مقاله پژوهشی

فصلنامهٔ بیماری‌های پستان ایران، سال نهم، شماره دوم، تابستان ۱۳۹۵

بررسی ژن HER3 به روش RT-PCR در نمونه‌های افراد مبتلا به سرطان پستان

مریم طیبی نیارکی: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران
مهسا کاوسی: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران
الهام مسلمی*: گروه زیست شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران
امیر ایزدی: باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، تهران، ایران

Archive of SID

چکیده

مقدمه: امروزه سرطان پستان شایع‌ترین سرطان در بین زنان و در عین حال مهم‌ترین بیماری‌ها در سراسر جهان می‌باشد. تحقیقات گسترده‌ای در جهت پیش‌گیری و درمان سرطان صورت می‌گیرد. *HER3* یکی از پروتئین‌های متصل به غشا می‌باشد که توسط ژن ErbB3 کدگذاری می‌شود و تنها پس از هترودایمر شدن با دیگر اعضای خانواده می‌تواند فسفریله و فعال شود. هدف از این مطالعه بررسی بیان *HER3* به عنوان یک فاکتور احتمالی دخیل در گسترس سرطان پستان می‌باشد.

روش بررسی: در این مطالعه موردی- شاهدی ۲۰ نمونه بافت پارافینه سرطان پستان و ۲۰ نمونه بافت پارافینه سالم از بیمارستان مهر در سال ۹۲ جمع‌آوری شد و بیان *HER3* به روش کیفی RT-PCR بر روی نمونه‌ها انجام گرفت. برای این منظور ابتدا استخراج RNA از بافت توسط محلول RNX و به دنبال آن cDNA ساخته شد. تست RT-PCR ویژه *HER3* بهینه و محصول PCR بر روی ژل آگارز مورد بررسی قرار گرفت.

یافته‌ها: در ۷۰٪ نمونه‌های افراد بیمار، بیان ژن *HER3* با توجه به حضور باند بر روی ژل آگارز مشاهده شد و در ۳۰٪ از نمونه‌ها باند اختصاصی مشاهده نگردید، همچنین در ۲۰٪ از نمونه‌های نرمال، محصول PCR مشاهده و در ۸۰٪ از نمونه‌ها هیچ باندی مشاهده نشد.

نتیجه‌گیری: با توجه به نتایج می‌توان بیان نمود که بیان ژن *HER3* در بافت افراد مبتلا به سرطان پستان نسبت به افراد نرمال افزایش می‌یابد. عدم بیان این ژن در نمونه‌های نرمال و بیان آن در نمونه‌های بیمار احتمال دخالت این عامل را در پیشرفت و توسعه بیماری مطرح می‌کند و به نظر می‌رسد که افزایش بیان *HER3* در ابتلا و پیشرفت بیماری نقش داشته و بررسی نقش این فاکتور در درمان ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: بیان *HER3*، RT-PCR، سرطان پستان.

* نشانی نویسنده پاسخگو: تهران، گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شرق، الهام مسلمی.
نشانی الکترونیک: elham_moslemi60@yahoo.com

www.SID.ir

مقدمه

سرطان پستان یکی از شایع‌ترین سرطان‌ها در زنان هم در کشورهای پیشرفته و هم در کشورهای درحال توسعه می‌باشد و علت اصلی مرگ ناشی از سرطان در میان زنان است (۱).

سرطان پستان در زنان ایرانی در مقایسه با زنان کشورهای غربی، حداقل یک دهه زودتر و در مراحل پیشرفته‌تر، بروز می‌کند (۲)، میانگین سن تشخیص سرطان پستان در کشورهای غربی ۵۶ سال و در ایران ۴۵ سال است. غالبا سه گروه ژنی در سرطان‌ها دچار جهش می‌شوند یکی از آنها انکوژن‌ها هستند. محصول این نوع ژن‌ها در ترنسفورماسیون سلول‌ها و یا القای سرطان دخالت دارد (۳). انکوژن‌ها از ژن‌های طبیعی موجود در سلول به نامپروتوانکوژن‌ها بوجود می‌آیند. انکوژن‌ها با مکانیسم‌های متفاوت در کنترل و رشد سلولی دخالت دارند که بر اساس همین عملکرد به دسته‌های زیر تقسیم‌بندی شده‌اند. انکوژن‌ها می‌توانند کد کننده فاکتورهای رشد اپیدرمی/ گیرنده‌های فاکتور رشد اپیدرمی در سطح سلول/ کینازهای بدون رسپتور/ تولید کننده پیام برای نسخه‌برداری DNA/ پروتئین‌های هسته‌ای تولید کننده پیام باشند. فعالیت انکوژن‌ها باعث عوض شدن ساختمان یا تقسیم سلولی شده که آن را به حالت‌های مختلف پاتولوژی در آورده و مساعد تومورزایی می‌نماید (۴). یکی از مهم‌ترین ناهنجاری‌های کروموزومی که منجر به سرطان از جمله سرطان پستان می‌گردد، تزاید انکوژن‌ها می‌باشد (۵). تزاید ژنی یعنی افزایش تعداد کپی یک ناحیه محدودی از کروموزوم که منجر به ایجاد بیش از ۲ کپی از ژن‌های موجود در آن ناحیه می‌گردد. این منجر به افزایش بیان (بیان بیش از حد طبیعی) ژن‌های حیاتی درگیر در شروع و پیشرفت سرطان، می‌گردد. HER-3 فاکتور رشد اپیدرمی، یکی از آنکوژن‌های تزاید یافته در سرطان پستان است (۳).

HER3 بیان این گیرنده در تعدادی از بدخیمی‌ها مانند سرطان معده و پستان افزایش پیدا می‌کند، بیان ErbB3 فقط به سلول‌های با غشا اپی تلیال یا فرواکتودرمال محدود می‌گردد مانند سلول‌های بافت پوششی یا سلول‌هایی با غشا نورواکتودرمی (۶).

ژن ErbB3 انسان بر روی بازوی بلند کروموزوم ۱۲(12q13) واقع شده است و توسط ۲۳۶۵۱ جفت باز کدگذاری شده است و به ۱۳۴۲ اسید آمینه ترجمه می‌شود، در انسان ErbB3 در پوست، استخوان، سیستم عصبی، قلب، ریه، اپیتلیوم روده‌ای بیان شده است (۷).

عملکرد ErbB3 باعث اتصال لیگاندهای heregulin و NRG-2 به یکدیگر می‌شود و با ایجاد تغییر در ساختار لیگاند اتصال اجازه دایمریزیشن و فسفوریلاسیون و فعال‌سازی را می‌دهد. ErbB3 می‌تواند با دیگر اعضای خانواده ErbB هترودایمر تشکیل دهد زیرا این پروتئین کیناز نیاز به فسفریله شدن توسط پروتئین دیگر را دارد و برخلاف دیگر اعضای خانواده خود قادر به فسفریله کردن پروتئین دیگری نیست (۳).

افزایش بیان HER2 ممکن است تشکیل هترودایمر فعال با ErbB3 و سایر اعضای خانواده ErbB بدون نیاز به لیگاند اتصال را می‌دهد (۸، ۹).

با توجه به اهمیت تشخیص سرطان پستان در مراحل ابتدایی به منظور بهبود درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری تشخیص در مراحل اولیه سرطان امری ضروری به نظر می‌رسد. بعلاوه علی‌رغم بهبود روش‌های درمانی تاکنون درمان قطعی برای سرطان مطرح نشده و مطالعه در ارتباط با عوامل کمک کننده درمان ضروری به حساب می‌آیند. هدف از این مطالعه بررسی بیان *HER3* به عنوان فاکتور احتمالی دخیل در توسعه سرطان پستان می‌باشد که در مقایسه تاکنون کمتر به آن پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه موردی شاهدی تعداد ۲۰ نمونه بلوک پارفینه از افراد مبتلا به سرطان پستان پس از بررسی متغییرهای مورد نظر جهت ورود به مطالعه شامل: قرار داشتن بیماری در مرحله ۱، ۲، ۳ اندازه تومور زیر ۵ سانتی‌متر، غدد لنفاوی، ER مثبت انتخاب شده و همچنین ۲۰ نمونه نرمال (ماموپلازی) پس از بررسی لام‌های مربوطه توسط متخصصین پاتولوژی از آزمایشگاه بیمارستان مهر جمع‌آوری گردید، میانگین سنی نمونه‌ها بین ۲۴-۷۹ ساله و نمونه‌ها مربوط به سال ۹۲ بودند. هریک از ۴۰ نمونه مورد مطالعه از نظر جنس (۱۰زن، ۱۰مرد)، سن (۳۲-۶۱)، stage (0)، Grade(0) بررسی شدند.

Archive of SID
www.SID.ir

برای استخراج RNA از بافت باتوجه به پروتکل انجام شد (۱۰)، RNA ها از بافت جدا شد در پایان مقدار RNA با روش دانسیته نوری (OD) و میزان جذب در طول موج تعیین شده توسط دستگاه اسپکتروفومتری اندازه‌گیری شد. محلول نهایی تخلیص شده باید دارای (OD) ۱/۷ تا ۱/۹ داشته باشد. پس از استخراج RNA از نمونه‌ها و بررسی جدب نوری جهت تایید کیفیت RNA های بدست آمده صورت گرفت. سپس سنتز cDNA مطابق پروتکل بهینه شده انجام گرفت در این پروتکل به‌مقدار 1µl از هریک از ترکیبات dNTP(10mM)، Oligo dT(100µg/µl)، Random Hexamer(40µg/µl) و همچنین 10µl از Template RNA در میکروتیوب ریخته و سپس لوله را به مدت ۵ دقیقه در ۶۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده و سپس بلافاصله در یخ گذاشته شد و همچنین 4.5µl از DDW، 2µl از MMULV 10X buffer و 0.5µl، از MMULV(200U/µl) درون میکروتیوب ریخته شد. با مخلوط دو میکروتیوب ، حجم نهایی واکنش (در نهایت ۲۰ مایکرولیتر) بدست آمد. توالی ژن*HER3* از سایت NCBI بدست آمد و توسط برنامه Primer Express پرایمرهای اختصاصی طراحی گردید. پس از طراحی توالی پرایمرها توسط NCBI و Gene Runner نیز Blast گردیدند تا دقت و اختصاصی بودن آنها بطور کامل مورد بررسی قرار گیرد. توالی پرایمرها در جدول ۱ نمایش داده شده است.

فاکتورهای مورد نیاز RT-PCR در این مطالعه مقدار 2.5 µl، (سیناکلون، ایران) 10x PCR Buffer، 1 µl، (سیناکلون، ایران) Primer Forward (10 µM)، 1 µl، Primer Revers (10 µM)، 0.75µl، MgCl2 (50 mM) (سیناکلون، ایران)، 0.5 µl، dNTP Mix(10 mM) (سیناکلون، ایران)، 0.4(2 unit) µl،Taq DNA Polymerase (5 U/µl) (سیناکلون، ایران)، 2 µl، cDNA Template، 17µl، D.D.W بود که در نهایت مجموع ترکیبات 25 µl بدست آمد. برنامه دمایی واکنش بصورت دناتوراسیون در دمای ۹۳ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه، سپس در دمای ۵۸ درجه سانتی‌گراد به مدت۴۰ ثانیه چسبیدن صورت گرفت؛ در نهایت سومین مرحله طویل شدن در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد به‌مدت ۳۰ ثانیه به تعداد ۴۰ سیکل، انجام شد. آزمون PCR با استفاده از رده سلول‌های سرطانی دارای بیان ژن *HER3* و کنترل مثبت و منفی در کنار سایز مارکر بهینه گردید. پس از الکتروفورز محصول PCR، باند اختصاصی حاصل از پرایمرها دارای ۲۹۹ جفت باز طول داشت. با اطمینان یافتن از بهینه شدن آزمون PCR و بدست آمدن باند اختصاصی نمونه، آزمون PCR بهینه شده را برای ۲۰ نمونه بیمار و ۲۰ نمونه سالم مورد استفاده قرار گرفت. پس از بهینه شدن محصول RT-PCR در ژل آگارز ۱.۵٪ حاوی TBE 0.5X الکتروفورز گردید و مورد بررسی قرار گرفته شد.

جدول۱: پرایمرهای طراحی و جهت ارزیابی ژن‌های *GAPDH* و *HER3*

نام پرایمر	توالی	PCR Products
HER3-RT=F	5`-ACTGCCAGACATTGACCAAG-3`	299 bp
HER3-RT=R	5`-GGATGTTTGATCCACCACAA-3`	
GAPDH-F	5`-TGACTTCAACAGCGACACCCA-3`	395 bp
GAPDH-R	5`-CACCCTGTTGCTGTAGCCAAA-3`	

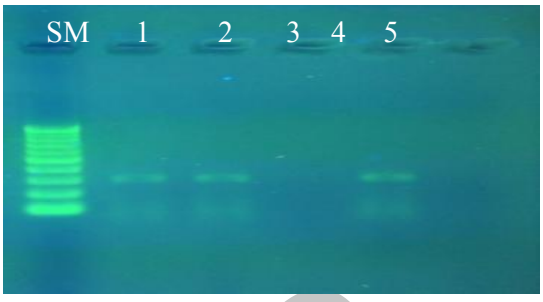
یافته‌ها

در ۱۴ نمونه (۷۰٪) (P=0/0002) از ۲۰ نمونه بلوک پارافینه از افراد مبتلا به سرطان پستان تست RT-PCR مثبت ارزیابی شد و در ۶ مورد (۳۰٪) (P=0/0005) در تست RT-PCR منفی دیده شد. بیان ۷۰٪ ژن *HER3* در نمونه‌ها بیانگر نقش احتمالی این ژن در بروز و یا

Archive of SID

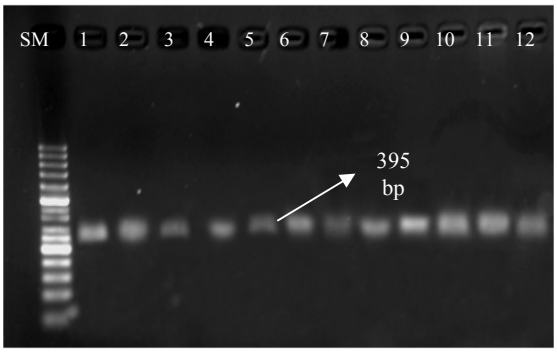
www.SID.ir

پیشرفت بیماری می‌باشد که این عمل احتمالا در ارتباط با سایر اعضای این خانواده می‌باشد (شکل ۱).



شکل ۱: محصول RT-PCR ژن *HER3*: SM: سایز مارکر DNA Ladder Fermentas bp ۱۰۰، ۵-۱؛ محصول PCR نمونه‌های بیمار.
نمونه‌های ۳ و ۵ منفی، نمونه‌های ۱، ۲، ۴ مثبت

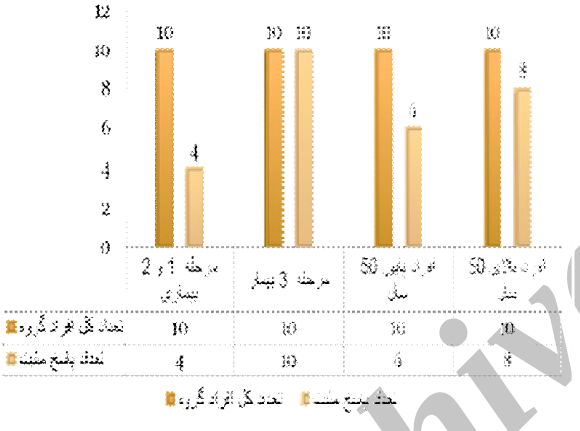
همچنین در این مطالعه از ژن گلیسرالدهید ۳- فسفات دهیدروژناز (GAPDH) به‌عنوان کنترل داخلی استفاده شد. از آنجایی که این ژن جزو ژن‌هایی است که بیان دایمی در سلول دارند، لذا هدف مناسبی جهت بررسی به عنوان کنترل داخلی به حساب می‌آید. بعد از انجام واکنش RT-PCR برای اطمینان از انجام صحیح واکنش محصولآن بر روی ژل آگارز ۱/۵٪ جداسازی و الکتروفورز گردید. مشاهده قطعه محصول PCR با اندازه حدود ۳۹۵ جفت باز، انجام صحیح واکنش را تایید نمود (شکل ۲).



شکل ۲: الکتروفورز محصول RT-PCR برای ژن کنترل داخلی.SM: سایز مارکر DNA Ladderbp50 فرمنتاس؛ ۱-۱۲: محصول RT-PCR ژن GAPDH برای نمونه‌های ۱ الی ۱۲.

آزمون PCR با استفاده از رده سلول‌های سرطانی دارای بیان ژن *HER3* و کنترل مثبت و منفی در کنار سایز مارکر بهینه گردید. پس از الکتروفورز محصول PCR، باند اختصاصی حاصل از پرایمرها دارای ۲۹۹ جفت باز طول داشت. با اطمینان یافتن از بهینه شدن آزمون PCR و بدست آمدن باند اختصاصی نمونه، آزمون PCR بهینه شده را برای ۲۰ نمونه بیمار و ۲۰ نمونه سالم مورد استفاده قرار گرفت.

به‌نظر می‌رسد افزایش سن و مرحله بیماری با افزایش بیان *HER3* در ارتباط باشد، به‌طوری‌که این مطلب در نتایج نیز تایید شد. افزایش Stage بیماری میزان بیان ژن در مراحل بالاتر افزایش قابل ملاحظه‌ای می‌یابد (نمودار ۱).



نمودار ۱: توزیع فراوانی سن با stage در نتایج ژن HER3 به‌وسیله تست RT-PCR

از ۲۰ نمونه مورد بررسی ۱۰ نمونه در مرحله (۱و۲) و ۱۰ نمونه در مرحله (۳و۴) قرار داشتند که از این جهت توزیع مساوی در دو گروه وجود داشت. علی‌رغم برابر بودن تعداد نمونه‌های هر گروه، نتایج نشان داد که ژن *HER3* در افراد گروه دوم (افراد در مرحله ۳ و۴) نسبت به گروه اول (افراد در مرحله ۱و۲) تعداد پاسخ مثبت بیشتری وجود دارد، به‌طوری‌که از ۱۰ نمونه گروه ۱ تنها در ۴ نمونه ژن *HER3* دیده شده و در ۶ نمونه ژن دیده نشد؛ در حالی‌که کلیه ۱۰ نمونه موجود در گروه ۲ پاسخ مثبت در ژن مزبور را نشان دادند. همچنین مقایسه نتایج نشان داد که ارتباط مستقیمی میان افزایش سن و ژن *HER3* وجود دارد. با تقسیم‌بندی بیماران به دو گروه زیر ۵۰ سال و بالای ۵۰ سال تعداد پاسخ مثبت *HER3* نیز بیشتر بوده است. از ۱۰ نفر افراد بیمار زیر ۵۰ سال افزایش بیان

Archive of SID
www.SID.ir

HER3 در ۶ نمونه دیده شد و در گروه دوم، افراد بالای ۵۰ سال در ۸ نمونه افزایش بیان *HER3* دیده شد. بیشترین بیان ژن *HER3* در افراد بالای ۵۰ سال و نیز افراد در مراحل پیشرفته بیماری دیده شد (نمودار ۱).

بحث

افزایش در برخی از نواحی ژنوم که شامل انکوژن‌های از قبیل *HER3* می‌باشد، نقش مهمی را در شروع و پیشرفت تعدادی از تومورها از جمله تومور پستان بازی می‌کند (۱۴)، لذا استفاده از روشی ساده، دقیق، آسان برای تعیین تومورهای افزایشی و یا افزایش بیان این ژن لازم و ضروری است. از معمول‌ترین روش‌های بررسی بیان ژن می‌توان به تکنیک ایمونوهیستوشیمی (IHC) و FISH اشاره نمود. تکنیک IHC علی‌رغم سادگی و سهولت، دقت پایینی دارد و نتایج مثبت کاذب زیادی ارایه می‌دهد (۱۷) و تست FISH نیز علی‌رغم دقت بسیار بالا، به دلیل نیاز به صرف هزینه‌های بسیار، وقت گیر و بسیار گران است (۱۹) و اسلایدهای آن در دراز مدت قابل نگهداری نمی‌باشد (۱۶). بنابراین در بسیاری از آزمایشگاه‌ها انجام‌پذیر نمی‌باشد. تکنیک‌های مولکولی از جمله PCR در مقایسه با تکنیک‌های میکروسکوپی سریع‌تر، دقیق‌تر، ارزان‌تر و آسان‌تر است (۱۱). RT-PCR یک روش کیفی و کم هزینه جهت تخمین بیان ژن به حساب می‌آید.

در مطالعه حاضر، وضعیت افزایش ژن *HER3* در نمونه‌های تومور پستان توسط روش RT-PCR بررسی گردید. در این بررسی در ۱۴ نمونه (۷۰٪) از ۲۰ نمونه بلوک پارافینه از افراد مبتلا به سرطان پستان تست RT-PCR مثبت ارزیابی شد و در ۶ مورد (۳۰٪) در تست RT-PCR منفی دیده شد.

بیان ژن *HER3* در نتایج Ingrid Ljuslinder و همکاران، توسط تکنیک Immnostaining که بر روی ۶۴ نمونه سرطان پستان بررسی شد، ۶۷٪ مشابه نتایج ما می‌باشد (۱۵). همچنین در مطالعات David Horst وAbdelhamid Beji، تشابه ۵۳/۶ درصدی بیان ژن *HER3* را در نمونه‌های سرطان سینه نشان دادند (۱۲). در مطالعه حاضر ۴۲/۳٪ نتایج تست RT-PCR مثبت بوده و در مقایسه با تکنیک IHC در مطالعه OcanaAlberto و همکاران نیز مشاهده شد (۱۸) و مطالعات Bijay S.jaiswal در سال ۲۰۱۳ در سرطان‌های معده و روده با کمک سه تکنیک DNA Sequencing، IHC، Micro array که در مطالعه آنها مشخص شد بیان ژن *HER3* در سرطان معده و روده نیز نقش دارد که در مطالعه ما نیز نتایج مشابهی بر روی سلول‌های سرطان پستان با تکنیک RT-PCR بدست آمد (۱۳).

مشاهده بیان این ژن در ۲ نفر از افراد سالم می‌تواند به عنوان زنگ خطری در این افراد به حساب آید. هر چند که مطالعات بیشتری در آینده برای اثبات این امر نیاز می‌باشد. اختلافات ژنتیکی نیز می‌تواند عامل مهمی در این نتایج به حساب آید. بعلاوه عدم بیان ژن در ۶ نفر از افراد بیمار احتمالا با توجه به پایین بودن مرحله بیماری و سن این افراد مرتبط است، اگرچه از تفاوت در ذخایر ژنتیکی نیز نمی‌توان صرف نظر نمود.

تاکنون در ایران مطالعاتی در زمینه افزایش بیان ژن *HER3* در سرطان پستان صورت نگرفته با توجه به این که این بررسی برای اولین بار در این تحقیق انجام شده. با توجه به نتایج این مطالعه و مطالعاتی که در دیگر نقاط دنیا صورت گرفته می‌توان بیان نمود که ژن *HER3* می‌تواند به عنوان یک عامل موثر و دخیل در سرطان پستان مطرح شود که افزایش بیان آن با پیشرفت و توسعه بیماری در ارتباط است.

نتیجه‌گیری

تکنیک‌های مولکولی از جمله PCR در مقایسه با تکنیک‌های میکروسکوپی سریع‌تر، دقیق‌تر، ارزان‌تر و آسان‌تر است. نتایج نشان می‌دهد که *HER3* در ابتلا به سرطان پستان تاثیرگذار بوده که با افزایش سن و مرحله بیماری بیان آن افزایش پیدا می‌کند. با توجه به اهمیت تشخیص سرطان پستان در مراحل ابتدایی به منظور بهبود درمان و جلوگیری از پیشرفت بیماری تشخیص و درمان به خصوص درمان تلفیقی در مراحل اولیه سرطان امری ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به نتایج می‌توان بیان نمود که هدف قرار دادن بررسی افزایش بیان *HER3* در کنار سایر اعضای این خانواده یک می‌تواند یک افقی را برای استفاده از یک روش درمانی تکمیلی در کنار سایر روش‌های درمان متداول ایجاد نماید.

Archive of SID

www.SID.ir

References

1. O'Connell JB, Maggard MA, Ko CY. Colon cancer survival rates with the new American Joint Committee on Cancer sixth edition staging. J Natl Cancer Inst, 2004; 96(19): 1420-5.
2. Mousavi SM, Montazeri A, Mohagheghi MA, Mousavi Jarrahi A, Harirchi I, Najafi M, et al. Breast cancer in Iran: an epidemiological review. The Breast J, 2007; 13(4): 383-91.
3. Roskoski R . The ErbB/HER family of protein-tyrosine kinases and cancer. Pharmacol Res 2014; 79: 34-74.
4. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer Jr CE, Davidson NE, Tan-Chiu E, Martino S, Paik S, Kaufman PA, Swain SM. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. New England Journal of Medicine 2005;353(16):1673-84.
5. O'Hagan RC, Chang SS, Maser R, Mohan R, Artandi S, Chin L, et al. Telomere dysfunction provokes regional amplification and deletion in cancer genomes. Cancer Cell 2002; 2(2): 49-55.
6. Prigent SA, Lemoine NR, Hughes CM, Plowman GD. Expresstion of the c-ErbB3 protein in normal human adult and fetal tissues. Oncogen 2006; 7:1273-8.
7. Coussens L, Yang-feng TL, Liao YC, Chan E, Gray A, Mcorath J, Seeburg PLT, Libermann TA. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal-location with neu oncogene. Science 2008; 230:1132-9.
8. Engelman JA, Zejnullahu K, Mitsudomi T, Song Y, Hyland C, Park JO, Lindeman N, Gale CM, Zhao X, Christensen J, Kosaka T, Holmes AJ, Rogers AM, Cappuzzo F, Mok T, Lee C, Johnson BE, Cantley LC, Jänne PA. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. Science 2007; 316 (5827): 1039-43.
9. Osipo C, Meeke K, Cheng D, Weichel A, Bertucci A, Liu H, Jordan VC. Role for HER2/neu and HER3 in fulvestrant-resistant breast cancer. Int J Oncol, 2007; 30 (2): 509-20.
10. Izadi A, Moslemi E, Poorhosseini SM, Yassaee VR, Kheiri HR, Elikai HR .UBD identify in paraffin tissues in patients with colorectal cancer. JIMS 2014; 32(291): 972-81.
11. Barberis M, Pellegrini C, Cannone M, Arizzi C, Coggi G, Bosari S. Quantitative PCR and HER2 testing in breast cancer. A technical and cost-effectiveness analysis. Am J Clin Pathol 2008; 129(4): 563-70.
12. Beji A, Horst D, Enge J, et al. Toward the Prognostic Significance and Therapeutic Potential ofHER3 Receptor Tyrosine Kinase in Human Colon Cancer. Clin Cancer Res 2011; 18:956-68.
13. Jaiswal BS, Kljavin NM, Stawiski EW, Chan E, Parikh C, Durinck S, Chaudhuri S, Pujara K, Guillory J, Edgar KA, Janakiraman V. Oncogenic ERBB3 mutations in human cancers. Cancer cell 2013 ;23(5):603-17.
14. Kuwahara Y, Tanabe C, Ikeuchi T, Aoyagi K, Nishigaki M, Sakamoto H, et al. Alternative Mechanisms of Gene Amplification in Human Cancers. Genes Chromosomes Cancer 2004; 7:7852-96.
15. Ljuslinder I, Mmalmer B, Isaksson-Mettavainio M, ErbB 1-4 Expression Alterations in Primary Colorectal Cancers and their Corresponding Metastases. Anticancer research 2009; 29: 1489-94.
16. Matsenko NU, Rijikova VS, Kovalenko SP. Comparision of SYBR Green I and TaqMan Real-Time PCR formats for the analysis of her2 gene dose in human breast tumors. Bull Exp Biol Med 2008; 145(2): 240-4.
17. Mendelsohn J, Baselga J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. Semin Oncol 2006; 33:369-85.
18. Ocana A, Vera-Badillo F, Seruga B, Templeton A, Pandiella A, Amir E. HER3 Overexpression and Survival in Solid Tumors:A Meta-analysis. JNCI Journal 2012; 8:89-90.
19. Ogiso H, Ishitani R, Nureki O, Fukai S, Yamanaka M, Kim JH, Saito K,Sakamoto A, Inoue M, Shirouzu M, Yokoyama S. Crystal structure of the complex of human epidermal growth factor and receptor extracellular domains. Cell 2002; 110:775-87.

Archive of SID
www.SID.ir