کتابخانه مرکزی
دانشگاه علوم پزشکی اصفهان
شماره ثبت: ۱۴۶۳۱
تاریخ ثبت: ۱۳۹۳/۷/۵

دانشکده پزشکی- گروه ژنتیک و بیولوژی مولکولی

بررسی آلل های rs1477196 و rs9939609 ژن FTO در سرطان پستان در افراد مورد مطالعه در اصفهان

شماره طرح تحقیقاتی

۳۹۱۳۲۱

تحت راهنمایی:

دکتر منصور صالحی

تحت مشاوره:

دکترفریبرز مکاریان

دانشجو

محبوبه مجاور

۱۳۹۲

چکیده پایان نامه

مقدمه: سرطان پستان (BC)، شایع ترین سرطان در زنان است که علت عمده مرگ و میر در زنان به علت سرطان می باشد. چاقی به عنوان یک عامل خطر عمده برای ابتلا به سرطان پستان، نرخ و شدت ابتلا به این بیماری را افزایش می دهد. پلی مورفیسم در ژن FTO، ژنی که ارتباط آن با چاقی شناخته شده است ، با صفات مرتبط با چاقی همراهی نشان داده است. هدف از این مطالعه بررسی ارتباط بین پلی مورفیسم تک نوکلئوتیدی (SNP ها در ژن) اینترون ۱ ژن FTO، rs1477196 و rs9939609 و خطر BC که قبلا این ارتباط گزارش شده، در زیر مجموعه ای از بیماران ایرانی مبتلا به BC بود.

مواد و روشها: ما ۹۹ فرد بیمار و ۱۰۰ فرد کنترل رابرای هر دو SNP rs9939609 و rs1477196 با روش Taqman allelic discrimination assay مورد ژنوتایپینگ قرار دادیم. برای هر نمونه در هر allelic discrimination assay ، یک جفت منحصر به فرد از پروب فلورسنت استفاده می شود. یکی از پروب های فلورسنت مکمل توالی بازی آلل نوع وحشی و کاوشگر فلورسنت دیگر کاملا مکمل آلل جهش یافته می باشد.

نتایج: مطالعه ما نشان داده است که تفاوت مشاهده شده بین دو گروه مورد و شاهد در این SNP ها در ژن مورد مطالعه از ژن FTO از نظر آماری معنی دار نبود (مقدار P> ۰.۰۵).

بحث: یافته های ما نشان می دهد که هیچ ارتباطی بین پلی مورفیسم های rs9939609 و rs1477196 ژن FTO و افزایش خطر ابتلا به BC در جمعیت مورد مطالعه مشاهده نشد.این نتایج با نتایج حاصل از مطالعات بیمار- شاهدی انجام گرفته دیگر سازگار نبوده دلالت برحضور این پلیمورفیسم ها و فراوانی وابسته به گروه قومی آنها دارد.

کلمات کلیدی: ژن FTO، چند شکلی ، سرطان پستان

فهرست مطالب

فصل اول : مقدمه

۱-۱ سرطان چیست؟..... ۱

۱-۲ - سرطان پستان چیست؟..... ۱

۱-۳ ریسک فاکتورهای سرطان پستان کدامند ۲

۱-۳-۱ریسک فاکتورهایی که قابل تغییر نیستند ۲

۱-۳-۱-۱ جنس ۲

۱-۳-۱-۲ سن ۲

۱-۳-۱-۳ ریسک فاکتورهای ژنتیکی ۳

۱-۳-۲ ریسک فاکتورهای مرتبط با سبک زندگی ۳

۱-۳-۳ عوامل با اثر نامشخص ۳

۱-۴ آمارهای کلیدی در مورد سرطان پستان چه هستند؟ ۴

۱-۵ آمار سرطان پستان در ایران ۴

۱-۶ داشتن اضافه وزن یا چاقی ۵

۱-۷ روش های تشخیص چاقی..... ۵

۱-۸ اپیدمیولوژی چاقی ۶

۱-۹ مطالعات ارتباط چاقی و سرطان پستان در آسیا ۷

۱-۱۰ جهش ۷

۱-۱۱ SNP ۷

۱-۱۲ استفاده از روش های مختلف در شناسایی SNP مرتبط با بیماری ها ۸

۱-۱۳ GWAS ۸

۱-۱۴ FTO ۹

۱-۱۵ نتیجه گیری ۱۱

۱-۱۶ اهداف و فرضیات ۱۱

۱-۱۶-۱-اهداف ۱۱

۱-۱۶-۱-۱ هدف کلی تحقیق ۱۱

۱-۱۶-۱-۲ اهداف جزئی تحقیق ۱۱

۱-۱۶-۱-۳ هدف کاربردی ۱۲

۱-۱۶-۲ سئوالات پژوهشی یا فرضیات ۱۲

۱-۱۶-۲-۱ سئوالات ۱۲

۱-۱۶-۲-۲ فرضیات ۱۲

فصل دوم : مواد و روش ها

۲-۱ جمع اوری نمونه های خون ۱۳

۲-۱-۱انتخاب بیماران و افراد کنترل مناسب ۱۳

۲-۱-۲ نمونه گیری و نگهداری نمونه ۱۳

۲-۱-۳ استخراج DNA از خون تام نمونه ها با روش استاندارد ۱۴

۲-۱-۴ بررسی کمی و کیفی DNA استخراج شده ۱۵

۲-۱-۴-۱ بررسی کمی DNA با اسپکتروفتومتر ۱۵

۲-۱-۴-۲ بررسی کیفی DNA با ژل الکتروفورز ۱۶

۲-۲ طرز تهیه محلول ها و بافرهای مورد نیاز در الکتروفورز ۱۶

۲-۲-۱ روش تهیه TBE 0.5× ۱۶

۲-۲-۲ تهیه ژل آگارز ۱۷

۲-۳ کلیات PCR ۱۸

۲-۴ تکثیر نمونه DNA استخراج شده با Taqman PCR..... ۲۰

۲-۴-۱ مواد و وسایل و تجهیزات مورد نیاز جهت انجام TaqmanPCR ۲۱

۲-۴-۲- طرز تهیه محلول های مورد نیاز..... ۲۱

۲-۴-۲-۱ تهیه Genotyping assay 20× ۲۱

۲-۴-۲-۲ تهیه working از mastermix ۲۲

۲-۴-۳- بهینه سازی روش PCR ۲۲

۲-۴-۴- -تعیین ژنوتیپ SNP مورد بررسی مطالعه در افراد سالم ۲۳

۲-۴-۵ تایید محصولات PCR و تعیین ژنوتیپ با تعیین توالی ۲۳

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری داده ها با استفاده از روش های آماری مناسب ۲۴

فصل سوم : نتایج

۳-۱-نتایج تخلیص DNA ژنومی ۲۵

۳-۱-۱- نتایج بهینه سازی شرایط استخراج و تخلیص DNA ژنومی ۲۵

۳-۱-۲ نتایج بررسی کمی وکیفی DNAاستخراج وتخلیص شده ۲۵

۳-۲ نتایج Taqman PCR..... ۲۵

۳-۳ نتایج حاصل از تعیین توالی محصولات PCR ۲۷

۳-۴ اطلاعات فراوانی ۲۸

۳-۵ فراوانی آللی وژنوتیپی پلیمورفیسم های تک نوکلئوتیدی مورد بررسی در افراد سالم و بیمار ۲۹

۳-۵-۱ نتایج فراوانی آللی وژنوتیپی برای پلیمورفیسم rs9939609 A>T در افراد سالم و بیمار و مقایسه نتایج بین این دو گروه..... ۲۹

۳-۵-۲ نتایج فراوانی آللی وژنوتیپی برای پلیمورفیسم rs1477196 A > G در افراد سالم و بیمار و مقایسه نتایج بین این دو گروه ۳۰

۳-۶ نتایج فراوانی آللی وژنوتیپی برای پلیمورفیسم rs1477196 A > G در زنان بیمار و سالم با توجه به حالت menapouse آنها و مقایسه نتایج بین این دو گروه ۳۱

۳-۷ نتایج فراوانی آللی وژنوتیپی برای پلیمورفیسم rs9939609 A>T در افراد سالم و بیماربا توجه به حالت menapouse آنها و مقایسه نتایج بین این دو گروه ۳۲

فصل چهارم : بحث و نتیجه گیری

۴-۱ بحث ونتیجه گیری ۳۴

منابع تحقیق ۳۷

ضمائم

پرسشنامه بررسی مشخصات افراد مبتلا به سرطان پستان ۴۰

پرسشنامه بررسی مشخصات افراد کنترل ۴۱

فرم رضایت نامه افراد شرکت کننده در مطالعه ۴۲

چکیده انگلیسی ۴۳

متن کامل ۴۴

فهرست شکل ها

شکل ۱-۱ ساختار بافت پستان نرمال.. ..... ۲

شکل ۱-۲ RNA epigenetics : مسیر سلولی جدید در پروسه تنظیم ژنتیکی که در چاقی ودیابت نوع ۲ مشارکت دارد..... ۱۰

شکل ۱-۳ آنالیز های In silico و مطالعات بیان ژن بیانگر تعامل عملکردی بین FTO و مسیر سیگنالینگ BDNF/NTRK2 می باشد..... ۱۰

شکل ۲-۱ پروسهTaqMan® SNP Genotyping Assays ۲۰

شکل ۲-۲ چرخه های دمایی و زمان مورد استفاده در واکنش های Taqman Genotyping..... ۲۳

شکل ۳-۱ نتایج اولیه حاصل از واکنش های Taqman genotyping.در این حالت دستگاه قادر به شناسایی خودکار ژنوتیپ ها نبود..... ۲۶

شکل ۳-۲ نتایج حاصل از set up نهایی واکنش Taqman genotyping ۲۶

شکل ۳-۳ نتایج PCR انجام گرفته جهت sequencing ۲۷

شکل۳-۴ نتیجه تعیین توالی نمونه هتروزیگوت مربوط به rs۱۴۷۷۱۹۶ ..... ۲۸

شکل۳-۵ نتیجه تعیین توالی نمونه هتروزیگوت مربوط به rs۹۹۳۹۶۰۹ ..... ۲۸

فهرست جداول

جدول ۲-۱ ارتباط بین سیگنال های فلورسنت مشاهده شده و نتایج مربوط به هر نمونه TaqMan ® SNP Genotyping Assays ۲۱

جدول ۳-۱ ویژگی های دموگرافیک بیماران مبتلا به سرطان پستان و افراد کنترل سالم ۲۹

جدول ۳-۲ فراوانی آللی وژنوتیپی پلیمورفیسم rs9939609 A > T مطالعه شده در افراد مورد و شاهد ۳۰

جدول ۳-۳ فراوانی آللی وژنوتیپی پلیمورفیسم rs1477196 A> G مطالعه شده در افراد مورد و شاهد ۳۰

جدول ۳-۵ بررسی فراوانی آللی rs1477196 در افراد یائسه و غیر یائسه در گروه بیمار ۳۱

جدول ۳-۶ بررسی فراوانی آللی rs1477196 در افراد یائسه و غیر یائسه در گروه کنترل..... ۳۲

جدول ۳-۷ مقایسه فراوانی آللی rs9939609 درافراد یائسه و غیر یائسه دو گروه بیمار و کنترل..... ۳۲

جدول ۳-۸ بررسی ارتباط ژنوتیپ های rs1477196 و rs9939609 با وضعیت یائسگی افراد با استفاده از مدل رگرسیون لجستیک با متد enter ۳۳

جدول ۳-۹ بررسی حالت یائسگی و غیر یائسگی در دو گروه بیمار و کنترل ۳۳

35%, 44% and 8% respectively [23-24]. Unfortunately, the allele frequencies of these polymorphisms in Iran, is not known. The differences in ethnic background, the different forms of breast cancer, uncontrolled interfering factors in some studies, and differences in demographic and environmental risk factors may somehow explain the contraversy observed in different studies.

Overall, the results of this study indicate that SNPs in the FTO gene, has no role in breast cancer risk in Isfahan population. Our study further demonstrated that the role of adipose tissue in the development of cancer is very complicated and the role of the individual's genetic background polymorphisms in this pathway, has remained more elusive. In order to clarify the role of SNPs on this route, which may play a role in carcinogenesis, we require further studies in different populations, as well as considering the influence of environmental factors.

Acknowledgement

This study was supported by grant number 391321 from Isfahan University of Medical Science. We also, gratefully thank the sincerely collaboration of the stuff of Omid and Alzahra hospital, in collecting samples.

References:

1. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, Cancer Statistics, 2012. CA CANCER J CLIN 2012. **62**: p. 10-29.
2. Hajian-Tilaki, K.O., et al., Body mass index and waist circumference are predictor biomarkers of breast cancer risk in Iranian women. Med Oncol, 2010.
3. Harirchi, I., et al., Twenty years of breast cancer in Iran: downstaging without a formal screening program. Annals of Oncology, 2010.
4. Mousavi, S.M., et al., Breast Cancer in Iran: An Epidemiological Review. The Breast Journal, 2007. **13**: p. 383-391.
5. Taghavi, A., et al., Increased Trend of Breast Cancer Mortality in Iran. Asian Pacific J Cancer Prev, 2012. **13**: p. 367-370.
6. Brennan, P., et al., Obesity and cancer: Mendelian randomization approach utilizing the FTO genotype. International Journal of Epidemiology 2009. **38**: p. 971-975.
7. Fawcett, K.A. and I. Barroso, The genetics of obesity: FTO leads the way. Trends Genet. 2010 June ; 26(6): 266–274., 2010. **26**: p. 266-274.
8. Wu, Q., et al., The obesity-associated Fto gene is a transcriptional coactivator. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2010. **401**: p. 390-395.
9. Calle, E.E. and R. Kaaks, OVERWEIGHT,OBESITY AND CANCER: EPIDEMIOLOGICAL EVIDENCE AND PROPOSED MECHANISMS. NATURE REVIEWS, 2004. **4**.

10. ´bert, S., et al., Influence of prenatal nutrition and obesity on tissue specific fat mass and obesity-associated (FTO) gene expression. Reproduction 2010. **139**: p. 265-274.
11. Berulava, T. and B. Horsthemke, The obesity-associated SNPs in intron 1 of the FTO gene affect primary transcript levels. European Journal of Human Genetics 2010. **18**: p. 1054–1056.
12. Gao, X., et al., The Fat Mass and Obesity Associated Gene FTO Functions in the Brain to Regulate Postnatal Growth in Mice. PLoS ONE, 2010. **5**(11).
13. Ingman, C., Fat mass and obesity associated (FTO) gene involvement in food intake regulation. 2010.
14. Kaklamani, V., et al., The role of the fat mass and obesity associated gene (FTO) in breast cancer risk. BMC Medical Genetics 2011. **12**(52).
15. Almén, M.S., et al., Genome wide analysis reveals association of a FTO gene variant with epigenetic changes. Genomics 2012. **99**: p. 132-137.
16. Jia, G., et al., Oxidative demethylation of 3-methylthymine and 3-methyluracil in single-stranded DNA and RNA by mouse and human FTO. Federation of European Biochemical Societies, 2008. **582**: p. 3313–3319.
17. Kusinska, R., et al., Influence of genomic variation in FTO at 16q12.2, MC4R at 18q22 and NRXN3 at 14q31 genes on breast cancer risk. Mol Biol Rep 2012. **39**.
18. Angaji, S.A., et al., SNP and its Applications in Treating Human Diseases Australian Journal of Basic and Applied Sciences, 2011. **5**(5): p. 424-432.
19. Eckerman, M., Comparison between probe-based TaqMan and HRM detection for SNP analysis considering genotyping of APOE Honours Thesis in Biomedicine, Advanced level 30 ECTS
20. Montazeri, A., et al., Weight, height, body mass index and risk of breast cancer in postmenopausal women: a case-control study BioMed Central, 2008.
21. Rahmati-Yamchi, M., et al., plasma Leptin, hTeRT Gene expression, and Anthropometric Measures in Obese and non-Obese Women with Breast cancer Breast Cancer: Basic and Clinical Research 2011. **5**: p. 27-35.
22. Jarde, T., et al., Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studi Endocrine-Related Cancer, 2009. **16**: p. 1197–1210.
23. http://asia.ensembl.org/Homo_sapiens/Variation/Population?db=core;r=16:53807758-53808758;v=rs1477196;vdb=variation;vf=1139083. 2013.

Isfahan University of Medical Sciences

School of Medicine – Department of Genetics and molecular biology

Evaluation of rs1477196 and rs9939609 alleles of FTO gene in breast cancer patients in Isfahan

Supervisor

Dr. Mansour Salehi

Consultant:

Dr. FariborzMokarian

By

Mahboobeh Mojaver

2013