

*Dedication*

*To my parents*

*To my husband*

*To my sisters and brother*

*To my friends*

*I dedicate this work*

*Sara*

## **Acknowledgements**

I would like to convey my gratitude and thanks to my supervisors professor. Abdelrahim Osman Mohamed & Dr. Amar Mohammed Ismail, for their guidance during this research. Their advice in research had motivated all their students, including me.

I would like to thank the laboratory staff of Radio and Isotope Center in Khartoum, Research laboratory and clinical chemistry staff in Sudan University of Science and Technology, whom facilitated my research.

Finally my thanks to all females participant who made this study possible.

## Abstract

**Background:** Vitamin D (VD) status is a modifiable factor that may reduce risk of breast cancer through modulation of cell proliferation, apoptosis, invasion and metastasis via binding to a specific receptor, the vitamin D receptor (VDR). The study aims to assess 25-VitD levels and VDR gene polymorphisms (Fok1, Bsm1, Taq1, Apa1) among Sudanese females with breast cancer.

**Materials and Methods:** This is a case control study conducted during the period, November 2013 to July 2016, in Radio and Isotope Center in Khartoum, Sudan. The subjects were 190 females with breast cancer (patients) and 107 healthy females (controls), matched for age. Blood samples were collected and analyzed for VD levels using ELISA technique, DNA was extracted using guanidine chloroform method, and genotyped for the single nucleotide polymorphisms SNPs of Fok1 (T/C) [rs2228570], Bsm1 (G/A) [rs1544410], Taq1 (C/T) [rs731236] and Apa1 (C/A) [rs7975232] by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) analysis. Genotyping of some samples were confirmed by sequencing (Macrogen Company, Seoul, Korea). BioEdit software was used for multiple sequence alignment.

**Results:** VD deficiency was found in 99.5% of females with breast cancer and 96.3% in the healthy females. There was no significant difference between the two groups  $p$ -value = 0.069. Both patients and controls women had severe deficiency of VD. There was significant negative correlation found between BMI and VD levels in patients ( $p$ -value < 0.001,  $r$  = -0.509), and negative correlation but not significant among controls. Age and parity revealed no associations with vitamin D levels. There was no significant difference between educational level and vitamin D levels in patients and controls. The occupation status revealed nearly significant difference with vitamin D levels in patients and significant in controls ( $p$ -value = 0.053,  $p$ -value = 0.032) respectively. VDR-Taq1 was significantly associated with low risk of breast cancer (OR=0.5,  $p$ -

value = 0.002), while no significant association was observed with VDR-Fok1, Bsm1 and Apa1. Sequence alignment showed consistent change with the rs2228570, rs731236, rs7975232 polymorphic sites. No significant differences in the means of serum vitamin D levels with VDR-SNPs Fok1, Bsm1 and Apa1 genotypes were observed ( $P > 0.05$ ), while there was significant difference in vitamin D levels and VDR-Taq1 when considering dominant genotype model ( $P$ -value = 0.016).

**Conclusions:** In conclusion this study has shown that VD deficiency is high in both study groups. Obesity is a risk factor for VD deficiency. Therefore, VD supplementation is recommended. VDR-Taq1 was associated with low risk of breast cancer in Sudanese females.

## مستخلص الدراسة

**المقدمة:** يعتبر فايتمين د من العوامل التي قد تقلل خطر سرطان الثدي من خلال تنظيم تكاثر الخلايا, موت الخلايا المبرمج والغزو, عن طريق ارتباطه لمستقبلات محدد, مستقبلات فايتمين د. أجريت هذه الدراسة لتعيين مستوي فايتمين د والاشكال الجينية المتعددة لمستقبلات فايتمين د (Fok1, Bsm1, Taq1, Apa1) في النساء السودانيات المصابات بسرطان الثدي.

**طرق البحث:** اجريت هذه الدراسة خلال الفترة من نوفمبر 2013 وحتى يوليو 2016 في مركز الخرطوم للعلاج بالاشعة والطب النووي, السودان. شملت هذه الدراسة 190 من النساء السودانيات المصابات بسرطان الثدي(المرضي) و107 من النساء السودانيات الاصحاء (الضوابط), كان هناك تطابق في العمر. تم جمع عينات من الدم من كلا المجموعتين ثم تم قياس مستويات فايتمين د باستخدام فحص الممتز المناعي المرتبط بالانزيم, ثم تم استخلاص الحمض النووي باستخدام طريقة جواندين كلوروفورم لأداء تقنية تفاعل البوليميرز المتسلسل لتضاعف الحمض النووي واستخدام تقنية تعدد اشكال اطوال الشدف الحصرية للتعرف علي طفرة معينة من الجينات.

**النتائج:** اظهرت الدراسة أن هناك 99.5% من النساء المصابات بسرطان الثدي لديهم نقص في فايتمين د و96.3% من النساء الاصحاء. لا توجد فروقات ذات دلالة احصائية معنوية بين المجموعتين, القيمة الاحتمالية =0.069.

كان هناك علاقة عكسية ذات دلالة احصائية معنوية بين معامل كتلة الجسم ومستويات فايتمين د في المريضيات بسرطان الثدي (القيمة الاحتمالية >0.000, معامل الارتباط = -0.509) وعلاقة عكسية ولكن ليست ذات دلالة احصائية في النساء الاصحاء. لا توجد علاقة بين مستويات فايتمين د مع العمر وعدد الاطفال. لا توجد هناك فروقات ذات دلالة احصائية معنوية بين مستوي التعليم ومستويات فايتمين د, بينما توجد هناك علاقة ذات دلالة احصائية معنوية بين الوضع المهني ومستويات فايتمين د. وأشارت نتائج الدراسة أن هناك علاقة ذات دلالة احصائية معنوية للأشكال الجينية المتعددة لمستقبل فايتمين د Taq1 وانخفاض سرطان الثدي (القيمة الاحتمالية = 0.002, OR= 0.5), بينما لا توجد علاقة ذات دلالة أخصائية معنوية للأشكال الجينية المتعددة لمستقبلات فايتمين د Fok1, Bsm1 و Apa1. لا توجد هناك فروقات ذات دلالة أخصائية بين مستويات فايتمين د والانماط الوراثية للأشكال الجينية المتعددة لمستقبلات فايتمين د Fok1, Bsm1 و Apa1 و بينما توجد علاقة ذات دلالة احصائية مع النمط الوراثي السائد للأشكال الجينية المتعددة لمستقبل فايتمين د Taq1 (القيمة الاحتمالية = 0.016).

**الخلاصة:** اظهرت الدراسة ان نقص فايتمين د مرتفع في كل من مجموعتين الدراسة. السمنة هي أحد العوامل الذي يسبب نقص فايتمين د. توجد علاقة بين الاشكال الجينية المتعددة لمستقبل فايتمين د Taq1 وانخفاض سرطان الثدي عند النساء السودانيات.

## Contents

Content	Page
<b>Dedication</b>	I
<b>Acknowledgments</b>	II
<b>Abstract</b>	III
مستخلص الدراسة	V
<b>Abbreviations</b>	IX
<b>List of tables</b>	X
<b>List of figures</b>	XI
<b>Chapter one</b>	
<b>1. Introduction and literature review</b>	1
<b>1.1 Introduction</b>	1
<b>1.2 Breast cancer</b>	2
<b>1.2.1 Epidemiology of breast cancer</b>	2
<b>1.2.2 Risk factors of breast cancer</b>	3
<b>1.3 Vitamin D</b>	3
<b>1.3.1 Metabolism of vitamin D</b>	5
<b>1.3.2 Regulation of 1,25(OH)<sub>2</sub>D production</b>	7
<b>1.3.3 Vitamin D receptor</b>	8
<b>1.3.4 Biological action of vitamin D</b>	9
<b>1.3.5 Molecular effects of VD/VDR</b>	11
<b>1.3.6 Vitamin D deficiency</b>	11
<b>1.3.7 Hypervitaminosis D</b>	13
<b>1.3.8 VDR polymorphisim</b>	13
<b>1.3.9 Vitamin D/VDR and breast cancer</b>	14
<b>1.4 Rationale</b>	18
<b>1.5 Objectives</b>	19
<b>Chapter two</b>	
<b>2. Materials and Methods</b>	20
<b>2.1. Study Design</b>	20

<b>2.2. Study area and Period</b>	20
<b>2.3. Study Population</b>	20
<b>2.4. Sample Size</b>	20
<b>2.5. Inclusion Criteria</b>	20
<b>2.6. Exclusion Criteria</b>	20
<b>2.7. Ethical Consideration</b>	20
<b>2.8. Data collection and Clinical Examination</b>	21
<b>2.9. Blood sample Collection</b>	21
<b>2.10. Measurement of vitamin D (25(OH)-vitamin D)</b>	21
<b>2.11. Gene and polymorphisms</b>	22
<b>2.12. DNA extraction</b>	22
<b>2.13. Genotyping of VDR</b>	23
<b>2.12 Sequencing</b>	24
<b>2.15. Statistical Analysis</b>	24
<b>Chapter three</b>	
<b>3.Results</b>	26
<b>Chapter four</b>	
<b>4. Discussion, Conclusions and Recommendations</b>	42
<b>4.1 Discussion</b>	42
<b>4.2 Conclusions</b>	48
<b>4.3 Recommendations</b>	49
<b>References</b>	
<b>References</b>	50
<b>Appendixes (1): Questionnaire</b>	
<b>Appendixes (2): Measurement of 25 OH vitamin D</b>	
<b>Appendixes (3):</b>	
<b>PCR protocol</b>	
<b>RFLP protocol for VDR-polymorphisms (Fok1, Bsm1, Taq1 and Apa1)</b>	

## **Abbreviations**

<b>VD</b>	<b>Vitamin D</b>
<b>VDR</b>	<b>Vitamin D Receptor</b>
<b>BMI</b>	<b>Body Mass Index</b>
<b>UV</b>	<b>Ultra violet</b>
<b>DBP</b>	<b>VD binding protein</b>
<b>CYP</b>	<b>Cytochrome P</b>
<b>RXR</b>	<b>Retinoid X receptor</b>
<b>HAT</b>	<b>Histone acetyl transferase</b>
<b>PTH</b>	<b>Parathyroid hormone</b>
<b>FGF23</b>	<b>Fibroblast growth factor 23</b>
<b>LBD</b>	<b>Ligand-binding domain</b>
<b>DBD</b>	<b>DNA-binding domain</b>
<b>ATP</b>	<b>Adenosine triphosphate</b>
<b>SNPs</b>	<b>Single nucleotide polymorphisms</b>
<b>DNA</b>	<b>Deoxyribonucleic acid</b>
<b>PCR</b>	<b>Polymerase chain reaction</b>
<b>RFLP</b>	<b>Restriction fragment length polymorphism</b>
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	<b>Double-distilled water</b>
<b>WCLB</b>	<b>White cell lysis buffer</b>
<b>RCLB</b>	<b>Red cell lysis buffer</b>
<b>RICK</b>	<b>Radio and Isotope Center of Khartoum</b>

## List of Tables

<b>Table</b>	<b>Title</b>	<b>Page</b>
<b>2.1</b>	<b>PCR-RFLP pattern of FokI, BsmI , TaqI and ApaI polymorphisms of vitamin D receptor gene</b>	24
<b>3.1</b>	<b>Comparison of the means <math>\pm</math> SD of age, BMI, VD level and VD status in patients and controls</b>	28
<b>3.2</b>	<b>Correlation of age and BMI of patients and controls with vitamin D levels</b>	28
<b>3.3</b>	<b>Comparison of VDR-Fok1 and Taq1 polymorphisms genotypes and alleles frequencies in patients and controls</b>	35
<b>3.4</b>	<b>Comparison of VDR-Bsm1, Apa1 polymorphisms genotypes and alleles frequencies in patients and controls</b>	38
<b>3.5</b>	<b>Comparison of serum Vitamin D levels in different VDR-polymorphisms genotypes (Bsm1, Fok1, Taq1 , Apa1) in patients</b>	41

## List of Figures

<b>Figure</b>	<b>Title</b>	<b>Page</b>
<b>3.1</b>	<b>Correlation between the serum vitamin D levels and BMI in patients</b>	29
<b>3.2</b>	<b>Correlation between the serum vitamin D levels and BMI in controls</b>	29
<b>3.3</b>	<b>Correlation between the serum vitamin D levels and parity in patients</b>	30
<b>3.4</b>	<b>Frequencies of education levels in A) patients and B) controls</b>	31
<b>3.5</b>	<b>Frequencies of occupation status in A) patients and B) controls</b>	32
<b>3.6</b>	<b>Means of vitamin D level across education levels in A) patients and B) controls</b>	33
<b>3.7</b>	<b>Means of vitamin D level across Occupation status in A) patients and B) controls</b>	34
<b>3.8</b>	<b>A typical run of VDR-Fok1 on 1% , 2% agarose gel electrophoresis and multiple sequence alignment</b>	36
<b>3.9</b>	<b>A typical run of VDR- Taq1 on 1%, 2% agarose gel electrophoresis and multiple sequence alignment</b>	37
<b>3.10</b>	<b>A typical run of VDR-Bsm1 on 1%, 2% agarose gel electrophoresis</b>	39
<b>3.11</b>	<b>A typical run of VDR-Apa1 on 1%, 2% agarose gel electrophoresis and multiple sequence alignment</b>	40