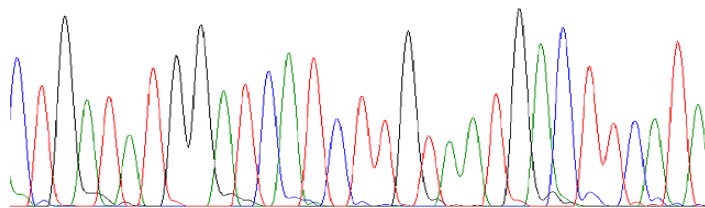


**IDENTIFICACIÓ DELS FACTORS GENÈTICS QUE
DETERMINEN LA VARIABILITAT DELS NIVELLS
DE FVII A LA POBLACIÓ ESPANYOLA**

Resultats del Projecte GAIT



**MARIA SABATER LLEAL
2006**

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

RESULTATS

Capítol 1: Identificació dels determinants genètics dels nivells de FVII

L'estudi de la variabilitat dels *loci* associats a malalties complexes és molt interessant a l'hora d'avaluar l'efecte de la variació genètica interindividual sobre fenòmens tan rellevants com són la diferent susceptibilitat de patir malalties complexes comunes en la població o la diferent resposta a determinats fàrmacs.

Aquest primer capítol presenta dos treballs que mostren l'anàlisi genètica exhaustiva realitzada com a part del Projecte GAIT per tal d'identificar la variabilitat genètica que determina els nivells de FVII en població espanyola. Aquesta, inclou la reseqüenciació completa del gen en 40 individus de la mostra GAIT i la posterior genotipació de les variants trobades al total de la mostra (398 individus). Com a resultat d'aquesta anàlisi, es va sotmetre una seqüència consens del gen *F7* (amb diferències respecte la seqüència prèviament publicada) i es van localitzar 49 posicions polimòrfiques al llarg del gen *F7*, majoritàriament canvis d'una sola base (SNPs) dels quals només dos provocaven un canvi d'aminoàcid.

En el primer dels treballs, es mostra principalment el resultat de l'anàlisi global del genoma realitzat amb 363 marcadors polimòrfics localitzats de forma dispersa al llarg de tot el genoma, on s'observa un clar senyal de lligament genètic en la zona cromosòmica 13q, just on es localitza el gen estructural del FVII (*F7*).

A més, es mostren els resultats de la reseqüenciació completa del gen, i l'anàlisi estadística realitzada (*Bayesian Quantitative Trait Nucleotide, BQTN*) en els 49 polimorfismes localitzats en el *F7* per tal d'estimar la probabilitat posterior de que aquests tinguin un efecte sobre els nivells de la proteïna (FVII). Com a resultat d'aquesta anàlisi s'obtenen dues variants al·lèliques individuals amb una forta probabilitat d'afectar els nivells de FVII, i dos blocs de lligament (amb 5 i 7 variants al·lèliques respectivament) també amb molta probabilitat de ser funcionals.

Finalment, en el treball es mostra com la incorporació en el model de lligament de les variants funcionals trobades com a variables controlades, redueix el senyal de lligament a pràcticament zero, indicant així que aquestes variants al·lèliques capturen pràcticament tot l'efecte funcional sobre els nivells de proteïna.

En el segon dels treballs, es presenten les freqüències al·lèliques d'aquests polimorfismes i els patrons de desequilibri de lligament entre ells on s'observa que, de manera molt interessant, aquest no es correlaciona amb la distància genètica, sinó que més aviat presenta una distribució aleatòria al llarg del gen *F7*. A més, es presenten també les freqüències dels haplotips i la correlació entre aquests i cada un dels polimorfismes, anàlisi que indica que molt pocs dels haplotips en la nostra mostra es poden definir per un sol *tag* SNP.

D'altra banda, el treball presenta els resultats d'una cerca *in silico* on es mostra la comparació de seqüències proteiques entre diferents espècies en les dues variants que causen un canvi d'aminoàcid. El grau de conservació de cada una de les variants al llarg de l'evolució és molt indicativa de rellevància de la variant en la funcionalitat de la proteïna.

Finalment, el treball detalla l'estratègia utilitzada per la seqüenciació completa del gen *F7*, així com per la genotipació de les variants al·lèliques trobades.

Així doncs, en aquests treballs es presenta l'estratègia i els resultats de l'anàlisi genètica que ha permès la identificació de totes les variants funcionals del gen *F7* responsables de la variació en els nivells d'aquesta proteïna.

http://muse.jhu.edu/cgi-bin/access.cgi?url=/journals/human_biology/v077/77.5soria.pdf

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

<http://www.blackwell-synergy.com/doi/abs/10.1111/j.1399-0004.2006.00608.x>

1.2- M Sabater-Lleal, L Almasy, E Martínez-Marchán, E Martínez-Sánchez, 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): 420-28

Capítol 2: Estudi de l'evolució del gen: com s'ha generat la variabilitat genètica en el *F7*?

Un cop localitzada tota la variabilitat genètica del *F7*, en el següent treball es mostra l'organització haplotípica de la variació en la seqüència del *F7* entre els individus de la mostra GAIT, així com l'estudi de les forces evolutives que han produït i mantingut aquesta variabilitat.

Un dels primers resultats interessants que es mostren en aquest treball és l'estructura filogenètica intraespecífica, que s'organitza en tres clars llinatges d'haplotips diferents que s'han mantingut paral·lelament al llarg de l'evolució. A més, l'excés de polimorfisme de freqüències intermèdies que es desprèn de l'anàlisi, indica que existeix una selecció equilibradora que ha mantingut en els humans els tres llinatges, molt probablement degut a un avantatge dels heterozigots.

A continuació, en aquest treball es mostra un estudi d'associació entre cada un dels tres grups d'haplotips i els nivells de FVII plasmàtics, on s'observa que un dels grups està clarament associat amb nivells elevats de FVII mentre que un altre grup està clarament associat amb nivells reduïts de FVII. El tercer grup no provoca cap efecte sobre els nivells d'aquesta proteïna. Aquests grups, a més, coincideixen amb els blocs de lligament funcionals resultat de l'anàlisi estadística bayesiana (capítol 1).

D'altra banda, i fruit de la comparació de la seqüència consens dels humans amb les seqüències obtingudes de quatre espècies de primats, s'observa un nombre de substitucions aminoacídiques molt inferior de l'esperada sota un model neutral, tal i com s'ha vist per una gran quantitat de gens. Aquest gran nivell de conservació de la seqüència en l'evolució estaria imposat per la important funció de la proteïna, imprescindible per a la iniciació de la cascada de la coagulació.

Així doncs, en aquest treball es mostra un clar exemple de com, actuant a través d'una selecció equilibradora, el fenotip ha modelat la distribució haplotípica del gen *F7* en la població. Per primera vegada s'estableix una relació clara entre l'estructura filogenètica i la variabilitat fenotípica d'un caràcter implicat en una malaltia complexa.

[http://www.springerlink.com/\(vyujh155o21hmnvfk3dlczfk\)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,9,15;journal,7,510;linkingpublicationresults,1:100421,1](http://www.springerlink.com/(vyujh155o21hmnvfk3dlczfk)/app/home/contribution.asp?referrer=parent&backto=issue,9,15;journal,7,510;linkingpublicationresults,1:100421,1)

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

Capítol 3: Estudis funcionals dels polimorfismes del promotor del *F7*

En el primer capítol d'aquests resultats, es conclou que existeixen dos grans blocs de lligament en el gen *F7* amb una probabilitat molt elevada de ser funcionals, un responsable d'un augment significatiu dels nivells de FVII plasmàtics, i un responsable de la seva reducció. Aquests blocs de lligament, inclouen majoritàriament polimorfismes localitzats a la zona promotora del gen. Així, els polimorfismes localitzats a les posicions [-670, -630, -402] s'associen als nivells elevats de proteïna, i els polimorfismes localitzats a les posicions [-2989, -401, -323, -122] s'associen als nivells reduïts.

No obstant, degut al gran desequilibri de lligament existent entre les variants compreses dins de cada bloc, és impossible esbrinar estadísticament quina de les variants és la que realment està causant un efecte sobre els nivells de la proteïna. Per això calen estudis funcionals *in vitro* que, tractant cada variant separatament, analitzin la diferent expressió de cada una en un entorn genètic controlat.

Aquest treball mostra els resultats dels estudis d'expressió dels polimorfismes del promotor del *F7*. D'acord amb aquests resultats, les variants al·lèliques -323ins10 i -122C tenen ambdues un fort efecte reductor dels nivells de proteïna en plasma, ja sigui individualment o en combinació amb d'altres polimorfismes del promotor. D'altra banda, la variant al·lèlica -402A provoca un augment significatiu dels nivells de FVII. Finalment, la variant -2989A, identificada per primera vegada en aquest estudi, incrementa també de forma molt significativa els nivells d'expressió de proteïna. No obstant, quan aquesta variant es troba en combinació amb la inserció -323ins10, el seu efecte queda totalment eclipsat. Aquest fenomen és important perquè aquestes dues variants es troben en el mateix bloc de lligament, la qual cosa significa que, almenys en la nostra població, ambdues variants sempre es trobaran juntes, i per tant l'efecte de la variant -2989A no podrà ésser detectada en estudis d'associació en la nostra població.

Així doncs, aquest treball mostra la identificació de les variants al·lèliques realment responsables de la diferent expressió de *F7* dels diferents haplotips localitzats en població espanyola, i estableix les bases per poder realitzar estudis d'associació en altres poblacions, no amb polimorfismes triats aleatòriament al llarg del gen susceptibles de donar resultats totalment contradictoris, sinó amb els polimorfismes realment responsables de les variacions en els nivells de FVII.

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).

Capítol 4: Relació dels polimorfismes del gen *F7* (genotips) amb els nivells de FVII i la malaltia cardiovascular (fenotips)

Aquest treball culmina els resultats obtinguts de la seqüenciació del gen *F7* com a part del Projecte GAIT. Fruit dels resultats obtinguts en els treballs presentats als capítols 2 i 3, es va descriure que els polimorfismes del gen *F7* es troben organitzats en tres grans grups d'haplotips (haplogrups). D'aquests, l'haplogrup definit per les variants al·lèliques [-670C, -630G, -402A, 700C, 707A i 712G], estava clarament associat a nivells elevats de FVII, mentre que un altre haplogrup, definit per les variants al·lèliques [-2989A, -401T, -122C, 73A, 835C, 4015A, 6441T, 7147C, 7460G, 7718A, i 7869T], estava clarament associat amb nivells reduïts d'aquesta proteïna.

Per tal de confirmar aquesta associació en una altra mostra, i per esbrinar l'efecte d'aquests polimorfismes sobre el risc trombòtic, aquest treball presenta els resultats d'un estudi cas-control que inclou 305 pacients espanyols amb història clínica de trombosi venosa i 305 individus espanyols aparentment sans. En tots ells, es genotipa un *tag* SNP per cada haplotip, triat en funció dels resultats obtinguts en el treball presentat en el capítol 3 d'aquesta tesi, on s'obtenen els polimorfismes funcionals de cada haplogrup (concretament els polimorfismes -402G/A i -323ins0/10). En tots els individus, s'analitzen també els nivells de FVII.

Els resultats obtinguts en aquest treball confirmen les associacions observades anteriorment en la mostra GAIT entre els haplotips del *F7* i els nivells de proteïna, tot i que no s'obté una associació significativa entre aquests haplotips i el risc de trombosi venosa.

Molt probablement, aquest resultat negatiu es pot explicar per un tamany de mostra massa petit que no és capaç de detectar l'efecte genètic de la variabilitat del *F7* en un fenotip complex com és la malaltia tromboembòlica.

4.1- M. Sabater-Lleal, I Tirado, A Buil, J Fontcuberta, JM Soria. Association Analysis of *F7* Gene Promoter Polymorphisms and Thrombotic Risk in a Spanish Population (Article en preparació).

Capítol 5: Deficiència de FVII

Aquest darrer treball presenta l'estudi de dues pacients clínicament asimptomàtiques, però amb deficiència greu de FVII. La deficiència greu de FVII és una malaltia fins ara considerada autosòmica recessiva, que es caracteritza per uns nivells de proteïna en plasma inferiors al 2% dels valors normals i que presenta una enorme variabilitat en la simptomatologia clínica. Mentre que en alguns pacients provoca greus hemorràgies, altres es mantenen asimptomàtics.

Com a resultat de l'anàlisi genètica en aquestes pacients i les seves famílies, es van detectar les mutacions responsables de la deficiència de FVII. A més, dada molt més interessant, en l'anàlisi genètica realitzada en tots els membres d'ambdues famílies es van detectar 23 altres polimorfismes freqüents en la població i que podrien tenir un paper crucial a l'hora d'explicar l'enorme variabilitat fenotípica present en individus portadors de la mateixa mutació rara.

A partir d'aquestes observacions, es conclou que, tot i que les mutacions rares són les responsables d'una reducció dràstica en els nivells de proteïna, els polimorfismes comuns detectats en les famílies actuarien modulant els nivells finals i causant les diferències observades entre individus portadors de la mateixa mutació rara. A més, altres polimorfismes que actuen conjuntament amb els factors ambientals, contribuirien a la variació en l'expressivitat clínica de la malaltia determinant des dels fenotips més greus fins als fenotips asimptomàtics.

Per tant, tot i que la malaltia ha estat fins ara considerada autosòmica recessiva, els resultats d'aquest treball indiquen que són múltiples factors genètics, probablement en combinació amb factors ambientals, els que determinen els nivells de FVII, i en última instància, l'expressivitat clínica de la deficiència. Per tant, es proposa que la deficiència de FVII sigui considerada una malaltia complexa, resultat de la interacció entre múltiples factors genètics i ambientals.

<http://www.haematologica.org/journal/2003/88906.pdf>

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), 906-91