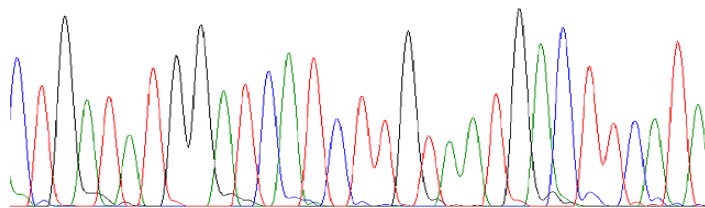


**IDENTIFICACIÓ DELS FACTORS GENÈTICS QUE  
DETERMINEN LA VARIABILITAT DELS NIVELLS  
DE FVII A LA POBLACIÓ ESPANYOLA**

**Resultats del Projecte GAIT**



**MARIA SABATER LLEAL**  
2006

**Tesi Doctoral**  
**Departament de Genètica**  
**Universitat de Barcelona**



# IDENTIFICACIÓ DELS FACTORS GENÈTICS QUE DETERMINEN LA VARIABILITAT DELS NIVELLS DE FVII A LA POBLACIÓ ESPANYOLA

## Resultats del Projecte GAIT

Memòria presentada per Maria Sabater Lleal per optar al grau de Doctora  
en Biologia per la Universitat de Barcelona

Aquesta tesi s'ha realitzat sota la direcció de José Manuel Soria  
Fernández a la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi de l'Hospital de Sant Pau,  
i està vinculada al Departament de Genètica de la Universitat de  
Barcelona sota la tutoria de Lluïsa Vilageliu i Arqués.

Programa de Genètica, Universitat de Barcelona  
(Bienni 2000-2002)

Maria Sabater Lleal

Dr. José Manuel Soria Fernández  
Director de Tesi

Dra. Lluïsa Vilageliu Arqués  
Tutora de Tesi

Barcelona, febrer 2006



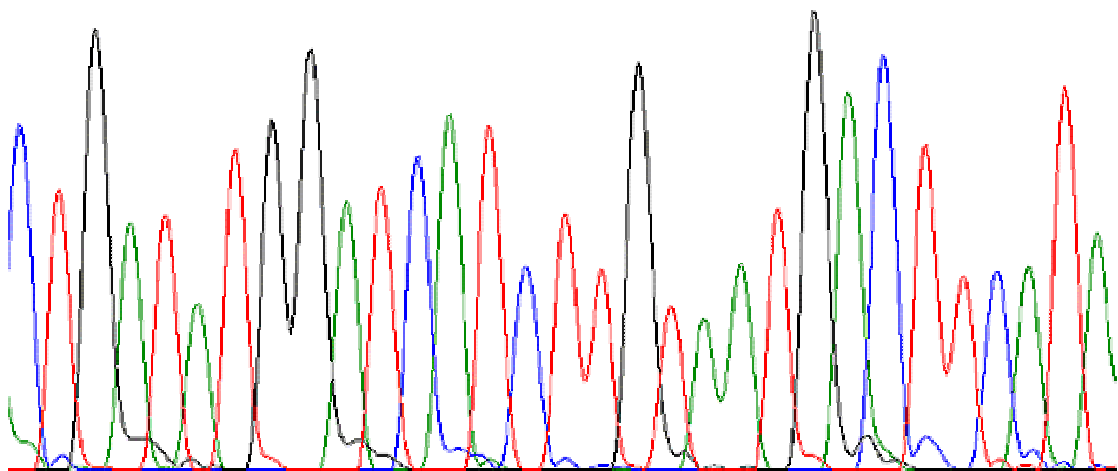
A en Pepe i la Coloma

A en Pau



Copiar a un de sol és plagi. Copiar a molts, investigació.

Amos Oz







## AGRAÏMENTS

Són moltes les persones que al llarg de cinc anys han col·laborat a fer possible aquesta tesi. Aprofito ara per mostrar el meu sincer agraïment a totes elles.

A José Manuel Soria, director d'aquesta tesi, per haver confiat en tot moment en mi, i haver-me introduït en el món de la Recerca. I sobretot per haver-me estimulat constantment i haver-se mogut tant per treure recursos de sota les pedres i donar-me les millors oportunitats (i això, tothom sap que en Recerca té molt mèrit...)

A Jordi Fontcuberta, responsable de la Unitat d'Hemostàsia i Trombosi de l'Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, per acceptar-me en la Unitat i oferir-me l'oportunitat de treballar en el Projecte GAIT.

A William Stone, per la revisió de tots els articles, per estar sempre tan disposat a ajudar en el que calgui, i per haver-me encomanat el seu inesgotable entusiasme per la ciència.

A tota la gent del laboratori de Trombofília; l'Eli Martínez Sánchez, la Carolina Mordillo, l'Eva Companys, la Marta Simón, la Cristina Vallvé pels mil consells, la Isa Tirado per solucionar sempre tots els problemes i ajudar tant en tot el que pot, i l'Eli Martínez Marchán per ajudar-me tantíssim en l'amplificació i la seqüenciació del gen, i per ensenyar-me a treballar en un laboratori. A totes per les rialles i els acudits que hem compartit.

A Jose Mateo i Joan Carles Souto, per tots els consells mèdics i la revisió tan acurada de la tesi, i per l'ajuda impagable amb els secrets del Word...

A l'Alfonso Buil, per ser un bon amic, i per les infinites anàlisis, les seves classes magistrals d'estadística i *linkage*, i per tenir l'habilitat de fer que tot sembli tan fàcil. A en Ramon Souto, per fer-nos riure cada dia.

A la resta de gent amb qui he coincidit durant aquest temps a Sant Pau; l'Amparo Santamaría, la Mireia Constans, la M. Jesús Gallego, la Beatriz Carreras, les noies de plasma, i un munt de gent que segur que m'oblido de nombrar.

A en Francesc Calafell per tota l'ajuda amb les anàlisis de la variabilitat del gen, per ensenyar-me tot el que sé de genètica evolutiva i fer-ho d'una manera tan agradable i educativa. I pels seus consells en la revisió de la tesi.

A Tom Howard per haver-me acollit amb tant d'entusiasme al seu laboratori i a la seva família, i haver-me ofert la fantàstica oportunitat de passar un any a Atlanta. A tota la gent del *Laboratory of Pathology* de la *Emory*, i molt especialment a la Manana Khachidze i a la Deepa Kodandera, per oferir-me una amistat tan maca i ensenyar-me molt més que biologia.

Al Miguel Chillón, per acceptar-me al seu laboratori durant gairebé un any i ser un *jefe* excepcional. Per ajudar-me tant en l'estratègia de clonatge i en les transfeccions.

A tota la gent del CBATEG. Molt especialment, a Jose Piedra, Susana Miravet, Lorena Ariza, Esther Rodríguez, i Estel Gil, per obrir-me les portes de bat a bat en un grup tan encantador i per fer-me sentir tan estimada. A l'Estel, a més, per ser una de les persones més altruistes que he conegut mai, per ajudar-me tant amb les cèl·lules, per estar sempre disposada, i per tots els caps de setmana que ha invertit en aquesta tesi.

Als amics de biologia, Xavi, Dani, Maria, Esther, David, Eva, Bego, Max, Marc i Pau, per ser tan positius i estimular-me i animar-me tant des que vaig començar amb aquesta tesi, i per totes les coses que hem compartit dins i fora la facultat. Al meu germà i als amics de Badalona per intentar entendre el que faig, i sobretot a la Míriam, per fer-me la portada, i per treure'm de casa cada vegada que la tesi gairebé podia amb mi.

A en Pau molt especialment.

Als meus pares per ser-hi sempre i haver-m'ho posat tot tan fàcil.

Finalment, voldria agrair el suport de les següents institucions col·laboradores, sense les quals aquesta tesi no hauria estat possible: Centre Nacional de Genotipació (París, França), Southern Foundation of Biomedical Research (San Antonio, Texas), Universitat Pompeu Fabra (Barcelona), Emory University (Atlanta, Georgia), Centre de Biologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG, Universitat Autònoma de Barcelona) així com el suport financer per part de la Fundació d'Investigació Sant Pau, del Fondo de Investigación Sanitària del Ministerio de Salud (FIS), i del National Institute of Health (NIH).





<b>I-</b>	<b>AGRAÏMENTS</b>	<b>9</b>
<b>II-</b>	<b>GLOSSARI I ABREVIATURES</b>	<b>19</b>
<b>III-</b>	<b>INTRODUCCIÓ</b>	<b>25</b>
-	<b>1- L'Hemostàsia</b> .....	27
-	1.1- L'endoteli.....	27
-	1.2- Les plaquetes.....	30
-	1.3- La cascada de la coagulació.....	30
▪	1.3.1- La via extrínseca.....	33
▪	1.3.2- La via intrínseca.....	33
▪	1.3.3- La via comuna.....	34
▪	1.3.4- La inhibició de la cascada de la coagulació.....	34
-	1.4- La fibrinòlisi.....	36
-	<b>2- El Factor VII</b> .....	38
-	2.1- La proteïna i la seva funció.....	38
-	2.2- El gen <i>F7</i> .....	40
-	<b>3- Regulació fisiològica del FVII</b> .....	44
-	3.1- Factors ambientals.....	44
-	3.2- Factors genètics.....	46
▪	Els polimorfismes del <i>F7</i> .....	46
-	<b>4- Deficiència de FVII</b> .....	52
-	<b>5- El FVII com a factor de risc cardiovascular</b> .....	54
-	<b>6- Malaltia tromboembòlica com a model de malaltia complexa</b> .....	56
-	6.1- Introducció a la malaltia tromboembòlica.....	56
-	6.2- Malaltia tromboembòlica venosa.....	56
▪	6.2.1- Factors adquirits.....	57
▪	6.2.2- Concepte de trombofília.....	57
▪	6.2.3- Evolució de la trombofília com a malaltia complexa.	60
-	<b>7- Les malalties complexes</b> .....	62

-	<b>8- Mètodes d'estudi de les malalties complexes.....</b>	<b>63</b>
-	8.1- Definició de fenotips intermediaris.....	63
-	8.2- Heretabilitat d'un caràcter complex.....	64
-	8.3- Concepte de susceptibilitat ( <i>liability</i> ).....	64
-	8.4- Identificació de <i>loci</i> de susceptibilitat.....	66
▪	8.4.1- Estudis de lligament.....	66
▪	8.4.2- Estudis d'associació.....	68
-	<b>9- El Projecte GAIT.....</b>	<b>72</b>
-	<b>10- Estudi de l'evolució d'un gen.....</b>	<b>73</b>
-	10.1- Mecanismes moleculars d'evolució.....	73
-	10.2- Mecanismes poblacionals d'evolució.....	74
-	10.3- Desequilibri de lligament i haplotips.....	75
<b>IV-</b>	<b>OBJECTIUS</b>	<b>77</b>
<b>V-</b>	<b>MATERIAL I MÈTODES</b>	<b>81</b>
-	<b>Esquema utilitzat per la identificació de les variants al·lèliques</b>	
	<b>Funcionals.....</b>	<b>83</b>
-	<b>1- La mostra GAIT .....</b>	<b>84</b>
-	<b>2- Fenotips: determinacions plasmàtiques.....</b>	<b>86</b>
-	<b>3- Obtenció del DNA.....</b>	<b>88</b>
-	<b>4- Mètodes estadístics per la localització dels gens .....</b>	<b>90</b>
-	4.1- Càlcul de l'heretabilitat.....	90
-	4.2- Anàlisi de gens candidats i Anàlisi Global del Genoma ( <i>Genome Wide Scan</i> ).....	92
-	4.3- Localització d'un gen candidat.....	95
-	<b>5- Amplificació i seqüenciació del gen del F7.....</b>	<b>96</b>
-	5.1- La reacció en cadena de la polimerasa (PCR).....	96
-	5.2- Seqüenciació del DNA.....	98
-	5.3- Identificació de variants de seqüència.....	102
-	5.4- Detecció de mutacions.....	102
-	5.5- Anàlisi de les seqüències de les espècies de primats.....	105
-	5.6- Construcció dels haplotips.....	106

- **6- Mètodes estadístics per l'anàlisi de la variabilitat**..... 107
  - 6.1- *Bayesian Quantitative Trait Nucleotide*..... 107
  - 6.2- Anàlisi de la diversitat del DNA..... 107
    - 6.2.1- Variabilitat intraespecífica..... 108
    - 6.2.2- Variabilitat interespecífica..... 111
- **7- Estudis funcionals**..... 113
  - 7.1- Clonatge..... 113
  - 7.2- Construccions realitzades del promotor del gen *F7*..... 119
  - 7.3- Mutagènesi dirigida..... 121
  - 7.4- Transfecció..... 125
  - 7.5- Quantificació de la fluorescència..... 125
  - 7.6- Anàlisi estadística per comparar l'expressió de les diferents construccions..... 126

---

**VI- RESULTATS** **127**

- **1- Identificació dels determinants genètics dels nivells de FVII**..... 129
  - 1.1- JM Soria, L Almasy, JC Souto, M Sabater-Lleal, J Fontcuberta, J Blangero (2005) The *F7* gene and Clotting Factor VII Levels: Dissection of a Human Quantitative Trait Locus. *Human Biology*, 77(5), 561-575
  - 1.2- M Sabater-Lleal, L Almasy, E Martínez-Marchán, E Martínez-Sánchez, A Buil, R Souto, J Blangero, JC Souto, J Fontcuberta, JM Soria (2006) Genetic Architecture of the *F7* gene in a Spanish population: Implication for mapping complex diseases and for functional assays *Clinical Genetics*, 69(5), 420-428

- **2- Estudi de l'evolució del gen: com s'ha generat la variabilitat genètica en el F7?**..... 133
  - 2.1- M Sabater-Lleal, JM Soria, J Bertranpetit, L Almasy, J Blangero, J Fontcuberta, F Calafell (2006) Human F7 sequence is split into three deep clades that are related to FVII plasma levels. *Human Genetics*, 118(6), 741-751
  
- **3- Estudis funcionals dels polimorfismes del promotor del F7**..... 135
  - 3.1- M Sabater-Lleal, M Chillón, TE Howard, E Gil, L Almasy, J Blangero, J Fontcuberta, JM Soria. Functional Analysis of the F7 Gene Promoter Genetic Variability (Article sotmès a la revista *European Journal of Human Genetics*).
  
- **4- Relació dels polimorfismes del gen F7 (genotips) amb els nivells de FVII i la malaltia cardiovascular (fenotips)** ..... 137
  - 4.1- M Sabater-Lleal, I Tirado, A Buil, J Fontcuberta, JM Soria. Functional polymorphisms of the F7 gene, plasma FVII levels and the risk of deep venous thrombosis (Article en preparació).
  
- **5- Deficiència de FVII**..... 139
  - 5.1- M Sabater-Lleal, E Martínez-Marchán, E Martínez-Sánchez, I Coll, C Vallvé, J Mateo, JC Souto, J Fontcuberta, JM Soria (2003) Complexity of the genetic contribution to Factor VII deficiency in two Spanish families: clinical and biological implications. *Haematologica*, 88(8), 906-913

<b>VII- DISCUSSIÓ</b>	<b>141</b>
<b>VIII- CONCLUSIONS</b>	<b>157</b>
<b>IX- BIBLIOGRAFIA</b>	<b>161</b>



- **1- Taules**

- 1- Factors ambientals que afecten els nivells de FVII plasmàtics.....	44
- 2- Relació dels polimorfismes coneguts en el gen F7.....	47
- 3- Factors adquirits de predisposició al tromboembolisme venós...	57
- 4- Heretabilitats dels fenotips del Projecte GAIT.....	59
- 5- Factors genètics de predisposició al tromboembolisme venós.....	61
- 6- Distribució dels individus examinats al Projecte GAIT.....	85
- 7- Fenotips determinats en el Projecte GAIT.....	86
- 8- Reactius utilitzats en la determinació plasmàtica del FVII.....	87
- 9- Reactius i solucions de treball per l'extracció de DNA.....	89
- 10- Tipus de parentiu i característiques de la mostra GAIT.....	90
- 11- Relació dels marcadors utilitzats i els gens candidats.....	93
- 12- <i>Primers</i> i condicions utilitzades per l'amplificació.....	98
- 13- <i>Primers</i> i condicions utilitzades per la seqüenciació.....	101
- 14- <i>Primers</i> i condicions utilitzades per la genotipació.....	103
- 15- <i>Primers</i> utilitzats per la mutagènesi.....	122
- 16- Temperatures d'hibridació per les mutagènesis.....	123
- 17- Variants al·lèliques funcionals segons el BQN.....	145

- **2- Figures**

- 1- Comparació de l'endoteli sa <i>versus</i> lesionat.....	29
- 2- Representació esquemàtica de la cascada de la coagulació.....	32
- 3- Activació del Sistema de la Proteïna C.....	36
- 4- Estructura proteica del FVII.....	39
- 5- Zones reguladores del promotor del <i>F7</i> .....	43
- 6- Model llinar de la susceptibilitat a patir una malaltia.....	65
- 7- Estratègia per la localització de QTNs.....	83
- 8- Esquema del gen <i>F7</i> .....	98
- 9- Mètode de seqüenciació.....	99
- 10- Representació d'un <i>network</i> filogenètic.....	110
- 11- Esquema de la filogènia d'un gen.....	111
- 12- Procés de clonatge.....	114
- 13- Representació esquemàtica del vector pGEM-Easy Vector.....	116
- 14- Representació esquemàtica del vector pBluescript II KS.....	117
- 15- Esquema de les construccions realitzades.....	119

- 16- Esquema de les diferents construccions transfectades ..... 124
- 17- Anàlisi comparativa en l'aminoàcid 413 del FVII .....148
- 18- Haplotips obtinguts en la mostra GAIT..... 149