس را با HER2 ایجاد می کند.



تصویر ۳. موقعیت فضایی Asp92 در زنجیره جهش یافته سبک آنتی‌بادی هرسپتین نسبت به Lys569 در HER2.

کمپلکس تشکیل شده توسط آنتی‌بادی جهش-یافته دارای ساختار پایدارتر می‌باشد. میانگین مجموع انرژی (Total energy) برای کمپلکس هرسپتینVL; Tyr92Asp و

	زنجیره پروتئینی	تعداد پیوند هیدروژنی با IV-HER2	تعداد پل یونی با IV-HER2	انرژی الکتروستاتیک مابین زنجیره پروتئنی با IV-HER2 (Kcal/mol)

HER2 kJ/Mol ۷٤۲٦۰٦- می باشد در حالی که این عدد برای کمپلکس HER2-هرسپتین kJ/Mol ۷۳۹۸٦۱- می‌باشد. به نظر می رسد که از طریق ایجاد جهش نقطه‌ای و بوجود آوردن یک پل یونی پایدار بین زنجیره سبک هرسپتین با HER2 می‌تواند تمایل آن را برای HER2 افزایش داد. کاهش Kd آنتی-بادی هرسپتین برای HER2 می‌تواند منجر به کاهش دز مصرفی آن، تعداد دفعات تیمار و همچنین کاهش قابل ملاحظه هزینه های درمانی گردد. مطالعات پیشین(Lippow, Wittrup et al. 2007) نشان داده‌اند که افزایش تمایل آنتی‌بادی به آنتی ژن از طریق کاهش انرژی الکتروستاتیک می تواند منجر به کاهش Kd آنتی بادی گردد. هرسپتین با Kd پایین می تواند به عنوان ابزاری مناسب در انتقال اختصاصی دارو به سلول های هدف مورد استفاده قرار بگیرد.

جدول ۱. نتایج حاصل از مدل سازی آنتی‌بادی هرسپتین و طراحی منطقی جهش های نقطه ای به منظور افزایش تمایل آنتی بادی. هرسپتین به IV-HER2

سپاسگزاری

نتایج ارائه شده در این مقاله حاصل از طرح پژوهشی با عنوان "*طراحی و مطالعه مکانیسم* اثرگذاری پپتیدو میمتیک‌های دارویی به منظور مهار عملکرد پروتئین ErbB2 انسانی موثر در ایجاد سرطان سینه" می باشد که توسط دانشگاه آزاد اسلامی واحد شوشتر مورد پشتیبانی قرار گرفته است.

آنتی بادی هرسپتین	زنجیره سبک	۱۱	-	-۱۶۶/۳۱
	زنجیره سنگین	۹	۵	-۲۰۰/۵۱
آنتی بادی هرسپتین (Tyr92Glu)	زنجیره سبک	۷	۲	-۱۲۰/۲۳۸
	زنجیره سنگین	۹	۶	-۱۹۶/۶۴۴
آنتی بادی هرسپتین (Tyr92Asp)	زنجیره سبک	۹	۲	-۱۷۴/۹۴۳
	زنجیره سنگین	۱۰	۶	-۱۹۷/۴۵۳

REFERENCES:

Carter, P. J. (2006). "Potent antibody therapeutics by design." Nat Rev Immunol **6**(5): 343-357.

Cho, H. S., K. Mason, et al. (2003). "Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab." Nature **421**(6924): 756-760.

Davies, D. R. and G. H. Cohen (1996). "Interactions of protein antigens with antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(1): 7-12.

Harari, P. M. (2004). "Epidermal growth factor receptor inhibition strategies in oncology." Endocr Relat Cancer **11**(4): 689-708.

Klapper, L. N., S. Glathe, et al. (1999). "The ErbB-2/HER2 oncoprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(9): 4995-5000.

Lippow, S. M., K. D. Wittrup, et al. (2007). "Computational design of antibody-affinity improvement beyond in vivo maturation." Nat Biotechnol **25**(10): 1171-1176.

Qu, C. K. (2002). "Role of the SHP-2 tyrosine phosphatase in cytokine-induced signaling and cellular response." Biochim Biophys Acta **1592**(3): 297-301.

Rose, P. W., C. Bi, et al. (2013). "The RCSB Protein Data Bank: new resources for research and education." Nucleic Acids Res **41**(Database issue): D475-482.

Shepard, H. M., P. Jin, et al. (2008). "Herceptin." Handb Exp Pharmacol(181): 183-219.

Sinha, N., Y. Li, et al. (2007). "Understanding antibody-antigen associations by molecular dynamics simulations: detection of important intra- and inter-molecular salt bridges." Cell Biochem Biophys **47**(3): 361-375.

Stern, D. F. and M. P. Kamps (1988). "EGF-stimulated tyrosine phosphorylation of p185neu: a potential model for receptor interactions." EMBO J **7**(4): 995-1001.

Tzahar, E., H. Waterman, et al. (1996). "A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor." Mol Cell Biol **16**(10): 5276-5287.

Van Der Spoel, D., E. Lindahl, et al. (2005). "GROMACS: fast, flexible, and free." J Comput Chem **26**(16): 1701-1718.

Wiley, H. S. (2003). "Trafficking of the ErbB receptors and its influence on signaling." Exp Cell Res **284**(1): 78-88.

Yarden, Y. (2001). "Biology of HER2 and its importance in breast cancer." Oncology **61 Suppl 2**: 1-13.

Yarden, Y. (2001). "The EGFR family and its ligands in human cancer. signalling mechanisms and therapeutic opportunities." Eur J Cancer **37 Suppl 4**: S3-8.

Yarden, Y. and M. X. Sliwkowski (2001). "Untangling the ErbB signalling network." Nat Rev Mol Cell Biol **2**(2): 127-137.