



UNIVERSITAT DE BARCELONA

Gens i migranya

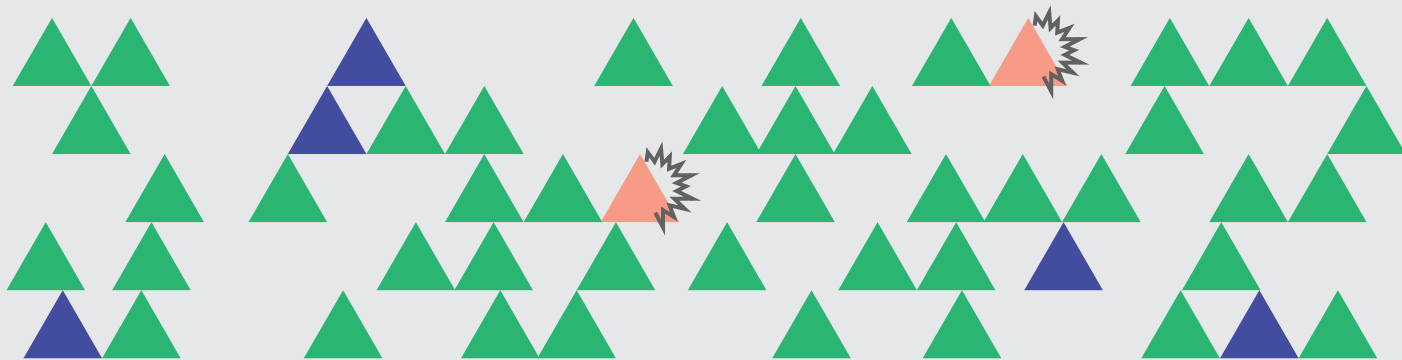
Anàlisi mutacional i estudis d'associació en pacients

Cèlia Sintas Vives

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

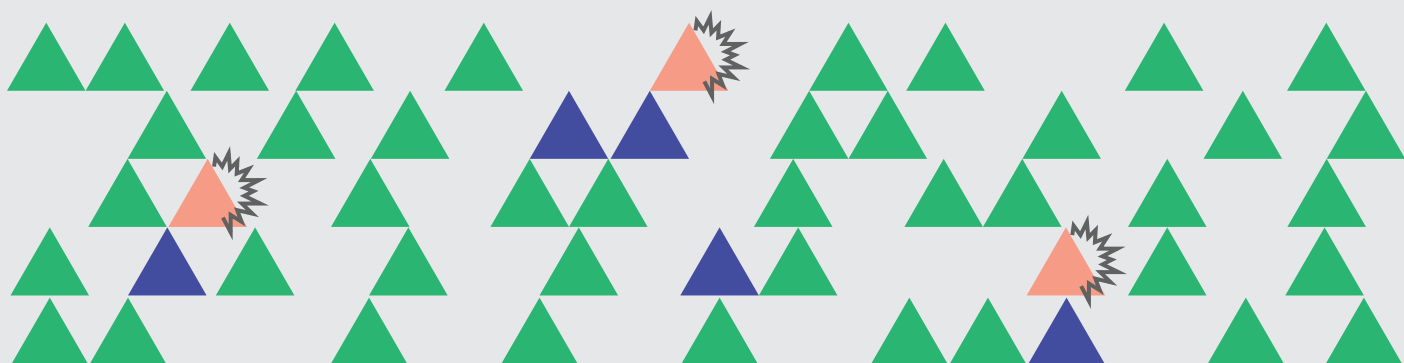
WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



GENS I MIGRANYA

Anàlisi mutacional i estudis d'associació

Cèlia Sintas Vives



GENS I MIGRANYA

Anàlisi mutacional i estudis d'associació

Memòria presentada per

Cèlia Sintas Vives

Per optar al grau de

Doctora per la Universitat de Barcelona

Programa de Genètica

Departament de Genètica

2014-15

Tesi dirigida pel **Dr. Bru Cormand Rifà** al

Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona

Dr. Bru Cormand Rifà

Cèlia Sintas Vives

Barcelona 2015

RESUM

La migranya és un trastorn neurològic comú que afecta un 15% de la població. Es caracteritza per l'aparició d'episodis de cefalees recurrents i incapacitants, molt sovint acompanyades d'altres símptomes com la sensibilitat a la llum, les nàusees o els vòmits. La seva prevalença és variable en funció de l'edat i el sexe, essent fins a tres vegades més freqüent en dones en etapa adolescent o adulta. Clínicament, la migranya es classifica en dos subtipus, migranya sense aura i migranya amb aura, aquesta última caracteritzada per l'aparició de símptomes neurològics que precedeixen i/o acompanyen la cefalea.

La migranya comuna té una etiologia complexa, en què participen factors genètics, encara poc coneguts, i ambientals. Hi ha, però, una forma rara monogènica del trastorn, la migranya amb aura hemiplègica, de la qual ja s'han resolt molts casos amb gens i mutacions descrites, i que per tant constitueix un bon punt de partida per abordar l'estudi de la migranya comuna.

En aquest treball hem aprofundit en els aspectes genètics de les formes rara i comuna de migranya, en pacients amb i sense aura. S'han dut a terme cribratges mutacionals, basats en seqüenciació i anàlisi de CNVs, en pacients amb migranya hemiplègica o altres trastorns paroxístmics relacionats, tot identificant diverses mutacions causals. D'altra banda, s'han realitzat estudis d'associació a escala genòmica i amb gens candidats amb l'objectiu de detectar variants de susceptibilitat a la migranya comuna. Entre les dianes dels nostres estudis hi ha els microRNAs, molècules reguladores de l'expressió gènica que no havien estat avaluades fins ara en pacients migranyosos. En últim terme, es presenten els resultats preliminars d'un estudi de transcriptòmica en un model animal de depressió cortical propagant.

ÍNDIX

INTRODUCCIÓ	3
1. GENERALITATS	3
1.1. CLÍNICA	3
1.2. DIAGNÒSTIC	3
1.2.1. Migranya sense aura (MO)	4
1.2.2. Migranya amb aura (MA)	5
1.2.3. Comorbiditats	6
1.3. TRACTAMENT	7
1.3.1. Tractament agut	7
1.3.2. Tractament profilàctic	7
1.4. EPIDEMIOLOGIA	8
1.5. IMPACTE SOCIOECONÒMIC	9
2. FISIOPATOLOGIA	10
2.1. FASES DE LA CRISI MIGRANYOSA	10
2.2. TEORIES VASCULAR I NEURONAL	10
2.3. L'AURA I LA DEPRESSIÓ CORTICAL PROPAGANT	11
2.4. CSD I ACTIVACIÓ DEL SISTEMA TRIGEMINOVASCULAR	13
3. MIGRANYA I GENÈTICA	15
3.1. FORMES MONOGÈNIQUES DE MIGRANYA: LA MIGRANYA HEMIPLÈGICA	15
3.1.1. Principals gens responsables de la migranya hemiplègica	16
3.1.2. Gens responsables d'altres fenotips amb migranya hemiplègica	18
3.1.3. CACNA1A i heterogeneïtat clínica	19
3.2. FORMES COMUNES DE MIGRANYA	21
3.2.1. Estudis d'associació amb gens candidats (Candidate gene association studies, CGAS)	22
3.2.2. Estudis d'associació a escala genòmica (Genome-wide association studies, GWAS)	24
3.2.3. Noves perspectives: Els microRNAs com a elements reguladors	26
4. MODELS ANIMALS EN MIGRANYA	29
OBJECTIUS	33
RESULTATS	41
CAPÍTOL 1. Estudi genètic de pacients amb formes rares de migranya i fenotips relacionats.	41
Article 1	41
Article 2	61
CAPÍTOL 2. Estudi genètic de la migranya comuna: estudis d'associació cas-control	83
Article 3	83
Article 4	91
Article 5	117
Article 6	129

DISCUSSIÓ	153
CAPÍTOL 1. Estudi genètic de pacients amb formes rares de migranya i fenotips relacionats ..	153
1. Anàlisi mutacional del gens <i>CACNA1A</i> i <i>ATP1A2</i> en pacients HM.....	153
1.1. Cribratge mutacional del gen <i>CACNA1A</i>	153
1.1.1. Mutacions puntuals identificades en la mostra de 18 pacients HM.....	154
1.1.2. Ampliació del cribratge mutacional del gen <i>CACNA1A</i>	155
1.1.3. Estudi de CNVs en el gen <i>CACNA1A</i>	156
1.2. Cribratge mutacional del gen <i>ATP1A2</i>	156
1.3. El cribratge genètic en HM: altres gens candidats i regions no cobertes	157
2. Anàlisi mutacional del gen <i>CACNA1A</i> en 49 pacients amb EA2.....	160
2.1. Anàlisi mutacional del gen <i>CACNA1A</i> per seqüenciació	160
2.1.1. Mutacions sense sentit	161
2.1.2. Mutacions de canvi de sentit	162
2.2. Anàlisi quantitativa del gen <i>CACNA1A</i>	163
2.2.1. MLPA vs. QMPSF.....	163
2.2.2. Deleció de l'exó 35 en un pacient.....	164
2.3. Efectes a nivell cel·lular: Haploinsuficiència vs. dominància negativa.....	165
2.4. Heterogeneïtat genètica no al·lèlica en EA2.....	166
3. Correlacions genotip-fenotip no resoltes	167
CAPÍTOL 2. Estudi genètic de la migranya comuna: estudis d'associació cas-control	168
1. La migranya comuna.....	168
1.1. Consideracions clíniques i genètiques.....	168
1.2. El diagnòstic oficial de l'IHS-ICHD	169
1.3. Homogeneïtat i heterogeneïtat fenotípica en la malaltia complexa	169
2. Els estudis d'associació cas-control	171
2.1. Objectiu dels estudis d'associació	171
2.2. Consideracions generals sobre els estudis d'associació	171
3. Estudis d'associació en migranya	173
3.1. Estudis d'associació a gran escala: GWAS	173
3.1.1. Primer GWAS en migranya i estudi de rèplica	173
3.1.2. Altres GWAS en migranya.....	175
3.1.3. Estudi de rèplica en pacients amb migranya amb aura.....	179
3.1.4. Els GWAS com a eina per a la identificació de nous <i>loci</i> candidats.....	180
3.2. Regions reguladores: estudi d'associació amb gens candidats (CGAS).....	182
3.2.1. Disseny de l'estudi.....	183
3.2.2. miRNAs relacionats amb gens de glutamat.....	184
3.2.3. Estudi de descoberta i de rèplica.....	184
3.2.4. Limitacions del disseny i interpretació dels resultats	185
CONCLUSIONS	189
BIBLIOGRAFIA	195
APÈNDIX 1. TRANSCRIPTÒMICA EN UN MODEL ANIMAL DE CSD	215

1. DISSENY EXPERIMENTAL I METODOLOGIA	215
1.1. Model animal i obtenció de mostres.....	215
1.2. Anàlisi de <i>microarrays</i> i bioinformàtica.....	216
1.3. Validació.....	217
2. RESULTATS PRELIMINARS	218
2.1. Escorça dreta	218
2.2. Tronc encefàlic.....	219
2.3. Validació dels resultats	221
APÈNDIX 2. ALTRES COL·LABORACIONS.....	225

INTRODUCCIÓ

INTRODUCCIÓ

1. GENERALITATS

1.1. CLÍNICA

La migranya és un trastorn neurològic primari molt freqüent a la població general. S'estima que aproximadament un 15% de la població europea la pateix (Stovner & Andree 2010). És de caràcter episòdic i incapacitant, i es manifesta amb atacs de cefalea de tipus pulsatiu, unilateral, d'intensitat moderada a severa i que empitjora amb l'activitat física. Generalment els episodis van acompanyats d'altres factors com la fotofòbia, fonofòbia, nàusees i/o vòmits. La migranya s'accepta generalment com un trastorn d'etiologia complexa en què participen una combinació de factors ambientals i genètics de risc (Wessman et al. 2007), tot i que hi ha casos rars en què presenta una herència mendeliana (Stovner & Andree 2010). S'han identificat alguns desencadenants ambientals dels episodis migranyosos, que poden ser de naturalesa diversa, com ara químics, alimentaris, emocionals o climatològics (Kelman 2007). D'altra banda, els estudis de bessons i d'agregació familiar donen suport a la participació de factors genètics de susceptibilitat (Mulder et al. 2003, Ulrich et al. 1999).

1.2. DIAGNÒSTIC

El diagnòstic clínic de la migranya està basat, a falta de marcadors biològics i per la seva naturalesa episòdica, en criteris subjectius que depenen de les impressions del propi pacient. Això fa difícil en gran mesura l'obtenció d'un diagnòstic acurat (Loder & Rizzoli 2006, Wessman et al. 2007).

És per això que es van establir criteris de classificació i diagnòstics universals, la primera edició dels quals fou publicada l'any 1988 per la *International Headache Society* (IHS), i es van recollir a la *International Classification of Headache Disorders* (ICHD-I) (International Headache Society (IHS) 1988). L'any 2004 van ser revisats i actualitzats, donant lloc a la segona edició (ICHD-II) (International Headache Society (IHS) 2004), que ha estat l'emprada en aquesta Tesi (Taula 1). La migranya s'inclou en l'apartat de cefalees primàries. Actualment s'està elaborant una segona revisió (ICHD-III), que encara està en fase beta (Headache Classification Committee of the International Headache 2013).

En termes generals, la migranya es pot dividir en dos subtipus principals: migranya sense aura (MO), caracteritzada pels episodis de cefalea i simptomatologia associada, i la migranya amb aura (MA), en què apareixen, a més de la cefalea, quadres focals neurològics que la precedeixen o acompanyen.

Una altra classificació utilitzada en algunes ocasions és l'anàlisi de classes latents (LCA), un mètode estadístic per identificar subgrups de pacients a partir de dades categòriques multivariades. Aquest s'aplica a les dades simptomatològiques de les cefalles per obtenir grups ordenats segons la severitat (Nyholt et al. 2004).

Taula 1. Classificació de la migranya segons l'ICHD-II (ISH 2004)

CEFALEES PRIMÀRIES
1. MIGRANYA
1.1. Migranya sense aura
1.2. Migranya amb aura
1.2.1. Aura típica amb cefalea de tipus migranyós
1.2.2. Aura típica amb cefalea no migranyosa
1.2.3. Aura típica sense cefalea
1.2.4. Migranya hemiplègica familiar
1.2.5. Migranya hemiplègica esporàdica
1.2.6. Migranya de tipus basilar
1.3. Síndromes periòdiques de la infància
1.3.1. Vòmits clínics
1.3.2. Migranya abdominal
1.3.3. Vertigen paroxíctic benigne de la infància
1.4. Migranya retiniana
1.5. Complicacions de la migranya
1.5.1. Migranya crònica
1.5.2. Estatus migranyós
1.5.3. Aura persistent sense infart
1.5.4. Infart migranyós
1.5.5. Crisis comicials desencadenades per migranya

1.2.1. Migranya sense aura (MO)

La migranya sense aura (MO, 1.1 ICHD-II) es defineix com un trastorn consistent en cefalees recurrents que es manifesten en atacs de 4-72 hores de durada. Les característiques típiques dels mals de cap són la localització unilateral, qualitat pulsativa, intensitat moderada o severa, empitjorament amb activitat física rutinària i l'associació amb nàusees i/o fotofòbia i fonofòbia (International Headache Society (IHS) 2004). És el subtipus migranyós més freqüent entre els pacients i aquests presenten un major nombre d'atacs, així com més severitat dels episodis (Russell et al. 1995). Els criteris diagnòstics de la migranya sense aura es recullen a la taula 2. Hi ha, a més, algunes variacions per al diagnòstic dels casos infantils, que presenten una durada dels atacs i característiques de la cefalea diferents (com ara la possibilitat d'episodis inferiors a dues hores o dolor bilateral) (International Headache Society (IHS) 2004).

Taula 2. Criteris diagnòstics per a la migranya sense aura (MO)

MIGRANYA SENSE AURA
A. Un mínim de 5 crisis que compleixin els criteris B-D
B. Cefalea d'entre 4-72 hores de durada (no tractada o amb tractament ineficaç)
C. Cefalea que presenta un mínim de dues de les següents característiques: <ol style="list-style-type: none">1. Localització unilateral2. Qualitat pulsativa3. Intensitat moderada a severa4. Empitjora o fa evitar l'activitat física rutinària (ex. caminar, pujar escales)
D. Durant la cefalea es presenta com a mínim una de les següents característiques: <ol style="list-style-type: none">1. Nàusees i/vòmits2. Fotofòbia i fonofòbia
E. No atribuïble a cap altre trastorn

La MO sovint presenta una relació estricta amb el cicle menstrual, i és per això que la classificació contempla criteris annexos distintius per a la migranya menstrual pura (A1.1.1), la migranya relacionada amb la menstruació (A1.1.2) i migranya sense aura no relacionada amb la menstruació (A1.1.3), tot i que hi ha debat sobre si cal considerar les dues primeres entitats com a independents.

Aquells pacients que presenten una freqüència dels episodis >15 atacs/mes durant >3 mesos són diagnosticats alhora com a migranya crònica (1.5.1) sense abús de medicaments. En cas contrari se'ls diagnostica com a cefalea per abús de medicament (8.2), ja que la MO és un dels trastorns que es desencadena amb més freqüència com a conseqüència de la medicació simptomàtica) (International Headache Society (IHS) 2004).

1.2.2. Migranya amb aura (MA)

La migranya amb aura (MA) és un trastorn recurrent que es manifesta amb símptomes neurològics focals reversibles que generalment es desenvolupen de manera gradual al llarg de 5-20 minuts i duren menys de 60 minuts . La fase de cefalea amb característiques de MO apareix generalment després dels símptomes de l'aura. En alguns casos aquest mal de cap no presenta característiques migranyoses o és completament absent) (International Headache Society (IHS) 2004). Els criteris de diagnòstic per a la MA es detallen a la taula 3. La majoria de pacients amb migranya presenten atacs exclusivament sense aura. Aproximadament un terç dels pacients migranyosos són diagnosticats com a MA, tot i que molts d'ells també poden patir alguns atacs sense aura.

Taula 3. Criteris diagnòstics per a la migranya amb aura (MA) (IHS 2004).

MIGRANYA AMB AURA

- A. Un mínim de 2 crisis que compleixin el criteri B
- B. Aura migranyosa que compleixi els criteris B i C per un dels subtipus 1.2.1-1.2.6*
 - B. Aura caracteritzada per un mínim d'una de les següents característiques, sense dèficit motor:
 - 1. Síntomes visuals totalment reversibles que inclouen fenòmens positius (ex. llums pampalluguejants, punts o línies) i/o negatius (p.ex. pèrdua de visió)
 - 2. Síntomes sensorials totalment reversibles que inclouen fenòmens positius (ex. formigueig, parestèsies) i/o negatius (ex. pèrdua de sensibilitat)
 - 3. Trastorn del llenguatge totalment reversible
- C. Un mínim de dos dels següents punts:
 - 1. Síntomes visuals homònims i/o sensorials unilaterals
 - 2. Com a mínim un dels símptomes de l'aura es desenvolupa gradualment durant 5 minuts o més i/o diferents símptomes de l'aura tenen lloc en successions de 5 minuts o més
 - 3. Cada símptoma té una durada d'entre 5 i 60 minuts
- C. no atribuïble a cap altre trastorn

*Es detallen els criteris del subtipus 1.2.1 a la taula, corresponents a la migranya amb aura típica.

L'aura consisteix en un conjunt de símptomes neurològics que tenen lloc just abans o en el moment de l'aparició de l'episodi migranyós. La majoria de pacients MA presenten aura visual, tot i que també hi ha casos en què l'aura és sensorial o motora. Abans o simultàniament a l'aparició dels símptomes de l'aura, el flux sanguini cerebral local disminueix a la regió de l'escorça corresponent a l'àrea afectada i sovint inclou una zona més extensa. Aquesta reducció del flux sanguini s'inicia en regions posteriors i s'estén anteriorment. Passades d'una a diverses hores té lloc una transició gradual a hiperèmia a la mateixa regió. El fenomen conegut com a depressió cortical propagada (*Cortical Spreading Depression, CSD*), del qual parlarem a la secció de fisiopatologia de la migranya, està implicat en el desenvolupament de l'aura (Lauritzen 2001).

La MA inclou un subtipus rar de migranya, la migranya amb aura hemiplègica (HM), que classifica els pacients de forma separada si presenten dèficits motors durant els episodis. Es tracta d'una malaltia mendeliana autosòmica dominant, que pot presentar-se en famílies (1.2.4, ICHD-II) o de forma esporàdica (1.2.5, ICHD-II) (vegeu l'apartat 3.1).

1.2.3. Comorbiditats

La comorbiditat es defineix com la coexistència de dues malalties en un mateix individu de manera més freqüent del que hom esperaria per atzar. És important conèixer les comorbiditats per tal de determinar i adequar el tractament de cada pacient.

En diversos estudis poblacionals s'ha observat que hi ha comorbiditat entre la migranya i algunes malalties neurològiques i psiquiàtriques (ictus, epilèpsia, depressió i trastorn bipolar) i vasculars (infart i malalties cardiovasculars) (Bloudek et al. 2012, Jensen & Stovner 2008,

Sacco et al. 2006). A més, els pacients migranyosos presenten més freqüentment comorbiditat amb altres tipus de cefalees, com la tensional (*Tension-Type Headache*, TTH) (Russell 2005).

1.3. TRACTAMENT

Per establir un tractament adequat per a un pacient migranyós, el pas més crític és el diagnòstic clínic. Aquest haurà de ser acurat i tenir en compte la severitat i freqüència dels atacs, així com la simptomatologia associada i comorbiditat amb d'altres malalties que presenti el pacient. El tractament farmacològic de la migranya pot dividir-se en dos tipus principals: el tractament profilàctic, administrat diàriament amb l'objectiu de reduir la freqüència i la severitat de les crisis, i el tractament agut, per aturar els atacs (Goadsby et al. 2002, Rapoport 2008).

1.3.1. Tractament agut

El tractament agut té com a objectiu aturar la crisi migranyosa quan aquesta ja ha començat. Està indicat per a cada episodi que pateix el pacient, tot i que si se superen els 10-15 dies de tractament al mes, un tractament profilàctic està més indicat.

Pot fer-se una distinció entre fàrmacs no específics (analgèsics i antiinflamatoris no esteroïdeus (AINEs)) i específics per a la migranya (com els triptans i els ergots) (Rapoport 2008).

Els triptans són els fàrmacs específics més efectius que es coneixen per a la migranya. Són agonistes selectius dels receptors de serotonina 1B i 1D. L'activació dels receptors 1B provoca la constricció de les artèries de les meninges, mentre que l'activació dels receptors D1 en els nervis sensorials trigèmics centrals i perifèrics inhibeix la transmissió nociceptiva i l'alliberament de neurotransmissors (Goadsby et al. 2002, Kalra & Elliott 2007, Rapoport 2008). Els ergots, a diferència dels triptans, presenten un efecte no selectiu a nivell de receptors, produint l'aparició de múltiples efectes secundaris derivats de la seva administració. És per això que només s'administren en aquells casos en què els triptans són ineficaços (Kalra & Elliott 2007, Rapoport 2008).

1.3.2. Tractament profilàctic

Aquest tipus de tractament té com a objectiu reduir la freqüència de les crisis migranyoses, així com la seva durada i severitat. El mecanisme d'acció dels fàrmacs profilàctics consisteix, en general, en la reducció de l'excitabilitat cortical (gupta 2007). Hi ha diversos tractament preventius, entre els quals destaca l'ús de β -bloquejants, els antidepressius o els antiepilèptics (Goadsby et al. 2002, Rapoport 2008).

1.4. EPIDEMIOLOGIA

Els estudis epidemiològics en migranya han patit l'absència de criteris diagnòstics ben definit durant molts anys, un factor que ha anat millorant amb el temps gràcies a la classificació oficial de l'ICHD-II, d'aplicació universal actualment. No obstant, la manca de marcadors biològics diagnòstics continua essent una dificultat afegida, de manera que en general aquest tipus de trastorn està subestimat (Russell 2007). A Europa, però, la migranya és el trastorn neurològic del cervell més prevalent a la població i s'estima que un 15% de la població la pateix (Figura 1) (Jensen & Stovner 2008, Vos et al. 2012).

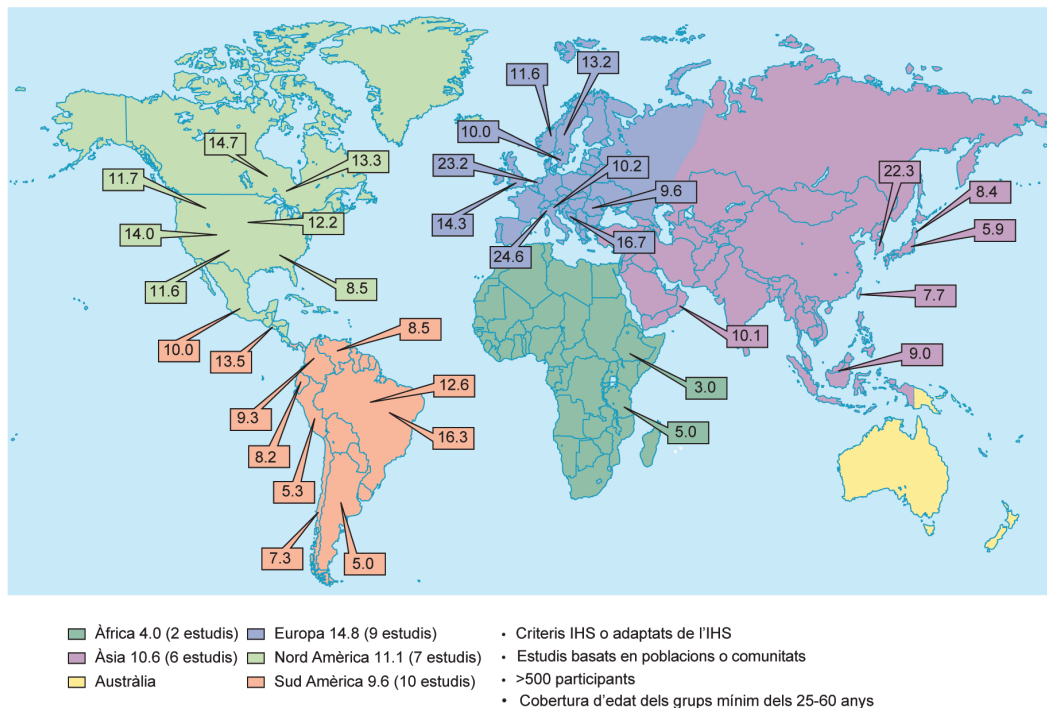


Figura 1. Estudis de prevalença anual de la migranya en adults. Adaptada de (Jensen & Stovner 2008).

La distribució de la migranya a la població varia en funció de l'edat i el sexe dels individus. S'estima que la seva prevalença en homes és de l'11% i en dones arriba al 19% (Vos et al. 2012). Per ambdós sexes, el pic més elevat de prevalença s'assoleix al voltant dels 35 anys, essent més elevat en les dones, especialment durant els anys de menarquia (25%, mentre que en homes està al voltant del 10%). A diferència de la prevalença en l'edat adulta, durant la infància no s'observen gaire diferències entre els dos sexes, i s'observa una davallada en les darreres dècades de vida, tot i que en aquest cas la prevalença entre les dones segueix essent més alta. És al voltant dels 40 anys quan s'observa el desequilibri màxim, establint-se una relació d'afectats home:dona de 1:3 (Figura 2) (Gupta et al. 2007, Lipton & Bigal 2005).

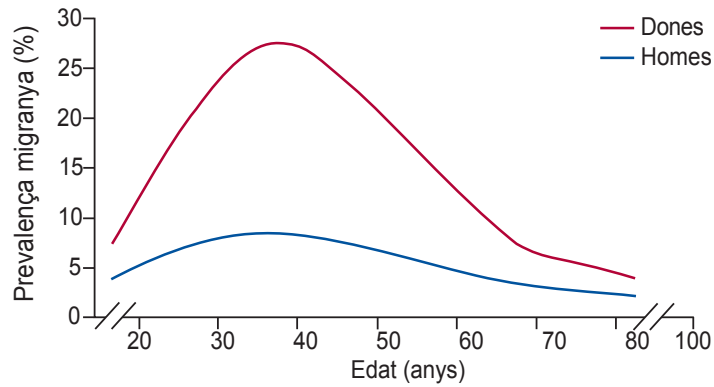


Figura 2. Distribució de la prevalença anual per sexes de migranya a la població. Adaptada de (Ferrari et al. 2015).

1.5. IMPACTE SOCIOECONÒMIC

La darrera enquesta realitzada per l'Organització Mundial de la Salut l'any 2010 situa la migranya com la tercera malaltia més prevalent i la vuitena causa de discapacitat a nivell global (Vos et al. 2012). A l'hora d'avaluar l'impacte econòmic d'un trastorn es consideren els costos directes (prevenció, diagnòstic i tractament) i indirectes (conseqüències a nivell de reducció de productivitat i absentisme laboral), així com aquells que són intangibles (com ara el dolor i l'alteració de les activitats quotidianes que pateixen els pacients). Essent la migranya un trastorn amb una elevada prevalença, s'estima que l'impacte econòmic a Europa representa el cost més elevat per a malalties neurològiques a Europa (Figura 3) (Linde et al. 2012). A nivell social, la migranya afecta sobretot la qualitat de vida dels pacients, tant en les seves activitats socials rutinàries com en la seva vida laboral.

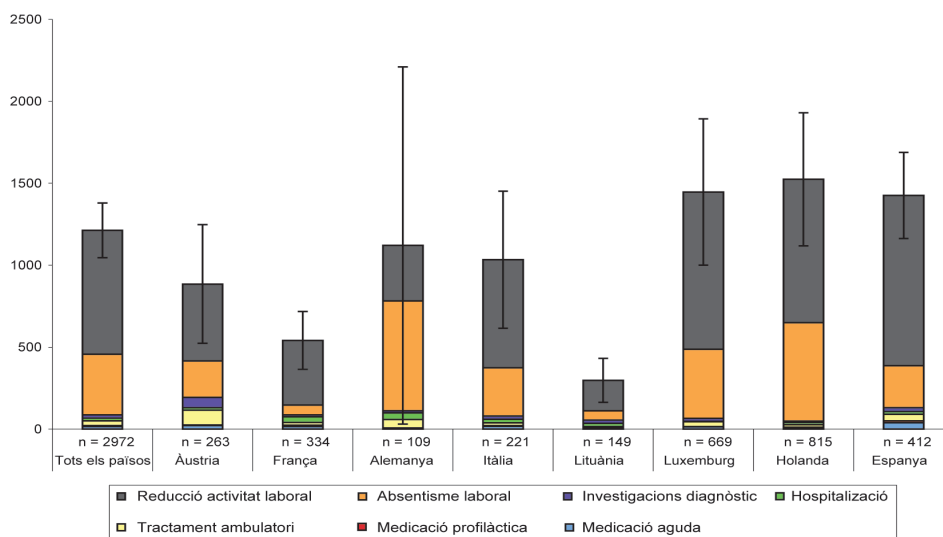


Figura 3. Costos anuals directes i indirectes de la migranya per persona en països europeus, representats amb un interval de confiança del 95%. Adaptada de (Linde et al. 2012).

2. FISIOPATOLOGIA

2.1. FASES DE LA CRISI MIGRANYOSA

Una crisi de migranya típica consta de cinc fases: 1) Pròdrom, que té lloc des d'hores fins a dos dies abans de l'atac. Consisteix en un conjunt de símptomes premonitoris que es manifesten amb fatiga, rigidesa cervical, dificultat per concentrar-se, visió borrosa i un augment de la sensibilitat a la llum i al soroll, entre d'altres; 2) Aura (present en pacients MA), que acostuma a precedir i/o acompanyar la cefalea i durant la qual els pacients poden presentar anorèxia o nàusees; 3) Cefalea, acompanyada de símptomes associats com ara la fotofòbia, fonofòbia, nàusees i/o vòmits i agreujament amb l'activitat física; 4) Resolució, quan comencen a remetre els símptomes i els pacients generalment poden resoldre l'episodi mentre dormen; 5) Recuperació o postdròmica, fase durant la qual els pacients encara poden experimentar fatiga, dificultats cognitives i debilitat (Figura 4) (Charles 2013, Kelman 2004, Kelman 2006).

Un episodi migranyós, doncs, pot arribar a durar fins a tres dies en alguns pacients. Una possible explicació és un llindar més baix de sensibilitat sensorial en els pacients, cosa que explicaria la descripció que donen molts d'ells dels desencadenants dels episodis que pateixen, com ara l'exposició perllongada a la llum o als sorolls molt forts.

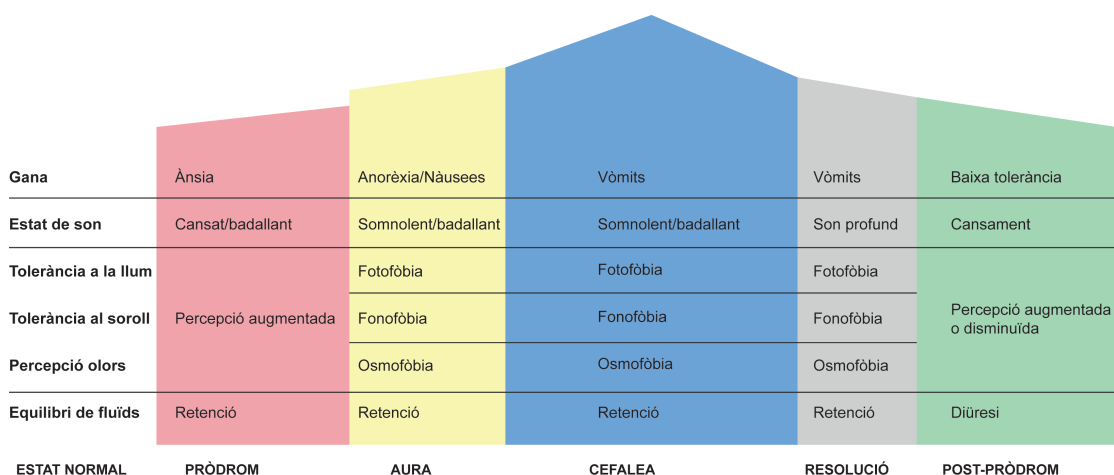


Figura 4. Fases de la crisi migranyosa i canvis que experimenta el pacient en cadascuna d'elles.

2.2. TEORIES VASCULAR I NEURONAL

Encara avui no hi ha una teoria capaç d'explicar tot el conjunt d'esdeveniments que tenen lloc durant un episodi de migranya, i la seva fisiopatologia roman força desconeguda.

Històricament s'han proposat dues teories independents per explicar l'etiologia de la migranya. La primera teoria que es va plantejar fou la **vascular**, introduïda per Thomas Willis

a finals del segle XVII, que proposava que el dolor migranyós era degut a la dilatació dels vasos cranials de les meninges (Grand 1999). Anys després es va suggerir que la migranya consistia en un esdeveniment vascular iniciat per la vasoconstricció intracranial seguida d'una vasodilatació (Eadie 2005). L'administració dels ergots com a vasoconstrictors per al tractament dels pacients migranyosos recolzava aquesta teoria, així com la inducció de la cefalea amb nitroglicerina, un vasodilatador potent (Baron & Tepper 2010, Spierings 2009). Més recentment, el paper del sistema vascular s'ha fet més evident gràcies a l'acció efectiva dels triptans i els agonistes del pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP), els efectes pal·liatius dels quals es donen a través de la vasoconstricció (Humphrey 2008). Recentment, però, els estudis d'(Amin et al. 2013) han mostrat com, tot i que la vasodilatació combinada amb l'alliberament de substàncies vasoactives són claus en la fisiopatologia de la migranya, la dilatació no és la causa de l'activació de les vies centrals i perifèriques del dolor. Tot i això, els esdeveniments de naturalesa vascular que tenen lloc durant els episodis de migranya són importants en el conjunt de mecanismes que tenen lloc durant l'atac.

L'alternativa a la teoria vascular és la **neuronal**. Posteriorment a la formulació de la teoria vascular, es proposà que l'origen de la migranya podria residir en una disfunció de les xarxes neuronals, en base al fet que els símptomes neurològics que apareixen durant l'aura no poden explicar-se únicament amb un model vascular de cefalea (Moskowitz 1984). Estudis posteriors han anat reforçant també aquesta teoria, que s'ha desenvolupat àmpliament (Nosedá & Burstein 2013, Parsons & Strijbos 2003). Aquesta sosté que l'origen del dolor migranyós està en l'activació del sistema trigeminovascular. La component principal seria el nervi trigèmin i les fibres nervioses que innerven els vasos sanguinis de les meninges i d'altres estructures del tronc encefàlic (Goadsby et al. 2009). L'alliberació de pèptids vasoactius, procedents dels axons trigeminovasculars, provocarien la inflamació i el dolor. Aquesta teoria proposa també una disfunció que desemboca en un estat d'hiperexcitabilitat cortical que explicaria el fenomen de la depressió cortical propagant (Pietrobon & Striessnig 2003).

Actualment ambdues teories coexisteixen, ja que encara no s'ha trobat una explicació de tots els mecanismes que desencadenen la migranya i tenen lloc durant l'episodi migranyós. És per això que hom pretén arribar a una teoria neurovascular, segons la qual la migranya seria el resultat d'una successió d'esdeveniments que donarien lloc a una disfunció neuronal amb una resposta del sistema vascular, que també estaria afectat (Gasparini et al. 2013).

2.3. L'AURA I LA DEPRESSIÓ CORTICAL PROPAGANT

La depressió cortical propagant (*Cortical Spreading Depression*, CSD) és una ona de despolarització de les neurones i la glia que progressa per l'escorça cerebral des de la regió occipital a la regió frontal (Figura 5). Aquesta està associada i va seguida d'una depressió de l'activitat neuronal durant la qual té lloc una pèrdua transitòria dels gradients iònics (Ca^{2+} , K^+ , Na^+) i provoca, en última instància, l'alliberament de neurotransmissors (Gasparini et al.

2013, Moskowitz 2007) . En pacients amb infart i dany cerebral s'ha descrit fenòmens similars (Charles 2013) .

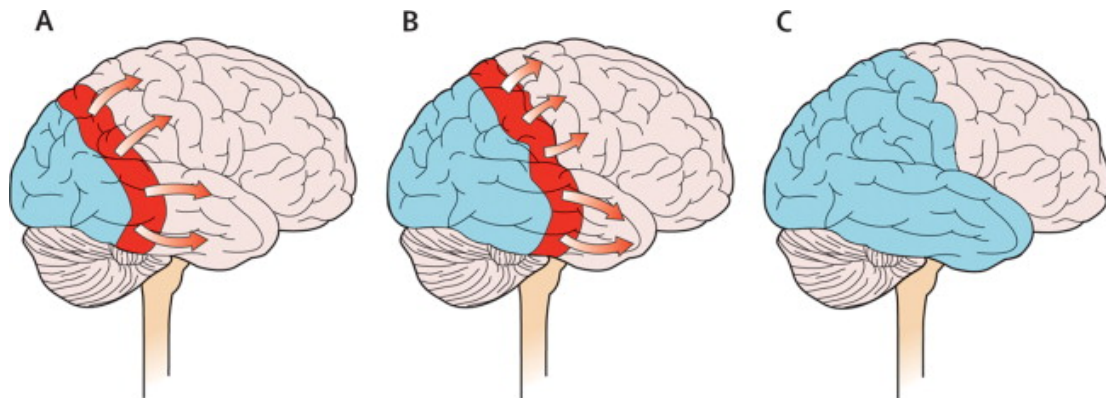


Figura 5. Representació del progrés de la depressió cortical propagant (Cortical Spreading Depression, CSD) per l'escorça cerebral.

Els possibles desencadenants de la CSD s'han estudiat àmpliament en models animals, incloent l'estimulació elèctrica o química (KCl, CaCl₂), o els agonistes de receptors de glutamat, entre d'altres. Típicament, l'esdeveniment inicial clau és l'elevació del K⁺ extracel·lular. L'ús d'agonistes del glutamat per a l'activació de la CSD, i l'ús d'antagonistes per a la seva inhibició, suggereixen que aquest neurotransmissor tindria també un paper clau en la iniciació de la CSD (Figura 6). La font de l'increment de K⁺ o de glutamat, però, es desconeix (Charles 2013, Lauritzen et al. 2011) .

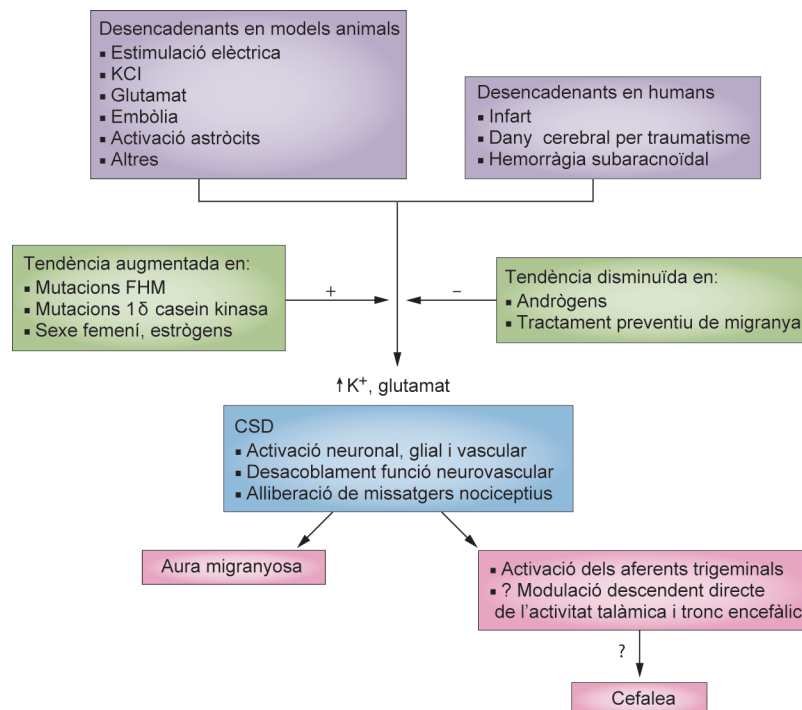


Figura 6. Depressió cortical propagant: factors de risc, desencadenants, mecanismes i conseqüències funcionals. Adaptada de (Charles 2013).

FHM: Migranya hemiplègica familiar (Familial Hemiplegic Migraine), CSD: Depressió cortical propagant (Cortical Spreading Depression).

Estudis en humans i en models animals mostren com la CSD, en propagar-se, deixa zones de l'escorça afectada amb un flux sanguini disminuït, i suggereixen que la CSD és el mecanisme subjacent a l'aura migranyosa (Cui et al. 2014). Les tècniques de neuroimatge emprades en estudis amb pacients migranyosos amb aura visual han corroborat aquesta teoria, ja que han permès observar una correlació espacial i temporal entre les fases de l'aura i l'activitat cortical i els canvis de flux sanguini a l'escorça (Hadjikhani et al. 2001). S'ha vist també que l'àrea del cervell fins on es propaga la CSD determina el tipus d'aura que experimenten els pacients. Així, si la despolarització avança fins la regió de l'escorça visual, sensorial o motora, el pacient experimenta el subtipus d'aura corresponent.

La CSD permet explicar de moment l'aparició de l'aura, però encara no s'ha pogut relacionar de forma consistent amb la fase de cefalea. Es creu que en pacients amb MO aquesta CSD podria tenir lloc en regions silents de l'escorça, i d'aquesta manera l'aura no arribaria a desenvolupar-se (Pietrobon & Striessnig 2003). Recentment s'ha presentat un model de CSD (Dahlem et al. 2013) en què es postula que la CSD no es propagaria indefinidament per tota l'escorça, sinó que hi hauria una retroalimentació inhibidora a nivell local que l'aturaria, tot fent una distinció entre una fase primerenca i una tardana, aquesta última deguda a la inhibició. D'altra banda, el model també fa referència a l'extensió i forma de la CSD, que podria determinar l'aparició d'una crisi de MO i de MA, essent l'última conseqüència d'una CSD major i de més durada.

2.4. CSD I ACTIVACIÓ DEL SISTEMA TRIGEMINOVASCULAR

El sistema trigeminovascular (*Trigeminovascular System*, TGVS) consta del nervi trigèmin i les fibres nervioses que innerven el vasos sanguinis intra- i extra- cranials de les meninges i del tronc encefàlic, i d'altres neurones que projecten cap al nucli caudal del trigèmin, situat al tronc encefàlic, que alhora projecta cap als centres de dolor (May & Goadsby 1999). Diversos estudis apunten que la CSD és el fenomen clau en l'activació del TGVS, la qual desembocaria en la cefalea (Iadecola 2002).

En models animals múrids s'ha vist que la CSD activa nociceptors de les meninges i de neurones trigeminovasculars. En un estudi recent de (Karatras et al. 2013) s'ha suggerit que la despolarització de la CSD i la sobreactivació dels receptors N-metil-D-aspartat (NMDA) de glutamat activen els canals neuronals *Pannexin 1*. Això provocaria una cascada inflamatòria que indueix l'alliberament sostingut de pèptids pro-inflamatoris, i aquests mantindrien l'estímul necessari per sensibilitzar i activar els aferents trigèmims. En resum, el TGVS s'activaria amb una resposta inflamatòria provocada per la CSD (Figura 7) (Ferrari et al. 2015).

El TGVS juga un paper integrador en la regulació del to vascular i la transmissió de senyals de dolor. Es creu que l'activació d'aquest sistema durant la fase de dolor de la migranya fa que s'iniciï una cascada d'activitat química des de les terminals nervioses sensorials trigèmimes (Arulmani et al. 2004, Goadsby et al. 2009). Aquests nervis acumulen diversos

neuropèptids vasoactius: substància P (SP), pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP), neurokinina A (NKA) i òxid nítric (NO), entre d'altres. L'alliberació d'aquests neuropèptids condueix a la inflamació i dilatació dels vasos, tot agreujant el dolor i provocant també una resposta inflamatòria a les estructures vasculares de les meninges (Gasparini et al. 2013) .

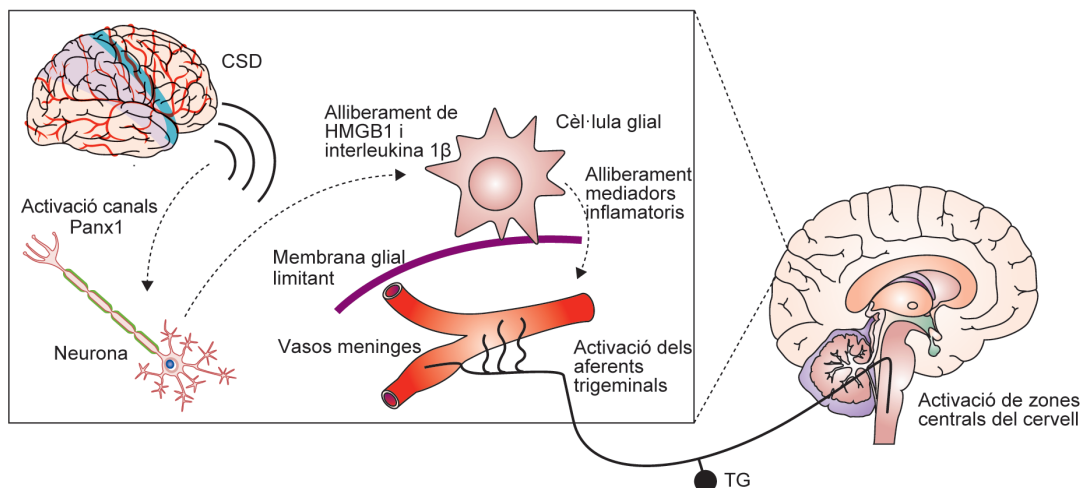


Figura 7. Activació del TGVS per la CSD. Els experiments en rates han mostrat que la CSD induïda podria activar en primer lloc els nociceptors que innerven les meninges i que es localitzen als ganglis trigèmins, així com neurones de segons ordre centrals trigeminovasculares. El lapse de temps fins a l'activació neuronal es correlacionaria amb el període que té lloc entre l'aura i els símptomes de la cefalea. Aquest procés d'activació molt probablement implica l'obertura dels canals Panx1 (Pannexin 1), que promouen l'alliberament de proteïnes HMGB1 (High-mobility group box-1) activant així astròcits veïns de la membrana glial limitant que envolta els vasos de les meninges, innervades al seu torn pel nervi trigèmin. Així doncs, la CSD podria no només causar l'aura migranyosa, sinó també desencadenar els mecanismes subjacents de la cefalea. Adaptada de (Ferrari et al. 2015).

CSD: Depressió cortical propagant (Cortical Spreading Depression); TGVS: Sistema trigeminovascular (TriGeminoVascular System); TG: gangli trigemin.

3. MIGRANYA I GENÈTICA

Els estudis poblacionals han demostrat que hi ha un gran nombre de pacients migranyosos amb història familiar positiva, especialment en parents de primer grau .

Una manera d'estimar la component genètica en la migranya són els estudis de bessons. Aquests han descrit una concordança major en bessons monozigòtics (MZ) que en dizigòtics (DZ) a les dues formes principals de migranya: MA (MZ 50%, DZ 21%) i MO (MZ 43%, DZ 31%) (Gervil et al. 1999, Ulrich et al. 1999). Estudis més recent han permès confirmar que la correlació entre bessons MZ (34-56%) és gairebé el doble que en DZ (12-28%). En conjunt han permès calcular una heretabilitat (és a dir, la proporció de la variància fenotípica deguda a factors genètics) per a la migranya d'entre el 34 i el 57% (Mulder et al. 2003).

D'altra banda, els estudis familiars i poblacionals permeten calcular el risc relatiu (RR) de patir la malaltia, que es defineix com la relació entre la probabilitat que un individu migranyós tingui un familiar afectat i la probabilitat que una persona presa a l'atzar de la població estigui afectada. La majoria d'estudis que s'han realitzat en migranya han permès establir que la probabilitat de la malaltia en familiars de primer grau d'un afectat és significativament més gran que en la població general. Per a un d'aquests estudis, en el cas de pacients amb MO el RR dels familiars és de 1,9 de patir MO i 1,4 de patir MA. Per a pacients MA, el RR dels familiars de presentar MA és de 3,8 i per MO no hi hauria un increment del risc (Russell & Olesen 1995) . Aquestes dades indicarien que la càrrega genètica de la MA podria ser superior a la de la MO.

És important tenir en compte que diversos factors ambientals poden influir sobre l'aparició i el desenvolupament posterior de la malaltia. Els estudis de bessons, en què la concordança entre bessons MZ no arriba al 100%, donen suport a la contribució de l'ambient (Svensson et al. 2003).

Per concloure, la migranya és en la majoria de casos una malaltia d'etiologia multifactorial, en que participarien factors ambientals desencadenants i factors genètics que tindrien una contribució de pes sobre el trastorn, la qual s'estima que pot arribar al 60% (Ferrari et al. 2015) . Només alguns casos concrets de migranya tenen una naturalesa monogènica.

3.1. FORMES MONOGÈNIQUES DE MIGRANYA: LA MIGRANYA HEMPLÈGICA

La migranya hemiplègica (HM) és un subtipus rar i sever de migranya amb aura. Pot presentar-se en famílies (*Familial Hemiplegic Migraine*, FHM, ICHD-II 1.2.4) o de forma esporàdica (*Sporadic Hemiplegic Migraine*, SHM, ICHD-II 1.2.5). La migranya hemiplègica es caracteritza per l'aparició d'episodis d'hemiparèsia que generalment precedeixen o acompanyen l'atac migranyós. En el cas de la FHM, la patologia presenta un patró d'herència mendelià autosòmic dominant amb penetrància incompleta.

Les metodologies més emprades fins ara en l'estudi genètic de la FHM han estat l'anàlisi de lligament i la seqüenciació de gens candidats (Maher & Griffiths 2011). Els primers tenen com a objectiu la identificació de regions cromosòmiques o *loci* que cosegrecuen amb la malaltia a les famílies, mitjançant l'ús de marcadors genètics com els microsatèl·lits o els polimorfismes d'un únic nucleòtid (SNPs, per *Single Nucleotide Polymorphisms*). Un cop definida la regió de cosegregació, poden identificar-se els gens que hi queden inclosos i seqüenciar-los en malalts amb la finalitat d'identificar les variants genètiques que causen el fenotip clínic.

Actualment, la recerca de gens responsables de malalties mendelianes com la FHM es basa sobretot en la seqüenciació massiva d'exomes, una tècnica que permet la identificació a gran escala de les variants presents a les regions codificants del genoma de malalts i familiars sense haver de passar necessàriament per l'anàlisi de lligament genètic.

En el cas de la SHM no és possible fer anàlisi de lligament, i per això el recurs més utilitzat en aquests casos ha estat la seqüenciació de gens candidats (normalment aquells que prèviament s'havien implicat en FHM) o, més recentment, la seqüenciació d'exomes. Les causes genètiques de la SHM no estan encara clares, però en alguns casos s'han identificat mutacions en els mateixos gens que causen FHM (de Vries et al. 2007, Stam et al. 2011, Terwindt et al. 2002, Thomsen et al. 2008). La naturalesa esporàdica s'explicaria, en alguns casos, pel fet que algunes mutacions apareixen *de novo* (no són heretades) i en d'altres, per la penetrància incompleta del fenotip en individus que són portadors de mutacions.

La migranya hemiplègica presenta una àmplia heterogeneïtat genètica no al·lèlica i al·lèlica. És a dir, mutacions en gens diferents poden donar lloc a la patologia en famílies diferents; i, a més, en cadascun dels gens responsables identificats són diverses les alteracions moleculars concretes que poden donar lloc al trastorn. Els estudis de lligament i d'anàlisi genètics duts a terme fins ara han permès identificar sis gens (*CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A*, *PRRT2*, *SLC4A4* y *SLC1A3*) (Jen et al. 2005, Meneret et al. 2013, Russell & Ducros 2011, Suzuki et al. 2010) responsables de HM i dos *loci*, a 1q31 i 14q32, per als quals encara no s'han identificat els gens subjacents (Cuenca-Leon et al. 2009b, Gardner et al. 1997). No obstant, l'elevat nombre de casos familiars no resolts fa pensar que el nivell d'heterogeneïtat genètica no al·lèlica és encara més gran, i per tant quedarien gens responsables de les formes monogèniques de migranya sense identificar (Maher & Griffiths 2011). De fet, entre els dos gens quantitativament més importants en relació a la base genètica de les HM, *CACNA1A* i *ATP1A2*, només es cobreix entre un 20 i un 40% del total de sèries de pacients FHM estudiats amb la malaltia, i un 7-15% de SHM (Carreno et al. 2013).

3.1.1. Principals gens responsables de la migranya hemiplègica

El primer *locus* identificat correspon al gen ***CACNA1A*** (FHM1, OMIM #141500), situat al cromosoma 19p13, que codifica la subunitat α 1A del canal neuronal de calci $Ca_v2.1$ dependent de voltatge de tipus P/Q (Ophoff et al. 1996). Aquest gen s'expressa àmpliament en el sistema nerviós central, especialment a les terminals presinàptiques glutamatèrgiques i

té un paper important en el control de l'alliberació de neurotransmissors mitjançant la recaptació del calci (Figura 8). S'han descrit més de 30 mutacions en el gen, així com algun cas de deleció d'una part del gen (Carreno et al. 2013, de Vries et al. 2009b, Labrum et al. 2009, Riant et al. 2010a). La gran majoria de mutacions identificades en el gen *CACNA1A* en pacients HM són de guany de funció. Es creu que aquest guany de funció provoca una recaptació del calci en resposta a despolaritzacions més petites, fent que es doni un increment de l'alliberació del neurotransmissor excitador glutamat als espais sinàptics a nivell de l'escorça cerebral, afavorint així la neurotransmissió i disminuint el llindar perquè es produeixi la CSD (Wessman et al. 2007). L'heterogeneïtat al·lèlica que observem al gen *CACNA1A* en els pacients va associada en certa mesura a heterogeneïtat clínica, de la qual parlarem més endavant.

El segon gen identificat com a responsable de HM és ***ATP1A2*** (FHM2, OMIM #602481), situat al cromosoma 1q23 (Ducros et al. 1997). Codifica la subunitat $\alpha 2$ de l'ATPasa intercanviadora de Na^+/K^+ i s'expressa en astròcits. Aquesta ATPasa està implicada en el transport actiu de ions mitjançant l'eliminació de ions K^+ extracel·lulars, tot afavorint la sortida de ions Na^+ cap a l'exterior que s'utilitza en la recaptació del glutamat per les cèl·lules (Figura 8). Hi ha més de 60 mutacions descrites en aquest gen, i la gran majoria causen una pèrdua de funció (Carreno et al. 2013, De Fusco et al. 2003). Això produeix una menor recaptació de glutamat, que augmenta així la seva concentració a l'espai sinàptic, tot provocant una despolarització que impedeix la recuperació després de l'excitació neuronal, cosa que facilita l'aparició de la CSD (Wessman et al. 2007)

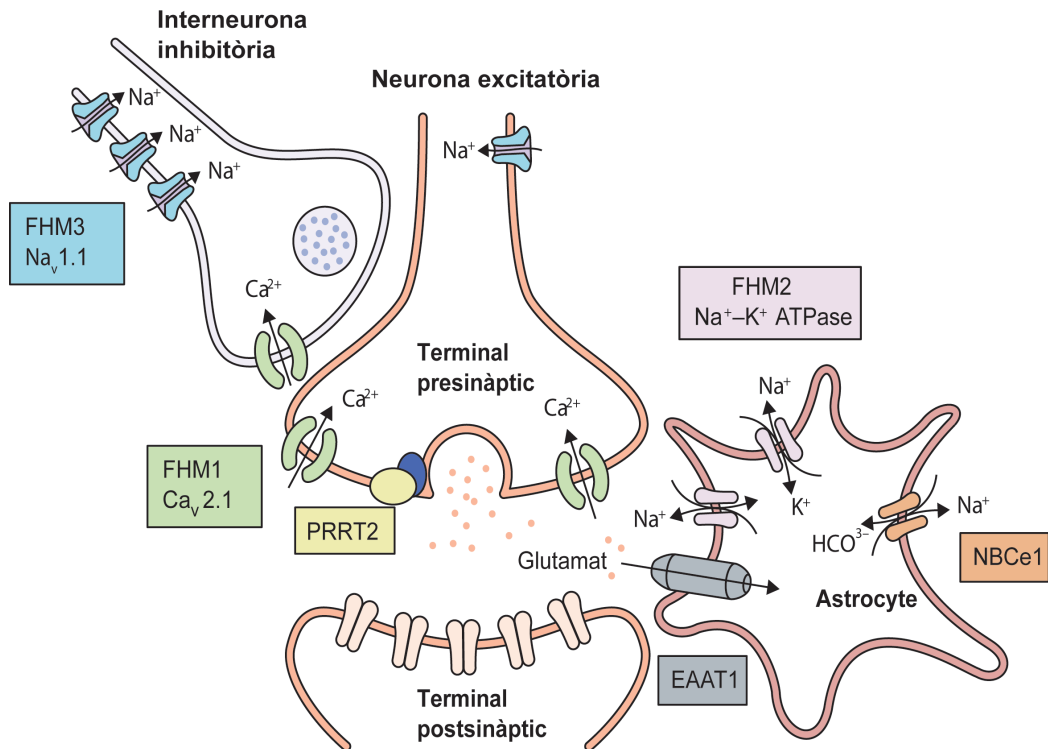


Figura 8. Rols funcionals de les proteïnes codificades per gens relacionats amb migranya hemiplègica a la sinapsi glutamàtica en el sistema nerviós central. La neurona presinàptica rep la informació de la interneurona inhibidora GABAèrgica. Els canals Cav.2.1 es localitzen a les terminals presinàptiques de les neurones excitadores i inhibidores. En resposta a un potencial d'acció, aquests canals permeten l'entrada de calci a la terminal presinàptica, tot desencadenant l'alliberament de glutamat a l'espai sinàptic. Les mutacions al gen *CACNA1A* (FHM1) provoquen una disfunció dels canals, conduint a una alteració de la neurotransmissió. En el cas d'un guany de funció, per tant, augmentarà l'entrada de calci i, així, l'augment de glutamat a l'espai sinàptic. Les bombes Na⁺-K⁺ codificades pel gen *ATP1A2* (FHM2) s'expressen a la membrana dels astròcits i són les encarregades de recaptar el potassi per tal de limitar l'excitabilitat neuronal i mantenir el gradient de sodi, cosa que permet la captació de glutamat mitjançant el transportador EAAT1, codificats pel gen *SLC1A3*. Mutacions de pèrdua de funció en aquests dos gens desembocarien en una disfunció de la recaptació de potassi i glutamat, i aquest últim augmentaria els seus nivells a l'espai sinàptic. Es prediu que les mutacions al gen *SCN1A* (FHM3) afectarien l'activitat GABAèrgica de les neurones inhibidores, En el cas de les mutacions a *SLC4A4*, que codifica la proteïna NBCe1, es creu que podria desregular el pH i així alterar l'excitabilitat neuronal. Mutacions en el gen *PRRT2*, que codifica una proteïna capaç d'unir-se a SNAP25, interferirien en la interacció, tot afectant l'alliberament de glutamat. En termes generals, les disfuncions en els transportadors resultarien en concentracions elevades de glutamat a l'espai sinàptic, tot afavorint la CSD. Adaptada de (Ferrari et al. 2015, Li et al. 2015).

3.1.2. Gens responsables d'altres fenotips amb migranya hemiplègica

El gen **SCN1A** (FHM, OMIM #609634), a més de ser responsable d'alguns casos de migranya hemiplègica, està estretament lligat a l'epilèpsia (Dichgans et al. 2005). Està situat al cromosoma 2q24 i codifica la subunitat $\alpha 1$ del canal neuronal de sodi Nav1.1, que juga un paper important en la generació i propagació dels potencials d'acció i s'expressa a les membranes de les interneurons inhibidores (Figura 8). Només s'han descrit només cinc mutacions en aquest gen en pacients HM (alguns dels quals també presenten epilèpsia) (Castro et al. 2009, Dichgans et al. 2005, Gargus & Tournay 2007, Vahedi et al. 2009, Vanmolkot et al. 2007), mentre que n'hi ha més de 700 identificades en pacients amb epilèpsia (Claes et al. 2009). Es creu que les mutacions al gen **SCN1A** provoquen una disminució en la funció del canal, amb la conseqüent reducció de la recaptació de glutamat, que condiciona una recuperació accelerada de la inactivació del canal, fent que la freqüència d'activació augmenti i incrementant així l'excitabilitat neuronal (Wessman et al. 2007).

D'altra banda, el gen **PRRT2** s'ha relacionat recentment amb el fenotip HM. Està en el cromosoma 16p11. Codifica una proteïna transmembrana capaç d'unir-se a la proteïna associada al sinaptosoma 25 (SNAP25), que participa en la fusió de vesícules durant el procés d'exocitosi, tot suggerint un paper de PRRT2 en l'exocitosi sinàptica (Figura 8). Fins ara s'hi han descrit només set mutacions en famílies amb HM pura, i en la majoria de pacients amb mutacions a **PRRT2** la HM acompanya d'altres fenotips que inclouen la discinèsia paroxística cinesigènica i l'epilèpsia benigna infantil familiar (Meneret et al. 2013).

El gen **SLC4A4**, situat al cromosoma 4q13, codifica la proteïna NBCe1, que és un cotransportador de $\text{Na}^+ \text{-HCO}_3^-$ (Figura 8). S'hi han descrit mutacions en casos de famílies amb acidosi renal tubular (pRTA), migranya hemiplègica i anomalies oculars (Demirci et al. 2006, Suzuki et al. 2010). Els estudis suggereixen que les mutacions en homozigosi alteren l'excitabilitat neuronal mitjançant canvis en el pH i que això seria la causa de FHM, MA o MO, en funció de la mutació concreta que porti el malalt.

L'últim gen responsable de HM identificat és **SLC1A3**, situat a 5p13, un transportador de glutamat (Figura 8). S'hi ha identificat només una mutació en un pacient amb hemiplegia, atàxia episòdica i convulsions (Jen et al. 2005).

3.1.3. CACNA1A i heterogeneïtat clínica

El gen **CACNA1A** és el gen responsable de migranya hemiplègica, juntament amb **ATP1A2**, en què s'han descrit més casos a la literatura. Fins ara s'han identificat més de 100 mutacions diferents a **CACNA1A**, tant relacionades amb el fenotip HM (unes 30), com amb d'altres fenotips neurològics, algunes de les quals s'han observat en un únic individu, mentre que d'altres han aparegut en diversos pacients no emparentats. Aquesta heterogeneïtat al·lèlica va acompanyada, a més, de variacions en el quadre clínic dels pacients, de tal manera que determinades variants estan relacionades amb patologies diferents de la HM, principalment l'atàxia episòdica de tipus 2 (*Episodic Ataxia type 2*, EA2, OMIM #108500) i l'atàxia espinocerebel·lar de tipus 6 (*Spinocerebellar Ataxia type 6*, SCA6, OMIM #183086).

Més recentment s'han descrit altres fenotips en pacients portadors de mutacions en el *CACNA1A*, com l'hemiplegia alternant de la infància (*Alternating Hemiplegia of Childhood*, AHC, OMIM #104290), la necrosi aguda de l'estriat, l'accident isquèmic recurrent o la síndrome hemiplègia-hemiconvulsió-epilèpsia (Carreno et al. 2011, de Vries et al. 2008, Knierim et al. 2011, Vila-Pueyo et al. 2014, Yamazaki et al. 2011).

L'**ataxia episòdica de tipus 2 (EA2)** és una malaltia rara amb un patró d'herència mendeliana autosòmic dominant, tot i que també se n'han identificat alguns casos esporàdics (Nachbauer et al. 2014). Es caracteritza per una presentació en forma de brots que es manifesten inicialment amb atàxia, vertigen, desequilibri, vòmits i la presència de nistagme entre els episodis (Rajakulendran et al. 2010, Spacey et al. 2005). Els episodis solen durar d'entre hores i 2-3 dies i generalment es desencadenen per l'estrès emocional, l'exercici físic, l'alcohol o la cafeïna. Aproximadament un 50% dels pacients també pateixen atacs de migranya, i un 80% vertigen posicional durant els atacs. Molts dels pacients són tractats amb acetazolamida, fàrmac al qual no tots responen positivament (Cuenca-Leon et al. 2009a, Rajakulendran et al. 2012, Spacey 1993). S'han identificat més de 80 mutacions diferents en pacients EA2, la majoria de les quals són mutacions disruptives sense sentit (codons de parada de la traducció) o que introdueixen un canvi en la pauta de lectura, amb conseqüències funcionals no sempre ben caracteritzades (Rajakulendran et al. 2012). D'altra banda, en els darrers anys l'ús de tècniques quantitatives ha permès caracteritzar deleccions en el gen, que comprenen des d'un a diversos exons, en pacients EA2 (Labrum et al. 2009, Riant et al. 2010b, Riant et al. 2008, Wan et al. 2011). En termes generals, les mutacions al gen *CACNA1A* presenten efectes contraris en EA2 i en HM. Mentre que en HM veïem que la majoria de mutacions produïen un guany de funció, en el cas d'EA2 la majoria donen lloc a una pèrdua de funció (Pietrobon 2010). Aquesta lògica, però, queda en entredit en algunes famílies en que un mateix individu presenta ambdós fenotips, HM i EA2, i en principi una única mutació responsable d'aquests trastorns episòdics al gen *CACNA1A* (Carreno et al. 2013, Ducros et al. 1999, Mantuano et al. 2010). Tot i que el gen *CACNA1A* és un bon candidat per als estudis genètics en els casos EA2, una gran proporció de pacients presenta resultats negatius en les anàlisis mutacionals, cosa que suggereix una potencial heterogeneïtat genètica no al·lèlica també per a aquesta malaltia.

L'**ataxia espinocerebel·lar de tipus 6 (SCA6)** és també una malaltia rara que segueix el mateix patró d'herència autosòmic dominant que HM i EA2 (Pietrobon 2010). Es caracteritza per problemes progressius en el moviment, que inicialment es manifesten amb dificultats en la coordinació i l'equilibri. En aquest cas, la variació genètica consisteix en l'expansió d'un trinucleòtid CAG (glutamina), situat a l'exó 47 del gen *CACNA1A*, i present en algunes isoformes, expressades predominantment a les cèl·lules de Purkinje, com una seqüència de poliglutamina (Giunti et al. 2015). A la població general aquesta unitat es repeteix entre 4 i 18 vegades, mentre que en pacients supera les 20. Hi ha una relació inversa entre el nombre de repeticions i l'edat d'aparició de la malaltia. La poliglutamina està situada a la cua C-terminal citoplasmàtica de la proteïna, que conté residus implicats en la inactivació del canal i

modulació per senyals intracel·lulars. L'efecte d'aquesta expansió a nivell de funció del canal no està clara, i els resultats obtinguts fins ara en models cel·lulars són controvertits. La formació d'agregats insolubles és rar en SCA6, tot i que és un dels mecanismes més freqüents en trastorns d'expansions de poliglutamines. En aquest cas no queda clar com la mutació afecta la funció del canal.

3.2. FORMES COMUNES DE MIGRANYA

Així com els estudis de lligament han estat molt útils en la identificació de gens responsables de formes mendelianes de migranya, la seva utilització en famílies normalment petites amb migranya comuna (tant MA com MO) no ha donat resultats conclouents (Maher & Griffiths 2011). Aquests estudis, que s'han realitzat tant a escala genòmica com dirigits a determinades regions candidates, han permès identificar alguns *loci* cromosòmics de susceptibilitat a formes comunes de migranya, entre els quals han destacat regions properes als gens responsables de FHM1 (*CACNA1A*) i FHM2 (*ATP1A2*) (Jones et al. 2001, Lea et al. 2002, Nyholt et al. 1998). Malgrat això, la seqüenciació d'ambdós gens com a candidats posicionals a estar implicats en MA o MO no va donar resultats positius (Curtain et al. 2005, Lea et al. 2001).

En l'etiologia de la migranya comuna intervenen factors genètics múltiples i també factors ambientals. Els factors genètics, entesos en aquest cas com a variants comunes de susceptibilitat, tindrien una contribució individual petita al fenotip (Figura 9), però quan actuen de forma combinada, ja sigui additivament o a través d'interaccions epistàtiques, poden explicar un percentatge important del trastorn (McCarthy et al. 2008). La metodologia més emprada fins ara per identificar variants genètiques comunes de risc en malalties complexes són en els estudis d'associació. Aquests estudis estan dissenyats per detectar variants genètiques que són més freqüents entre els malalts (variants de risc) o menys freqüents en els malalts (variants protectores) que a la població general. És per això que en aquest tipus d'estudis és molt important tenir una avaluació clínica acurada que permeti separar correctament els casos dels controls, així com una mida mostral suficient per assegurar que s'assoleix la robustesa i el poder estadístic adequats.

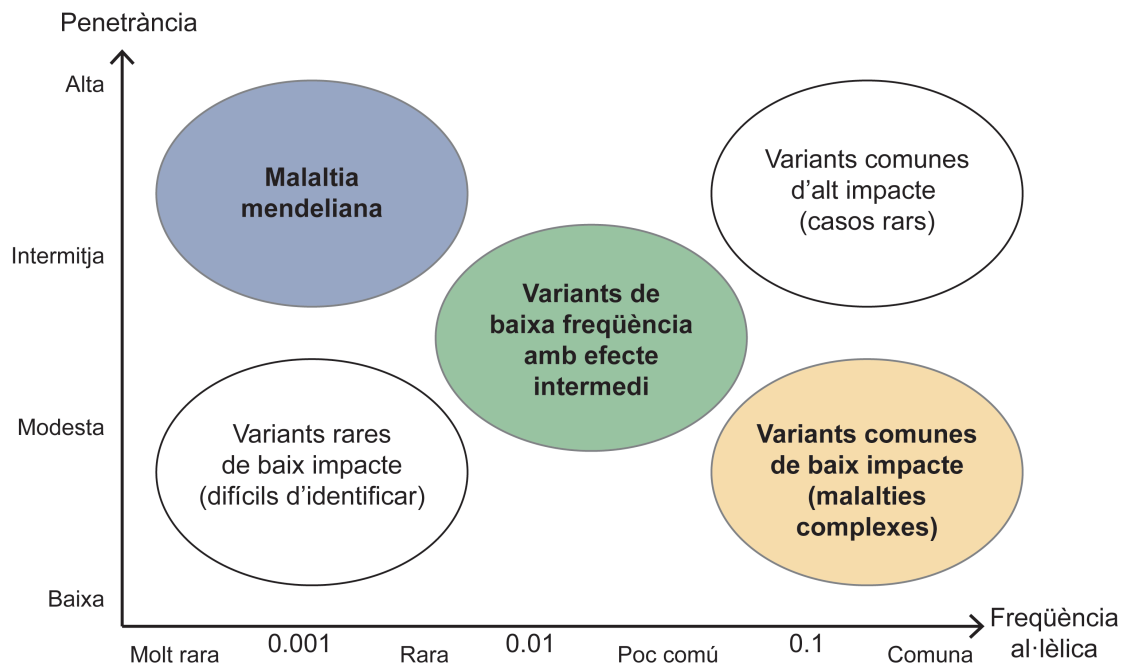


Figura 9. Relació entre les malalties genètiques, la penetrància dels al·lels i la seva freqüència. Adaptada de (McCarthy et al. 2008).

3.2.1. Estudis d'associació amb gens candidats (Candidate Gene Association Studies, CGAS)

Fins fa pocs anys els estudis d'associació en migranya se centraven en la selecció de variants genètiques situades en regions candidates, on en general es procurava obtenir la màxima cobertura genètica. En altres casos se seleccionaven variants que tenien un impacte funcional conegut i que estaven situades també en gens candidats. Actualment hi ha més de 100 publicacions en què es recullen estudis d'associació de tipus cas-control per a més de 200 gens candidats.

La selecció dels gens candidats s'ha basat típicament en la implicació d'aquests gens en vies funcionals relacionades amb la fisiopatologia de la migranya (revisat a Maher & Griffiths 2011):

- **Neurotransmissió:** Partint de la hipòtesi que el TGVS està estretament relacionat amb la iniciació de l'atac migranyós (Moskowitz 2008), s'han considerat neurotransmissors (dopaminèrgics, serotoninèrgics i glutamatèrgics), neuropèptids, receptors i canals associats. En aquest cas, una disfunció a nivell de sistema nerviós podria desencadenar l'activació del sistema vascular i activar els senyals de dolor.

El **sistema serotoninèrgic** és particularment rellevant, ja que el neurotransmissor serotonina (5-HT) està implicat en la nocicepció (Goadsby 2007). D'altra banda, els triptans, que són agonistes amb efecte vasoconstrictor, són capaços de pal·liar l'atac migranyós. Es creu que la implicació de la serotonina en la migranya es basa en una desregulació de 5-HT central en els pacients, ja que alguns estudis han observat que els malalts presenten un augment

de la capacitat de síntesi de serotonina, i que el seu alliberament sobtat podria formar part del esdeveniments que desemboquen en l'episodi migranyós (Panconesi 2008).

La relació del **sistema dopaminèrgic** amb la patogènesi de la migranya rau en la presència de processos activats per la dopamina que tenen lloc abans o durant l'episodi, la incidència dels quals augmenta per l'efecte la dopamina i dels seus agonistes. Es creu que els pacients presentarien hipersensibilitat a la dopamina i això podria ser el desencadenant de l'atac. Malgrat això, el mecanisme exacte pel qual el desenvolupament de la migranya està influït per aquest sistema no està massa clar (Akerman & Goadsby 2007).

El **glutamat** és el neurotransmissor excitador més important i hi ha un elevat nombre de receptors, transportadors i d'altres proteïnes associades que hi interaccionen. Es considera necessari per a la CSD i per a l'activació del TGVS i la sensibilització central (Gasparini & Griffiths 2013). A causa de la seva implicació a nivell fisiopatològic en les formes monogèniques, el sistema glutamatèrgic resulta un molt bon candidat per al seu estudi en les formes comunes. D'altra banda, l'ús dels antagonistes del glutamat en el tractament de la migranya recolzen la seva implicació en la patologia.

- **Sistemes hormonals:** A causa de la diferència en la prevalença de la migranya entre dones i homes i de l'existència de casos de migranya estretament relacionats amb la menstruació, els receptors d'estrogen (ESR) i de progesterona (PRG) han estat objecte de diversos estudis d'associació (Lipton et al. 2001). Concretament, es creu que els nivells d'estrogen podrien jugar un paper important en l'atac migranyós. S'ha hipotetitzat que nivells elevats d'estrògens seguits d'una caiguda en la seva concentració desencadenarien l'episodi. La majoria d'estudis s'han centrat en el receptor d'estrogen 1 (*ESR1*), que està implicat en la regulació de l'expressió gènica, i que també podria modular neuropèptids com el CGRP o neurotransmissors com la serotonina i el glutamat (MacGregor 2004). D'altra banda, també es creu que podria tenir efecte vasculars gràcies a la seva influència sobre la producció d'òxid nítric.

- **Sistema vascular:** La migranya es va considerar un trastorn vascular durant molts anys, ja que els pacients presentaven un augment en el flux sanguini abans de l'episodi i durant aquest, tot i que amb el temps s'ha suggerit que la vasodilatació seria un fenomen secundari causat per l'activació del TGSV (Goadsby et al. 2002). No obstant això, la implicació del sistema vascular en la fisiopatologia de la migranya és evident. Cal destacar el gen *MTHFR*, un dels més estudiats en migranya. Codifica la reductasa de metilè tetrahidrofolat, implicada en el metabolisme del folat (vitamina B9) (Rubino et al. 2009). Un altre gen sovint associat amb MO o MA és el gen *ACE*, que codifica l'enzim convertidor d'angiotensina (Kara et al. 2007).

- **Canals iònics:** Donat que les formes mendelianes de migranya es consideren canalopaties perquè els gens identificats fins ara codifiquen canals o proteïnes relacionades, sembla lògic que s'investigui la implicació dels canals iònics també en les formes comunes. Un estudi va seleccionar i analitzar variants genètiques comunes en els gens que codifiquen 155 canals iònics i, tot i que es van detectar algunes associacions nominals a la mostra de

descoberta, els resultats no es van confirmar a la mostra de rèplica. Sí que s'observà una associació significativa entre la migranya i la interacció epistàtica entre els gens codificants dels canals de potassi i calci *KCNB2* i *CACNB2* (Nyholt et al. 2008).

Moltes de les variants associades amb la migranya han estat objecte d'estudis de rèplica. Tot i això, la gran majoria d'aquests estudis han ofert resultats contradictoris o poc conclouents. En alguns casos la no replicació pot tenir a veure amb el limitat poder estadístic de les mostres en els diferents estudis, però també poden haver-hi altres raons, com les diferències ètniques entre les poblacions o l'heterogeneïtat clínica dels diferents estudis, que no sempre serien comparables.

3.2.2. Estudis d'associació a escala genòmica (Genome-Wide Association Studies, GWAS)

Aquests estudis permeten crivellar variants de tipus SNP distribuïdes a intervals regulars per tot el genoma. A diferència dels estudis dirigits a gens candidats, aquest enfoc no parteix d'hipòtesis preconcebudes, evitant biaixos que podrien allunyar-nos de gens causals que no serien candidats a partir dels coneixements que tenim actualment sobre la fisiopatologia del trastorn, encara incomplets. No obstant, i donat que els GWAS interroguen de forma simultània centenars de milers o milions de variants, són necessàries mides mostrals molt grans per tenir un poder estadístic suficient que permeti detectar associacions amb la patologia.

Fins ara s'han realitzat diversos GWAS en migranya, quatre dels quals han donat resultats significatius (un d'ells una meta-anàlisi), tot descrivint un total de 13 *loci* amb variants associades.

El primer de tots, publicat l'any 2010 per (Anttila et al. 2010) i dut a terme pel Consorci Internacional de Genètica de les Cefalees (*International Headache Genetics Consortium, IHGC*) en un estudi d'una mostra clínica de migranya amb aura consistent en 2731 pacients i 10747 controls. En aquesta primera fase del treball es va detectar associació amb una variant de tipus SNP, rs1835740, situada al cromosoma 8. El resultat positiu es va replicar amb èxit en un estudi de rèplica en pacients europeus migranyosos (MA i MO), que reunia 3202 casos i 40062 controls. Aquesta associació, malgrat tots els estudis posteriors de rèplica que s'han realitzat en altres poblacions, només s'ha pogut validar de forma significativa en un cas. Tot i així, aquest SNP es considera potencialment rellevant a nivell funcional, ja que està situat prop del gen *MTDH*, que regula negativament la transcripció del gen *SLC1A2*, gen que codifica el transportador de glutamat EAAT2. De fet, el propi GWAS compta amb un estudi addicional d'anàlisi de l'expressió gènica en fibroblasts, on s'observa que l'al·lel de risc presenta correlació amb nivells més alts d'expressió del gen *MTDH*.

L'any 2011 (Chasman et al. 2011) van presentar el segon GWAS, la mostra del qual consistia en 5122 pacients i 18108 controls del *Women's Genome Health Study*. En l'estudi de descoberta cap variant assolí el nivell de significació mínim per als estudis d'associació a gran escala, tot i que SNPs localitzats a 7 *loci* diferents presentaven P-valors $< 5 \times 10^{-6}$. Els

més significatius per a cadascun dels *loci* seleccionats per a un estudi de rèplica, on es van utilitzar tres poblacions: *Dutch Genetic Epidemiology of Migraine study* (GEM; amb 774 migranyosos i 942 controls), *German Study of Health in Pomerania* (SHIP; 306 pacients i 2260 controls), i la població clínica de l'ICGH (2748 pacients i 10747 controls). Només en la meta-anàlisi tres associacions van assolir nivells de significació amb els SNPs rs2651899, rs11172113 i rs10166942 en els gens *PRDM16*, *LRP1* i prop de *TRPM8*, respectivament.

Un nou GWAS publicat per (Freilinger et al. 2012) i presentat en aquesta tesi, es va centrar únicament en pacients amb migranya sense aura, tot identificant un total de 12 loci que inclouen 18 SNPs nominalment associats amb la patologia. La mostra original consistia en una població clínica de 2326 pacients (1208 alemanys i 1118 holandesos) i 4580 controls (2564 alemanys i 2016 holandesos). L'estudi de rèplica constava de quatre poblacions: població fina de 871 pacients MO i 1024 controls, població espanyola de 837 pacients MO i 971 controls, població holandesa de 555 pacients MO i 456 controls, i població noruega de 245 pacients MO i 201 controls. Per a aquesta fase, en què es van analitzar aquests 18 SNPs, s'observà associació potencial amb vuit de les variants, mentre que en la meta-anàlisi es va arribar a nivells significatius per a un total de 5 SNPs. A més, en aquest treball es repliquen les associacions de l'estudi previ de (Chasman et al. 2011) per als gens *TRPM8* i *LRP1*.

Finalment, una meta-anàlisi publicada l'any 2013 per (Anttila et al. 2013) recollia les dades de 29 estudis independents, alguns centrats en mostres clíniques i d'altres de tipus poblacional, amb un total de 23.285 pacients i 95.425 controls. La meta-anàlisi considera, a més del grup que inclou tots els individus (*all samples*), tres grans grups: *Clinics only* (5175 pacients i 13972 controls), *MA only* (mostra poblacional de 5118 pacients MA i 74239 controls) i *MO only* (mostra poblacional de 7107 pacients MO i 69427 controls). En aquest estudi s'identifiquen 12 variants de susceptibilitat a la migranya, cinc de les quals no s'havien descrit prèviament.

Els estudis GWAS han senyalat diversos gens que no havien entrat en els llistats de molècules candidates per a la patologia. Entre ells hi ha gens relacionats amb la neurotransmissió glutamatèrgica (*MTDH*, *LRP1*, *MEF2D*), el desenvolupament i la plasticitat sinàptica (*FHL5*, *ASTN2*), dolor (*TRPM8*) o components del sistema vascular (*PRDM16*, *PHACTR1*) (Taula 4) (Ferrari et al. 2015).

Taula 4. Gens de susceptibilitat a la migranya identificats en GWAS.

SNP*	Locus	Gen	Subgrup migranyós	Tipus de mostra	Referència/es
Neurotransmissió glutamatèrgica					
rs1835740	8q22.1	<i>MTDH</i>	MA	Clínic	(Anttila et al. 2010) (Chasman et al. 2011)
rs11172113	12q13	<i>LRP1</i>	MO	Poblacional o Clínic	(Freilinger et al. 2012) (Anttila et al. 2013)
rs3790455	1q22	<i>MEF2D</i>	Migranya; MO	Poblacional o Clínic	(Freilinger et al. 2012) (Anttila et al. 2013)
Desenvolupament i plasticitat sinàptics					
rs6478241	9q33	<i>ASTN2</i>	Migranya	Clínic	(Freilinger et al. 2012) (Anttila et al. 2013)
rs13208321	6q16	prop de <i>FHL5</i>	MO	Poblacional o Clínic	(Anttila et al. 2013)
Dolor					
rs10166942	2q37	<i>TRPM8</i>	MO	Poblacional o Clínic	(Chasman et al. 2011) (Freilinger et al. 2012) (Anttila et al. 2013)
Metal·loproteïnases					
rs10504861	8q21	prop de <i>MMP16</i>	MO	Poblacional o Clínic	(Anttila et al. 2013)
rs10915437	1p36	prop de <i>AJAP1</i>	Migranya	Clínic	(Anttila et al. 2013)
rs12134493	1p13	prop de <i>TSPAN2</i>	Migranya	Poblacional o Clínic	(Anttila et al. 2013)
rs7640543	3p24	prop de <i>TGFBR2</i>	Migranya	Clínic	(Freilinger et al. 2012) (Anttila et al. 2013)
Sistema vascular i metabolisme					
rs4379368	7p14	<i>SUGCT</i>	MO	Poblacional o Clínic	(Anttila et al. 2013)
rs2651899	1p36	<i>PRDM16</i>	Migranya	Poblacional o Clínic	(Chasman et al. 2011) (Anttila et al. 2013)
rs9349379	6p24	<i>PHACTR1</i>	MO	Poblacional o Clínic	(Freilinger et al. 2012) (Anttila et al. 2013)

*Per a cada *locus* s'indica la variant amb el p-valor més significatiu.

3.2.3. Noves perspectives: Els microRNAs com a elements reguladors

Tot i que els estudis actuals d'associació estan més centrats en les anàlisis a gran escala que en gens candidats, de moment no s'ha fet prou èmfasi en els elements reguladors del genoma, com ara els promotors dels gens o els microRNAs (miRNAs). Aquests últims, més de 1500 en el genoma humà, no sempre estan ben coberts pels marcadors dels GWAS d'ús més extès. És per això que els miRNAs han estat objecte d'estudi en un dels treballs que es presenta en aquesta Tesi.

En les malalties mendelianes la major part de la variació genètica causal està en els exons (>85%). Hi ha debat sobre si l'arquitectura genètica de les malalties complexes és similar o si, pel contrari, hi tindran més pes les regions reguladores de l'expressió gènica. Publicacions recents en què s'estudien gens, variants i patrons d'expressió de miRNAs demostren la seva contribució al fenotip normal i a la patologia (Kress et al. 2013, Lett et al. 2013, Muinos-Gimeno et al. 2011).

Els miRNAs són molècules reguladores curtes no codificants d'ARN d'entre 18 i 24 nucleòtids (Mishra et al. 2008). Es calcula que podrien estar implicats en la regulació de l'expressió de dos terços dels gens en el genoma (Friedman et al. 2009). Actuen a nivell post-transcripcional, ja sigui inhibint la síntesi proteica o degradant molècules diana d'ARN missatger.

3.2.3.1. Biogènesi i expressió dels miRNAs

Els gens de miRNA s'expressen com a transcrits primaris llargs, els pri-miRNAs, que comprenen entre 100 i 1000 nucleòtids i que prenen estructures internes en forma de llaç. En la majoria de casos és la polimerasa d'ARN II la implicada en el seu mecanisme de transcripció (Bicker & Schratt 2008).

El pri-miRNA, encara localitzat al nucli, és processat per la RNasa de tipus III *Drosha*, que talla el pri-miRNA i n'allibera l'estructura de llaç. El resultat del clivellament és el pre-miRNA, que té una longitud d'uns 70 nucleòtids. Aquest és transportat al citoplasma, on és processat per la RNasa de tipus III *Dicer*. Aquesta és l'encarregada de dur a terme una segona escissió que dona lloc a un ARN de doble cadena de 18-24 nucleòtids, corresponent al miRNA madur i a la seva cadena complementària (miRNA*). Una helicasa és la responsable de separar el dúplex miRNA:miRNA*, i generalment només una de les dues té funció reguladora, mentre que l'altra es degrada. El miRNA madur entra en un complex proteic (*miRNA-containing RNA Induced Silencing Complex*, miRISC) encarregat de guiar el miRNA cap al seu mRNA diana. El miRNA madur conté un regió d'uns 7 nucleòtids anomenada *seed*, que s'uneix al missatger diana per complementarietat de bases, en la majoria de casos a la regió 3'UTR. Els miRNAs presenten dos tipus de mecanismes reguladors: la inhibició translacional i la degradació de l'ARN missatger. Aquest últim està afavorit quan la complementarietat de bases entre el missatger i el miRNA és molt elevada, mentre que un aparellament imperfecte de bases entre la regió *seed* i el missatger facilita la inhibició translacional. S'ha vist que el bloqueig de la traducció dels ARN missatgers és el mecanisme més freqüent en animals (Kim et al. 2009).

En el genoma humà els gens de miRNAs es presenten en la seva majoria separats (*singletons*), però també poden organitzar-se agrupats (*clusters*) i ser transcrits en una única molècula. D'altra banda, els gens de miRNAs poden estar situats en regions intergèniques o, en alguns casos, en regions intròniques o exòniques tant d'ARNs llargs no codificants com de gens que codifiquen proteïnes. Quan els gens de miRNAs estan situats dins d'altres gens que codifiquen proteïnes, la seva expressió pot estar coordinada amb la del gen hoste. Hi ha casos en què el miRNA es troba en anti-sentit amb el gen hoste o la regió intrònica, i aleshores sol comptar amb el seu propi promotor (Kim et al. 2009).

La majoria de miRNAs presenten patrons d'expressió específics de teixit i/o de moment del desenvolupament, en part atribuïts a la seva transcripció coordinada amb els gens hostes, així com a la regulació transcripcional mitjançant factors de transcripció específics dels gens.

Algunes publicacions han suggerit que els miRNAs i els factors de transcripció poden regular-se recíprocament, i que l'expressió dels miRNAs pot tenir també una regulació post-transcripcional. És per això que una expressió ubiqua dels pre-miRNAs no es correspon necessàriament amb l'expressió dels miRNA madurs, ja que hi ha punts de control específics de teixit que podrien bloquejar la seva maduració, com ara el bloqueig de *Dicer* (Liang et al. 2007).

3.2.3.2. miRNAs i malalties neurològiques

En els últims anys els miRNAs s'estan començant a tenir en consideració com a mecanismes reguladors del desenvolupament i les funcions madures del sistema nerviós central (*Central Nervous System*, CNS), sobretot per la seva capacitat reguladora de l'expressió gènica específica de teixit. Molts d'ells s'han identificat en cervell utilitzant tècniques de clonatge i perfils d'expressió, i tenen papers clau en diferents fases del desenvolupament. En termes generals, i particularment en el CNS, s'ha constatat la seva implicació en processos com la plasticitat sinàptica, la diferenciació neuronal, la formació de la sinapsi, el desenvolupament de dendrites o la regulació de neuropèptids (Kress et al. 2013).

En el camp de les malalties neurològiques, els estudis s'han centrat en la determinació dels patrons d'expressió dels miRNAs en pacients, amb troballes notables en malalties com l'Alzheimer, el Parkinson o l'esclerosi múltiple (O'Connor et al. 2012, Soreq & Wolf 2011). Una altra via d'estudi és la identificació de variants genètiques de susceptibilitat, tant les localitzades en el RNAm diana com en el gen de miRNA que en regula la traducció a proteïna (Borel & Antonarakis 2008). Diversos miRNAs presenten nivells d'expressió alterats en els teixits implicats en determinades patologies. Aquesta alteració s'atribueix en part a l'efecte de variants genètiques de risc. S'ha suggerit que les situacions de dolor poden desregular també l'expressió dels miRNAs, tot afectant els nociceptors aferents primaris, que desemboquen en àrees del cervell associades amb components emocionals de percepció de dolor (Lugli et al. 2008). Així doncs, l'anàlisi dels miRNAs pot obrir una nova via d'estudi, convertint-los en potencials biomarcadors amb aplicacions diagnòstiques (Kress et al. 2013).

4. MODELS ANIMALS EN MIGRANYA

La utilització de models animals té com a objectiu l'estudi de la fisiopatologia i els mecanismes subjacents als atacs que tenen lloc durant les crisis migranyoses.

D'una banda, hi ha models animals murins per a l'estudi de la FHM1, el subtipus rar de migranya amb aura hemiplègica causat per mutacions en el gen *CACNA1A* (van den Maagdenberg et al. 2004, van den Maagdenberg et al. 2010). Gràcies a les tècniques de recombinació homòloga ha estat possible generar models murins *knock-in* portadors de les mutacions p.Arg192Gln o p.Ser218Leu, ambdues identificades en humans i per a les quals s'havien realitzat estudis funcionals a nivell cel·lular en què s'observà un augment de l'activitat del canal *in vitro*, de forma més acusada en el cas de la mutació p.Ser218Leu. El ratolí FHM1 presenta signes associats amb la migranya, incloent hemiparesi i debilitat motora. S'ha vist que la presència de les mutacions fa que les CSDs es donin amb més facilitat, freqüència i amplitud, ja que el seu llindar d'inducció queda disminuït. Hi ha també un model animal per a l'estudi de FHM2 mitjançant *knock-ins* portadors d'una mutació (p.Trp887Arg), en què s'ha observat una inducció i propagació de la CSD més elevada (Leo et al. 2011).

Hi ha també models animals basats en l'estudi de la CSD, en què aquesta s'indueix mitjançant diferents mètodes: químicament (aplicació de K^+ a l'escorça cerebral), mecànicament (es clava un objecte punxegut a la superfície de l'escorça cerebral) o elèctricament (mitjançant l'aplicació de corrents elèctriques a l'escorça) (Buzzi & Tassorelli 2010). Aquests models animals de CSD permeten estudiar les diferents estructures cerebrals implicades i també un ampli espectre de característiques del fenomen, com la nocicepció, l'expressió gènica o l'efecte dels fàrmacs sobre la CSD. Els fàrmacs que s'empren en aquest estudis inclouen els antiepilèptics (topiramal, àcid valproic), β -bloquejants (metoprolol) o antidepressius (fluoxetina, amitriptilina).

En questa tesi es presenten els resultats preliminars d'un estudi de transcriptòmica en un model murí de CSD a l'Apèndix 1.

OBJECTIUS

OBJECTIUS

Aquesta tesi té com a objectiu principal aprofundir en el coneixement genètic de les formes rares de migranya i fenotips relacionats, així com l'estudi de la migranya comuna mitjançant estudis d'associació en pacients.

Els objectius concrets d'aquest treball són els següents:

CAPÍTOL 1. Estudi genètic de pacients amb formes rares de migranya i fenotips relacionats.

- 1.1. Cribratge mutacional dels gens *CACNA1A* i *ATP1A2* en 18 pacients amb migranya hemiplègica (HM).
- 1.2. Cribratge mutacional del gen *CACNA1A* en 49 pacients amb atàxia episòdica de tipus 2 (EA2).

CAPÍTOL 2. Estudi genètic de la migranya comuna: estudis d'associació cas-control.

- 2.1. Estudi d'associació de rèplica de la variant rs1835740 prèviament associada amb la migranya en el primer GWAS realitzat en pacients migranyosos amb i sense aura.
- 2.2. Col·laboració en l'estudi GWAS realitzat en pacients amb migranya sense aura en el marc del Consorci Internacional de Genètica de les Cefalees (*International Headache Genetics Consortium*, IHGC).
- 2.3. Estudi d'associació de rèplica en pacients amb migranya amb aura de variants prèviament associades en diversos GWAS.
- 2.4. Estudi d'associació de variants relacionades amb gens que codifiquen miRNAs en pacients amb migranya amb aura.

RESULTATS

INFORME DEL DIRECTOR DE TESI SOBRE LES PUBLICACIONS PRESENTADES

Títol de la tesi: “Gens i migranya: anàlisi mutacional i estudis d’associació en pacients”.

Autora: Cèlia Sintas Vives

Director: Dr. Bru Cormand Rifà

CAPÍTOL 1. Estudi genètic de pacients amb formes rares de migranya i fenotips relacionats.

Article 1

Oriel Carreño, Roser Corominas, Selma Angèlica Serra, Cèlia Sintas, Noèlia Fernández-Castillo, Marta Vila-Pueyo, Claudio Toma, Gemma G. Gené, Roser Pons, Miguel Llana, María-Jesús Sobrido, Daniel Grinberg, Miguel Ángel Valverde, José Manuel Fernández-Fernández, Anfon Macaya, Bru Cormand. *Screening of CACNA1A and ATP1A2 genes in hemiplegic migraine: clinical, genetic and functional studies*. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 2013 Nov;1(4):206-22. doi: 10.1002/mgg3.24. Epub 2013 Jul 2.

Índex de qualitat: Aquesta revista és nova i encara no té índex d'impacte

Aportació de l'autora a l'article: Cribratge mutacional del gen *CACNA1A* en alguns dels pacients. Ampliació del cribratge per a les regions promotora i 3'UTR a tots els pacients. Contribució als experiments de MLPA, disseny i experiments QMPSF en els pacients. Col·laboració en l'elaboració del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

Article 2

Cèlia Sintas*, Oriel Carreño*, Roser Corominas, Noèlia Fernández-Castillo, Marta Vila-Pueyo, Claudio Toma, Ester Cuenca-León, Isabel Barroeta, Carles Roig, Víctor Volpini, Anfon Macaya, Bru Cormand. *Mutation spectrum in the CACNA1A gene in 49 patients with Episodic Ataxia Type 2*. Manuscrit sotmès a publicació a *Molecular Genetics and Genomics*.

Índex de qualitat: SCI2013=2,831. Quartil 2 de les categories GENETICS & HEREDITY i MOLECULAR BIOLOGY.

Aportació de l'autora a l'article: Cribratge mutacional del gen *CACNA1A* en alguns dels pacients. Ampliació del cribratge per a les regions promotora i 3'UTR a tots els pacients. Contribució als experiments de MLPA, disseny i experiments QMPSF a tots els pacients. Assajos NMD. Anàlisi i interpretació dels resultats. Elaboració del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

CAPÍTOL 2. Estudi genètic de la migranya comuna: estudis d'associació cas-control.

Article 3

Cèlia Sintas, Oriol Carreño, Jèssica Fernández-Morales, Pilar Cacheiro, María-Jesús Sobrido, Bernat Narberhaus, Patricia Pozo-Rosich, Alfons Macaya, Bru Cormand. *A replication study of a GWAS finding in migraine does not identify association in a Spanish case-control sample.* Cephalalgia. 2012 Oct;32(14):1076-80. doi: 10.1177/0333102412457090. Epub 2012 Aug 20.

Índex de qualitat: SCI2013=4,121. Quartil 1 de la categoria CLINICAL NEUROLOGY.

Aportació de l'autora a l'article: Participació en el disseny de l'estudi. Preparació i genotipació de les mostres mitjançant Taqman. Anàlisi i interpretació dels resultats i estadística. Elaboració del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

Article 4

Tobias Freilinger, Verner Anttila, Boukje de Vries, Rainer Malik, Mikko Kallela, Gisela M Terwindt, Patricia Pozo-Rosich, Bendik Winsvold, Dale R Nyholt, Willebrordus P J van Oosterhout, Ville Arto, Unda Todt, Eija Hämäläinen, Jèssica Fernández-Morales, Mark A Louter, Mari A Kaunisto, Jean Schoenen, Olli Raitakari, Terho Lehtimäki, Marta Vila-Pueyo, Hartmut Göbel, Erich Wichmann, Cèlia Sintas, Andre G Uitterlinden, Albert Hofman, Fernando Rivadeneira, Axel Heinze, Erling Tronvik, Cornelia M van Duijn, Jaakko Kaprio, Bru Cormand, Maija Wessman, Rune R Frants, Thomas Meitinger, Bertram Müller-Myhsok, John-Anker Zwart, Markus Färkkilä, Alfons Macaya, Michel D Ferrari, Christian Kubisch, Aarno Palotie, Martin Dichgans, Arn M J M van den Maagdenberg for the International Headache Genetics Consortium. *Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura.* Nature Genetics. 2012 Jun 10;44(7):777-82. doi: 10.1038/ng.2307

Índex de qualitat: SCI2013= 29,648. Quartil 1 de la categoria GENETICS & HEREDITY.

Aportació de l'autora a l'article: Participació en el disseny de l'estudi. Participació en l'extracció de l'ADN genòmic de pacients i controls i preparació de les mostres per a la seva genotipació automatitzada. Participació en l'edició del manuscrit final.

Article 5

Cèlia Sintas, Jèssica Fernández-Morales, Marta Vila-Pueyo, Bernat Narberhaus, Concepción Arenas, Patricia Pozo-Rosich, Alfons Macaya, Bru Cormand. *Replication study of previous migraine genome-wide association study findings in a Spanish sample of migraine with aura.* Cephalalgia. 2014 Nov 11. pii: 0333102414557841.

Índex de qualitat: SCI2013=4,121. Quartil 1 de la categoria CLINICAL NEUROLOGY.

Aportació de l'autora a l'article: Recerca bibliogràfica. Disseny de l'estudi. Participació en l'extracció de l'ADN genòmic de les mostres. Preparació de les mostres per a la seva genotipació automatitzada. Anàlisi i interpretació dels resultats i participació en l'anàlisi estadística. Elaboració del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

Article 6

Cèlia Sintas, Verner Anttila, Claudio Toma, Jèssica Fernández-Morales, Marta Vila-Pueyo, Bernat Narberhaus, Concepción Arenas, Aarno Palotie, International Headache Genetics Consortium (IHGC), Patricia Pozo-Rosich, Alfons Macaya, Bru Cormand. *Exploration of microRNA genes targetting glutamate-related proteins in migraine: case-control association study*. European Journal of Human Genetics (Manuscrit en preparació).

Índex de qualitat: SCI2013=4,225. Quartil 1 de les categories GENETICS i CLINICAL GENETICS.

Aportació de l'autora a l'article: Recerca bibliogràfica. Disseny de l'estudi. Participació en l'extracció de l'ADN genòmic de les mostres. Preparació de les mostres per a la seva genotipació automatitzada. Anàlisi i interpretació dels resultats. Elaboració del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

Barcelona, 6 de maig de 2015

Signatura del director

Dr. Bru Cormand Rifà

RESULTATS

CAPÍTOL 1. Estudi genètic de pacients amb formes rares de migranya i fenotips relacionats.

Article 1

Cribatge del gens *CACNA1A* i *ATP1A2* en pacients amb migranya hemiplègica: estudis clínics, genètics i funcionals.

Resum

La Migranya Hemiplègica (*Hemiplegic migraine*, HM) és un subtipus rar i sever de migranya amb aura autosòmica dominant, caracteritzada per una aura complexa amb debilitat motora. S'han detectat mutacions en quatre gens (*CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A* i *PRRT2*) en casos familiars i esporàdics. Aquest trastorn presenta heterogeneïtat clínica i genètica, i sovint està acompanyat d'atàxia permanent, atacs epilèptics, retard mental i atròfia cerebel·lar progressiva crònica.

En aquest treball es presenta el cribatge mutacional dels gens *CACNA1A* i *ATP1A2* en 18 pacients amb HM. A més, s'ha realitzat una anàlisi de variants de número de còpies (*Copy Number Variant*, CNV) del gen *CACNA1A* utilitzant tècniques quantitatives. S'han identificat quatre variants prèviament descrites de canvi de sentit en el gen *CACNA1A* (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln i p.Thr666Met) i dues variants també de canvi de sentit en el gen *ATP1A2*, la prèviament descrita p.Ala606Thr i la nova variant p.Glu825Lys. No s'han identificat variants estructurals. Aquest cribatge genètic ha permès identificar més del 30% dels al·lels causant de HM, tots ells presents en heterozigosi. S'han investigat les conseqüències funcionals de la mutació p.Thr501Met al gen *CACNA1A*, prèviament descrita en casos d'atàxia episòdica, i de la mutació p.Glu825Lys al gen *ATP1A2* mitjançant estudis electrofisiològics, assajos de viabilitat cel·lular o *Western blot*. Les nostres dades suggereixen que ambdues variants són responsables de la malaltia.

Referència

Carreño O, Corominas R, Serra SA, Sintas C, Fernández-Castillo N, Vila-Pueyo M, Toma C, Gené GG, Pons R, Llaneza M, Sobrido MJ, Grinberg D, Valverde MÁ, Fernández-Fernández JM, Macaya A, Cormand B. *Screening of CACNA1A and ATP1A2 genes in hemiplegic migraine: clinical, genetic and functional studies*. *Molecular Genetics and Genomic Medicine*. 2013 Nov;1(4):206-22. doi: 10.1002/mgg3.24. Epub 2013 Jul 2.

ORIGINAL ARTICLE

Screening of *CACNA1A* and *ATP1A2* genes in hemiplegic migraine: clinical, genetic, and functional studies

Oriel Carreño^{1,2,3}, Roser Corominas^{1,3,4}, Selma Angèlica Serra⁵, Cèlia Sintas^{1,2,3},
Noèlia Fernández-Castillo^{1,2,3}, Marta Vila-Pueyo⁴, Claudio Toma^{1,2,3}, Gemma G. Gené⁵,
Roser Pons⁶, Miguel Llana⁷, María-Jesús Sobrido^{3,8}, Daniel Grinberg^{1,2,3}, Miguel Ángel Valverde⁵,
José Manuel Fernández-Fernández⁵, Alfons Macaya⁴ & Bru Cormand^{1,2,3}

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain

²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

³Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Institute of Health Carlos III, Spain

⁴Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

⁵Laboratory of Molecular Physiology and Channelopathies, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

⁶First Department of Pediatrics, Agia Sofia Hospital, University of Athens, Athens, Greece

⁷Sección de Neurología, Complejo Hospitalario Arquitecto Marcide-Novoa Santos, Ferrol, Spain

⁸Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain

Keywords

ATP1A2, *CACNA1A*, functional studies, hemiplegic migraine, mutation analysis.

Correspondence

Bru Cormand, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona. Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain. Tel: +34-934021013; Fax: +34-934034420; E-mail: bcormand@ub.edu

Funding Information

The work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) and Plan E (Grants SAF2012-31089, SAF2012-38140, BES-2010-033895, SAF2009-13182-C03-01, SAF2009-13182-C03-02, and SAF2009-13182-C03-03), Fondo de Investigación Sanitaria (Cardiovascular Disease Network RD12/0042/0014) and Generalitat de Catalunya (grants 2009SGR0971, 2009SGR0078 and 2009SGR1369). M. A. V. and N. F.-C. are the recipients of an ICREA Academia Award (Generalitat de Catalunya) and a grant from "CIBER-ER," respectively. C. T. was supported by the European Union (Marie Curie, PIEF-GA-2009-254930).

Abstract

Hemiplegic migraine (HM) is a rare and severe subtype of autosomal dominant migraine, characterized by a complex aura including some degree of motor weakness. Mutations in four genes (*CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A* and *PRRT2*) have been detected in familial and in sporadic cases. This genetically and clinically heterogeneous disorder is often accompanied by permanent ataxia, epileptic seizures, mental retardation, and chronic progressive cerebellar atrophy. Here we report a mutation screening in the *CACNA1A* and *ATP1A2* genes in 18 patients with HM. Furthermore, intragenic copy number variant (CNV) analysis was performed in *CACNA1A* using quantitative approaches. We identified four previously described missense *CACNA1A* mutations (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln, and p.Thr666Met) and two missense changes in the *ATP1A2* gene, the previously described p.Ala606Thr and the novel variant p.Glu825Lys. No structural variants were found. This genetic screening allowed the identification of more than 30% of the disease alleles, all present in a heterozygous state. Functional consequences of the *CACNA1A*-p.Thr501Met mutation, previously described only in association with episodic ataxia, and *ATP1A2*-p.Glu825Lys, were investigated by means of electrophysiological studies, cell viability assays or Western blot analysis. Our data suggest that both these variants are disease-causing.

Received: 28 February 2013; Revised: 24 May 2013; Accepted: 24 May 2013

Molecular Genetics & Genomic Medicine
2013; 1(4): 206–222

doi: 10.1002/mgg3.24

206

© 2013 The Authors. *Molecular Genetics & Genomic Medicine* published by Wiley Periodicals, Inc. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Introduction

Familial or sporadic hemiplegic migraine (FHM, MIM #141599, or SHM) are rare subtypes of migraine with aura (MA) characterized by paroxysmal episodes of hemiparesis generally preceding or accompanying a headache attack (International Headache Society [IHS] 2004). FHM is considered a monogenic disorder and follows an autosomal dominant inheritance pattern (Pietrobon 2007). Both FHM and SHM are genetically heterogeneous disorders. Up to now, four causative genes have been described in hemiplegic migraine (HM): *CACNA1A* on chromosome 19p13 (FHM1, MIM #301011) (Ophoff et al. 1996), *ATP1A2* at 1q23 (FHM2, MIM #182340) (De Fusco et al. 2003), *SCN1A* at 2q24 (FHM3, MIM #182389) (Dichgans et al. 2005) and, recently, *PRRT2* at 16p11.2 (MIM #614386) (Riant et al. 2012). Additionally, two other *loci* have been reported in FHM families at 1q31 (Gardner et al. 1997) and 14q32 (Cuenca-Leon et al. 2009), although the specific genetic defects have not yet been uncovered.

Mutational screenings of HM patients have reported more than 30 mutations in the *CACNA1A* gene, over 60 mutations in the *ATP1A2* gene, only five in *SCN1A* (de Vries et al. 2009; Riant et al. 2010a; Freilinger et al. 2011) and eight in *PRRT2* (Cloarec et al. 2012; Dale et al. 2012; Gardiner et al. 2012; Marini et al. 2012; Riant et al. 2012). Additionally, a quantitative study that used multiple ligation-dependent probe amplification (MLPA) identified a deletion of exons 39–47 of *CACNA1A* in a SHM patient (Labrum et al. 2009). *CACNA1A* encodes the pore-forming $\alpha 1$ subunit of the voltage-gated neuronal $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q-type) channel. $\text{Ca}_v2.1$ channels are located in cortical glutamatergic presynaptic terminals and play an important role in controlling neurotransmitter release. *ATP1A2* encodes the $\alpha 2$ subunit of the Na^+/K^+ ATPase, is expressed in astrocytes and is involved in the clearance of extracellular K^+ and production of a Na^+ gradient used in the reuptake of glutamate. *SCN1A* encodes the $\alpha 1$ subunit of the neuronal voltage-gated sodium channel $\text{Na}_v1.1$. This channel is critical in the generation and propagation of action potentials (Wessman et al. 2007). Finally, *PRRT2* codes for a transmembrane protein of unknown function that is capable to bind to synaptosomal-associated protein 25 (SNAP25), which suggests a role in synaptic exocytosis (Lee et al. 2012).

The allelic heterogeneity displayed by the *CACNA1A* gene also correlates with substantial clinical variation, as mutations in this gene are also responsible for two other autosomal dominant diseases: episodic ataxia type 2 (EA2, MIM #108500) and spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6, MIM #183086). The range of *CACNA1A*-linked phenotypes has even been broadened by the recent descriptions of patients presenting with alternating hemiplegia of childhood (de Vries et al. 2008), acute striatal necrosis (Carreño

et al. 2011), hemiplegia–hemiconvulsion–epilepsy syndrome (Yamazaki et al. 2011), and recurrent ischemic stroke (Knierim et al. 2011). Clinical variation is also seen within the HM phenotype, a condition in which *CACNA1A* may sometimes be implicated as a modifier gene rather than a disease-causing gene (Serra et al. 2010). Typical attacks in HM are often associated with other aura symptoms: the clinical spectrum includes permanent cerebellar signs and, less frequently, various types of epileptic seizures, mental retardation, and coma. Furthermore, in approximately 50% of FHM1/*CACNA1A* families, chronic progressive ataxia occurs independently of the migraine attacks (IHS 2004). *ATP1A2* has also been associated with alternating hemiplegia of childhood (Bassi et al. 2004). Also, the *SCN1A* gene has been associated with phenotypes other than HM, as it has been identified as a cause of generalized epilepsy with febrile seizures plus type 2 (GEFS+2, MIM #604403) (Escayg et al. 2000), severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI, MIM #607208), also called Dravet syndrome (Dravet 2011), childhood epilepsy with generalized tonic-clonic seizures (ICEGTC, MIM #607208), familial febrile convulsions type 3A (FEB3A, MIM #604403) (Mantegazza et al. 2005), and elicited repetitive daily blindness (ERDB) with HM (Vahedi et al. 2009). Finally, mutations in *PRRT2* have been found in a number of paroxysmal disorders, including paroxysmal kinesigenic dyskinesia (PKD, MIM #128200), infantile convulsions with PKD (PKD/IC, MIM #602066), benign familial infantile epilepsy (BFIE, MIM #605751), and episodic ataxia or febrile seizures, apart from HM (Wood 2012).

At the functional level, HM and EA2 mutations typically have opposite effects on the $\text{Ca}_v2.1$ channels leading to increased or decreased Ca^{2+} influx, respectively (Pietrobon 2013). HM-related mutations in the *ATP1A2* gene typically produce a loss of function of the pump (de Vries et al. 2009).

In a previous study, we analyzed 21 Spanish patients with HM episodes and identified three mutations in the *CACNA1A* gene, but no disease-causing changes in *ATP1A2* (Cuenca-Leon et al. 2008). In this study we analyzed 18 additional patients with HM of Spanish and Greek origin and identified four mutations in the *CACNA1A* gene and two mutations in *ATP1A2*. The two changes that had not previously been studied at the functional level were subjected to functional analyses to establish their relevance to the disease phenotype.

Materials and Methods

Patients

All 18 patients, examined and diagnosed by specialized neurologists, fulfilled the International Criteria for

Headache Disorders 2nd edition (IHS 2004) for FHM or SHM diagnoses except patient #157, with probable HM but only one severe HM episode at the time of diagnosis. Clinical characteristics of the sample are presented in Table 1 and the pedigrees in which mutations were identified are shown in Figure 1. One hundred Caucasian Spanish or Greek unrelated adult control individuals with no personal or family history of recurrent or disabling headache were screened for the presence of the changes identified in the *CACNA1A* and *ATP1A2* genes. The Spanish controls were blood donors or individuals that underwent surgery unrelated to migraine at Hospital Vall d'Hebron (Barcelona), whereas the Greek ones were healthy individuals collected as controls for a mutation screening of cystic fibrosis. This study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from all adult subjects, children, and their parents according to the Helsinki declaration.

Sampling and mutation screening

Peripheral blood samples were collected from all probands. Genomic DNA was isolated using a standard salting-out method (Miller et al. 1988). The *CACNA1A* and *ATP1A2* genes were sequenced as previously described, including all exons, splice sites, and branch points (Cuenca-Leon et al. 2008).

The promoter and 3'UTR regions of *CACNA1A* were also included in the mutational screening. We covered an 894-bp region upstream from the initiation codon and a 553-bp segment including exon 48, as previously described (Veneziano et al. 2009). The extension of the mutational screening was also applied to 18 HM patients from our previous study (Cuenca-Leon et al. 2008). All mutations were assessed by bidirectional sequencing. In addition, all mutations were confirmed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of polymerase chain reaction (PCR) products (Table 2). Control individuals were screened by Sanger sequencing, single-strand conformation polymorphism or RFLP analysis to test the possible presence of the identified changes. Mutation nomenclature follows HGVS guidelines (<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html>) and refers to the *CACNA1A* cDNA sequence NM_023035.1 (protein sequence NP_075461.2), with nucleotide 283A (ATG) corresponding to +1 and the *ATP1A2* cDNA sequence NM_000702.3 (protein sequence NP_000693.1) with nucleotide 1A (ATG) corresponding to the initiation codon.

Copy number variant (CNV) analysis of *CACNA1A* was performed using two complementary approaches in order to cover most exons (Fig. S1): MLPA and quantitative multiplex PCR of short fluorescent fragments (QMPSF). For the MLPA assay, we used the SALSA MLPA kit P279-

A2 for *CACNA1A* (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands), and for QMPSF we used four sets of probes that covered 16 additional exons not included in the MLPA kit design. Further information about the methods and analysis is provided in Figure S1 and PCR conditions and sample analysis are available upon request.

Paternity was assessed in the de novo mutation identified as previously described (Carreño et al. 2011).

DNA constructs and site-directed mutagenesis

Human α_{1A} ($Ca_v2.1$) was originally cloned into a pCMV vector and mutation p.Thr501Met was introduced by site-directed mutagenesis (GenScript Corporation, Piscataway, NJ). Rabbit $\alpha_2\delta$ and rat $Ca_v\beta_3$ $Ca_v2.1$ channel regulatory subunits were subcloned into a pcDNA3 expression vector.

A full-length human *ATP1A2* ouabain-resistant cDNA clone ($\alpha_2_oua_wt$, with p.Gln116Arg and p.Asn127Asp changes conferring ouabain resistance), housed in pcDNA3.1 with the *myc* tag, was used. Mutation c.2473G>A ($\alpha_2_oua_825Lys$) was introduced in a $\alpha_2_oua_wt$ clone with the QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA).

All cDNA clones used in this study were sequenced in full to confirm their integrity.

Functional analysis of CACNA1A

Heterologous expression and electrophysiology

HEK 293 cells were transfected using a linear polyethylenimine (PEI) derivative, the polycation ExGen500 (Fermentas Inc., Hanover, MD) (8 equivalents PEI/3.3 μ g DNA/dish) as previously reported (Fernandez-Fernandez et al. 2004). Transfection was performed using the ratio for α_{1A} (wild type or p.Thr501Met), $Ca_v\beta_3$, $\alpha_2\delta$, and EGFP (transfection marker) of 1:1:1:0.3. Recordings were done 24–72 h after transfection.

Calcium currents (I_{Ca}) through wild-type (WT) or p.Thr501Met $Ca_v2.1$ (P/Q) channels were measured using the whole-cell configuration of the patch-clamp technique (Hamill et al. 1981). Pipettes had a resistance of 2–3 M Ω when filled with a solution containing (in mmol/L): 140 CsCl, 1 EGTA, 4 Na₂ATP, 0.1 Na₃GTP, and 10 Hepes (pH 7.2–7.3 and 295–300 mosmoles/L). The external solution contained (in mmol/L): 140 tetraethylammonium-Cl, 3 CsCl, 2.5 CaCl₂, 1.2 MgCl₂, 10 Hepes, and 10 glucose (pH 7.3–7.4 and 300–305 mosmoles/L). Recordings were obtained with a D-6100 Darmstadt amplifier (List Medical, Germany), filtered at 1 kHz and corrected for leak and capacitive currents using the leak subtraction procedure (P/8). Currents were acquired at 33 kHz. The

Table 1. Clinical features of 18 patients with HM and other accompanying symptoms.

Patient	Gender	Age (years)	Age at onset (years)	Triggering factors	Diagnosis	Other ictal features	Other	Family history	Origin	Mutation
5C	F	50	11–12	–	FHM	–	–	MA, HM	Spain	–
A03_44	F	66	–	–	FHM	–	Nystagmus, progressive ataxia	HM	Spain	p.Thr501Met (CACNA1A)
A00_100	F	31	Adolescent	–	FHM	Episodic ataxia	Progressive ataxia, cerebellar atrophy on MRI	HM, MA, EA2	Spain	p.Arg583Gln (CACNA1A)
99	F	40	8	Fasting	SHM	MA	–	MO	Spain	–
112	M	19	11–12	–	SHM	MO	–	Headache	Spain	–
157	M	15	8	Stress	HM (1 episode)	MA	–	MA, MO, vestibular migraine	Spain	–
161	M	20	11	–	SHM	–	–	–	Spain	–
322B	F	47	<10	–	FHM	MA	Interictal cerebellar signs	HM, interictal nystagmus	Spain	p.Thr666Met (CACNA1A)
388A	F	15	11	–	FHM	–	–	HM	Spain	–
391A	F	11	5	Stress	SHM	Generalized seizure, transient cerebral edema on MRI	–	MO	Greece	p.Ser218Leu (CACNA1A, de novo)
431	F	42	38	Stress	SHM	–	–	MO	Spain	–
475	F	50	14	–	FHM	–	–	HM	Spain	–
I713	M	37	12	–	FHM	MA	–	HM, MA	Spain	–
G248	F	43	17	Stress, menses	SHM	Aphasia	–	–	Spain	–
8873	F	37	9	–	FHM	Aphasia, transient episodes of bilateral visual loss	–	HM	Spain	–
I310	F	47	15	Stress, strong odors	FHM	Partial epileptic seizures	–	HM	Spain	p.Ala606Thr (ATP1A2)
387A	M	10	2	Head injury	FHM	Febrile seizures	Tension-type headache	HM	Greece	p.Glu825Lys (ATP1A2)
489A	F	8	5	–	FHM	Prolonged dysphasia/confusion	Nystagmus, cerebellar atrophy on MRI	MA, panic attacks	Spain	–

HM, hemiplegic migraine; FHM, familiar hemiplegic migraine; SHM, sporadic hemiplegic migraine; MA, migraine with aura; MO, migraine without aura; EA2, episodic ataxia type 2; MRI, magnetic resonance imaging.

pClamp8 software (Axon Instruments, Foster City, CA) was used for pulse generation, data acquisition, and subsequent analysis.

Peak inward Ca^{2+} currents were measured from cells clamped at -80 mV and pulsed for 20 msec from -60 mV to $+70$ mV in 5 mV steps. A modified Boltzmann equation

(eq. 1) was fitted to normalized current voltage ($I-V$) to obtain the voltage dependence of activation. The voltage dependence of steady-state inactivation was estimated by measuring peak I_{Ca} currents at $+20$ mV following 30-sec steps to various holding potentials (conditioning pulses) between -80 and $+5$ mV. During the time interval between

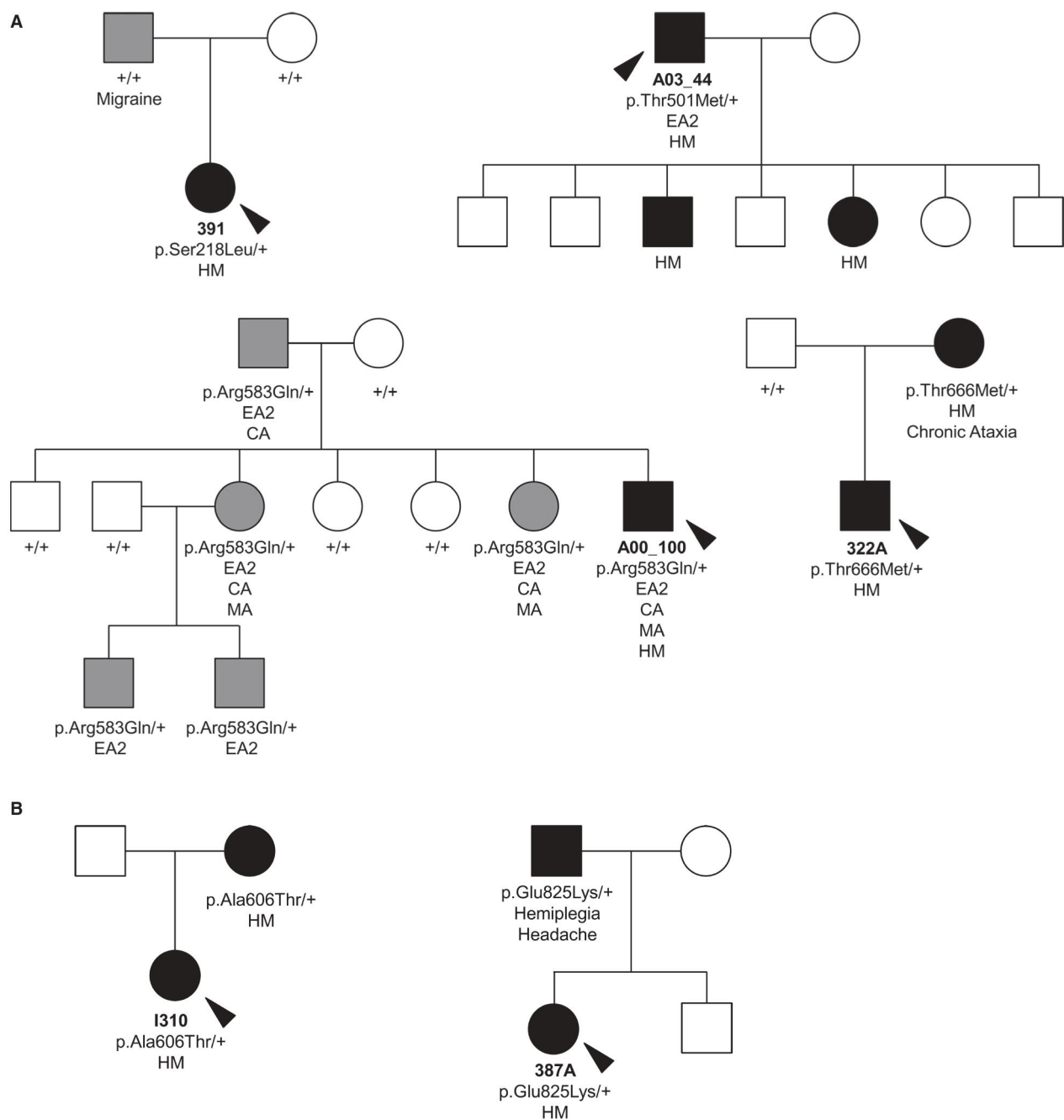


Figure 1. Pedigrees of patients with the identified gene variants. (A) Mutations in the *CACNA1A* gene. (B) Mutations in the *ATP1A2* gene. Affected individuals are denoted by solid symbols; hemiplegic migraine (HM) in black and other phenotypes in gray; squares indicate males and circles females. Probands are indicated by a black arrow. Clinical characteristics are indicated below each individual (HM, migraine with hemiplegic aura; MA, migraine with aura; CA, cerebellar atrophy; EA2, episodic ataxia type 2). Gene variant carrier status is indicated below each patient when known. Mutation p.Ser218Leu appeared de novo in the affected sib.

test pulses (20 msec) cells were held at -80 mV. I_{Ca} currents obtained following the conditioning pulses were normalized to maximal I_{Ca} to determine the persistent current. Half-maximal voltage ($V_{1/2, inact}$) was obtained by fitting the data to the following Boltzmann equation (eq. 2). All

experiments were carried out at room temperature ($22-24^{\circ}\text{C}$).

$$I = G_{\max}(V - V_{\text{rev}})/(1 + \exp(-[V - V_{1/2, \text{act}}]/k_{\text{act}})) \quad (1)$$

$$I/I_{\max} = 1/(1 + \exp([V - V_{1/2, \text{inact}}]/k_{\text{inact}})) \quad (2)$$

Table 2. Disease-causing mutations identified in the *CACNA1A* and *ATP1A2* genes in hemiplegic migraine patients.

Patient	Gene	Mutation position				Detection method	Phenotype	Previously reported in other patients	Reference
		Protein	cDNA	Exon	Protein domain				
391A	<i>CACNA1A</i>	p.Ser218Leu	c.653C>T	5	Cytoplasmic, IS4-5	– <i>TaqI</i>	SHM and generalized seizures	HM	Kors et al. (2001, #164)
A03_44	<i>CACNA1A</i>	p.Thr501Met	c.1502C>T	11	Transmembrane, S1 DII	+ <i>FatI</i>	FHM, progressive ataxia	EA2	Mantuano et al. (2010, #165)
A00_100	<i>CACNA1A</i>	p.Arg583Gln	c.1748G>A	13	Transmembrane, S4 DII	– <i>BanII</i>	FHM, EA2, progressive ataxia	HM	Ducros et al. (2001, #166)
322B	<i>CACNA1A</i>	p.Thr666Met	c.1997C>T	17	Transmembrane, hairpin loop DII	+ <i>BclI</i>	FHM, MA	HM	Ophoff et al. (1996, #119)
387A	<i>ATP1A2</i>	p.Glu825Lys	c.2473G>A	18	Cytoplasmic loop, L6/7	– <i>PvuII</i>	FHM	No	–
I310	<i>ATP1A2</i>	p.Ala606Thr	c.1816G>A	13	Cytoplasmic loop, M4/5	+ <i>HhaI</i>	FHM, partial epileptic seizures	HM	Riant et al. (2005, #922)

HM, hemiplegic migraine; FHM, familiar hemiplegic migraine; SHM, sporadic hemiplegic migraine; MA, migraine with aura; EA2, episodic ataxia type 2.

Statistics

Data are presented as the means \pm SEM. Student's *t* test or Mann–Whitney test was used for statistical analysis, as appropriate. The *t* test assumes that data are sampled from population that follow a normal distribution and with equal standard deviations. Therefore, the use of the Mann–Whitney test is justified either if at least one of the two population data that are compared fails the normality test (using the Kolmogorov–Smirnov method) or if there are significant differences among the standard deviations of the two populations. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

Functional analysis of *ATP1A2*

Cell viability assay

HeLa cells were transfected with 2 μ g of constructs using Lipofectamine 2000 (Invitrogen, Carlsbad, CA). Forty-eight hours after transfection, 2/3 of the cells were harvested for Western blot analysis and 1/3 of cells were seeded in petri dishes. After 24 h, the Na⁺/K⁺-ATPase inhibitor ouabain (1 μ mol/L) was added to the medium (Dulbecco's modified eagle medium containing 10% fetal calf serum and 1% Penicillin-Streptomycin). After 48 h of ouabain exposition, cell viability was quantified with the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) reduction assay (De Fusco et al. 2003; Vanmolkot et al. 2003).

Western blot analysis

A volume of 25 μ g of total protein extract (per lane) was subjected to 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. Gels were transblotted to a nitrocellulose membrane and were incubated overnight with monoclonal antibodies against c-Myc (4 μ g/mL). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins were used as a secondary antibody. Proteins were visualized with the enhanced chemiluminescence kit (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, U.K.). Blots were probed with antitubulin antibodies as a loading control.

Statistics

We performed four independent experiments, each with triplicate measurements, and carried out statistical analyses by the Student's *t* test, considering one-tail distribution and two-sample equal variance (homoscedastic). Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Clinical data

Eighteen patients with HM and other accompanying clinical features were identified and screened for mutations in the *CACNA1A* and *ATP1A2* genes. Eleven were classified

as FHM and seven as SHM. The clinical characteristics of all patients are summarized in Table 1.

As previously described, we observed a preponderance of female patients in our HM population (13 female patients/five male patients). Age of onset was known for 17 cases. Seven patients presented onset within the first decade; the youngest age of presentation of hemiplegia was at age 2 in one FHM case (#387A). Onset in post-puberty or adolescence was documented in nine patients while in one case (#431) an unusual late onset in the fourth decade was reported. The episodes triggering factors did not differ from those commonly associated with common migraine, except for mild head trauma-induced attacks in case #387A, bearing an *ATP1A2* mutation.

Other ictal manifestations were common in this cohort of HM patients: four cases developed migraine with typical visual or sensory aura and one migraine without aura (MO) episodes; three had episodes of aphasia or dysphasia, presumably the expression of migrainous aura, in the absence of concurrent hemiplegia. Two patients developed epileptic seizures, one partial and one generalized, and one patient had a history of febrile seizures; transient visual loss and episodic ataxia were described in one case each.

Four patients had interictal, permanent neurological abnormalities, mainly a cerebellar syndrome featuring nystagmus and different degrees of chronic ataxia. Three or these harbored mutations in one of the two analyzed genes. All patients were subjected to MRI studies. The only remarkable neuroradiologic findings were chronic cerebellar atrophy in three cases and cerebral edema at the time of the episodes in one case. The remaining patients did not have any chronic disability and had normal interictal exams (Table 1).

A more detailed clinical description of patient #387A and his father, bearing a previously undescribed mutation in the *ATP1A2* gene, is provided as supplementary material (see Data S1).

Genetic analysis

The extensive sequencing of the *CACNA1A* gene in 18 subjects with HM allowed the identification of four previously reported changes in four unrelated families. In the remaining 14 patients, a novel and a previously described mutation was detected in the *ATP1A2* gene (Table 2 and Fig. 2). The presence of all these variants was confirmed by restriction analysis of the corresponding PCR products (Table 2). The identified changes were not present in 100 Spanish nonmigraineurs. The novel p.Glu825Lys mutation in the *ATP1A2* gene, identified in a Greek patient, was also absent from a set of 100

healthy Greek individuals. One of the changes, p.Ser218Leu, was present in the affected sib, but not in her parents, indicating a de novo origin (Fig. 1A). False paternity was excluded by genotyping 16 polymorphic microsatellite markers in all the family members (data not shown).

All the identified mutations led to amino acid substitutions (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln, and p.Thr666Met in *CACNA1A*; p.Glu825Lys and p.Ala606Thr in *ATP1A2*). One of them, p.Glu825Lys in *ATP1A2*, is described here for the first time. The rest of the changes had previously been reported in other patients from several countries, four of them in HM and only one, p.Thr501Met in *CACNA1A*, in association with another phenotype, EA2.

The *CACNA1A*-p.Thr501Met mutation, described only once prior to this study, and the novel missense mutation p.Glu825Lys in *ATP1A2*, both of them subjected to functional studies in this study (see below), alter amino acid residues that are highly conserved in evolution as shown by a comparison of their paralogous and orthologous counterparts (Fig. 3). The p.Glu825Lys variant segregates with the HM phenotype, being transmitted from the affected father to the affected sib (Fig. 1B; for a detailed clinical description see Data S1). DNA was not available from the p.Thr501Met family, where a son and a daughter of the studied proband (#A03_44) have also been diagnosed with HM.

The 12 patients with no mutations identified after extensive *CACNA1A* and *ATP1A2* sequencing, as well as 18 HM patients negative for a mutational screening performed in our previous study (Cuenca-Leon et al. 2008), were subjected to MLPA/QMPSF quantitative analysis to seek duplications/deletions in the *CACNA1A* gene. However, no structural variations were found in these probands.

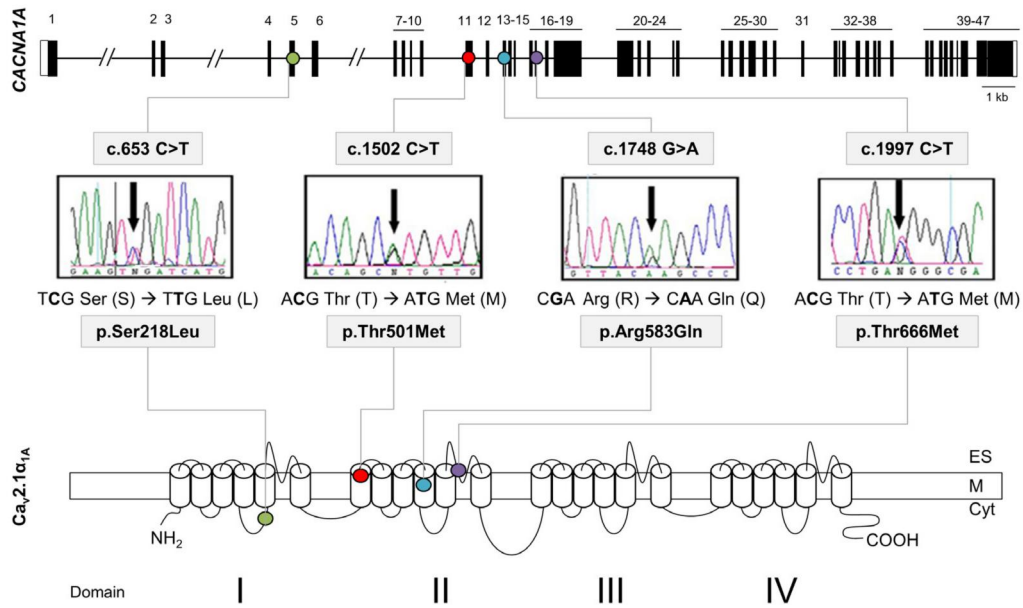
Functional studies

We subjected two of the identified mutations, p.Thr501Met (*CACNA1A*) and p.Glu825Lys (*ATP1A2*), to functional analyses. These changes are the only ones that had not previously been studied by other authors at the functional level.

***CACNA1A* (p.Thr501Met): current density and activation/inactivation voltage dependence of heterologously expressed Ca_v2.1 (P/Q) channels**

Mutation p.Thr501Met changes a hydrophilic amino acid to a hydrophobic one and is located in a functionally important region of the human α_{1A} subunit of the neuronal Ca_v2.1 (P/Q-type) Ca²⁺ channel (Fig. 2A). It lies in

A CACNA1A



B ATP1A2

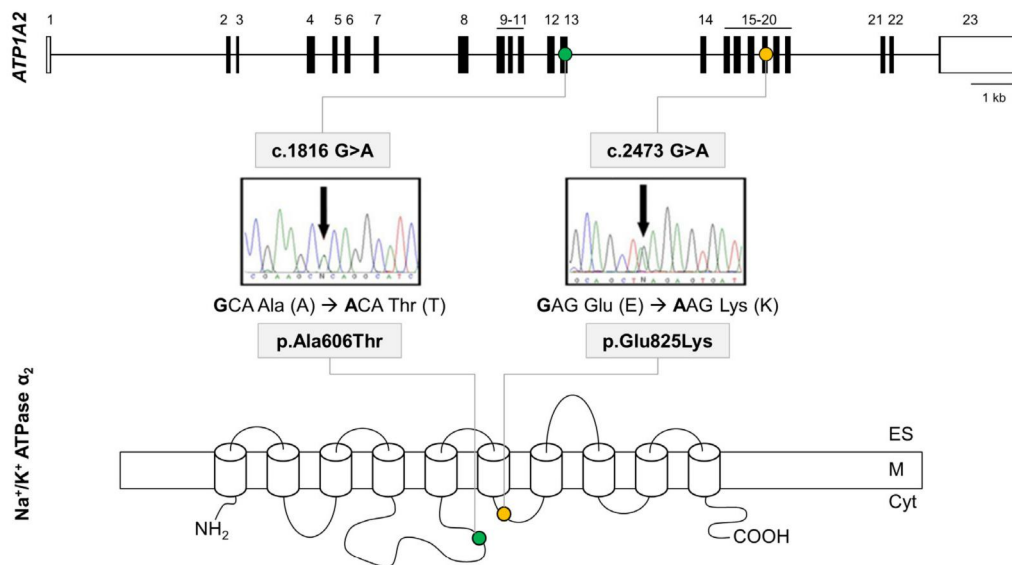


Figure 2. Gene structure of *CACNA1A* and *ATP1A2* and detection of mutations. (A) 1: *CACNA1A* gene structure, with black boxes indicating exons. The identified mutations causing HM are indicated by colored dots: p.Ser218Leu (light green), p.Thr501Met (red), p.Arg583Gln (blue), and p.Thr666Met (purple). 2: Protein structure and location of the identified mutations. (B) 1: *ATP1A2* gene structure, with black boxes indicating exons. The newly identified mutation p.Glu825Lys causing HM is indicated by a yellow dot and p.Ala606Thr with a green dot. 2: Protein structure and location of the identified mutations. Detection of the mutations by direct sequencing of PCR products: electropherograms. Cyt, cytoplasm; M, cytoplasmic membrane; ES, extracellular space.

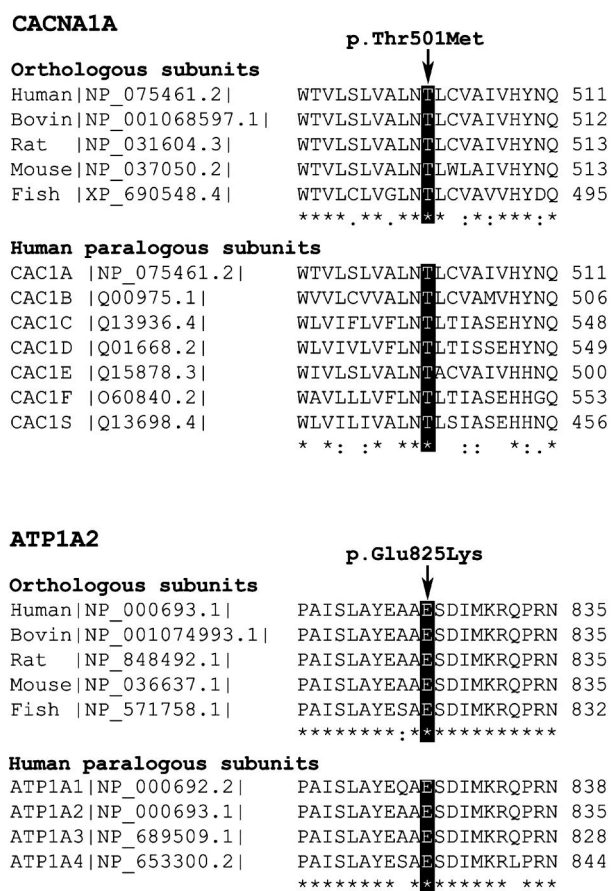


Figure 3. Protein alignment performed with ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2>) (Chenna et al. 2003). On top, the *CACNA1A* Thr501 residue is conserved in all the human calcium channel α_1 subunits studied (CACNA1A, B, C, D, E, F, and S) and in the orthologous *CACNA1A* proteins of several organisms. Bottom, the *ATP1A2* Glu825 residue is conserved in the four human ATP1 paralogous subunits (ATP1A1, A2, A3, and A4) and in orthologous ATP1A2 proteins of several organisms. Key: "*" identical residues; ":" conserved substitutions (same amino acid group); "." semi-conserved substitution (similar shapes). Human: *Homo sapiens*; Bovine: *Bos taurus*; Rat: *Rattus norvegicus*; Mouse: *Mus musculus*; Fish (Zebrafish): *Danio rerio*.

the S1 segment of domain II (II-S1) (Fig. 2A), which makes up part of the voltage sensor (Tombola et al. 2006). Because in a previous study of a patient with HM we found that another S1 mutation, p.Tyr1245Cys in domain III of the protein mainly affected voltage dependence of both activation and inactivation of the channel (Serra et al. 2009), we focused our functional analysis of the p.Thr501Met mutation on those same parameters.

Maximum current densities resulting from expression of mutant p.Thr501Met α_{1A} ($\alpha_{1A(T501M)}$) were significantly higher than current densities of wild-type (WT) α_{1A} channels ($P < 0.05$) in a physiological range of depo-

larized voltages (from -15 to $+5$ mV) (Fig. 4A and B, left panel). The potential for half-maximal activation ($V_{1/2, act}$) was also significantly ($P < 0.0001$) shifted to hyperpolarized potentials for p.Thr501Met channels (by ~ 7 mV) (Fig. 4B, right panel). Consistently, the maximum current amplitude was elicited by depolarizing pulses to $\sim +15$ mV or $\sim +5$ to $+10$ mV for WT or p.Thr501Met channels, respectively (Fig. 4A and B). The half-maximal voltage for steady-state inactivation ($V_{1/2, inact}$) induced by 30-sec-conditioning prepulses between -80 and $+5$ mV was left-shifted (~ 12 mV) in p.Thr501Met channels ($P < 0.0001$). (Fig. 4C and D).

ATP1A2 (p.Glu825Lys): Ouabain resistance survival assays

p.Glu825Lys exchanges a negatively charged residue for a positive one and is located in the intracellular L6/7 loop of the ATP1A2 protein, between the transmembrane segments M6 and M7 (Fig. 2B). Potential pathogenicity of the mutation p.Glu825Lys was indirectly tested through ouabain resistance survival assays.

HeLa cells transfected with the α_2 _oua_825Lys construction showed a 10% survival rate, compared with cells transfected with α_2 _oua_ WT ($P < 0.0003$) (Fig. 5A). Western blot analysis of HeLa extracts obtained after transfection with the mutant and WT constructions showed a diminished amount of 825Lys protein compared with the WT, indicating that the altered protein may be unstable (Fig. 5B).

Discussion

We have identified six potentially disease-causing missense mutations in the *CACNA1A* and *ATP1A2* genes in a cohort of 18 unrelated probands with HM from Spain and Greece (33% of patients covered).

There is evidence supporting the finding that the identified amino acid substitutions are indeed disease-causing mutations: (1) When family material was available, the mutations cosegregated with the disease phenotype within the families, (2) the changes were not present in at least 200 chromosomes from unaffected individuals nor in the main public single-nucleotide polymorphism databases (Hapmap, dbSNP), (3) no other molecular alterations were identified within the studied genes after the analysis of the whole coding region and the exon-intron boundaries, including splice sites, branch points, the promoter, and the 3'UTR region in *CACNA1A*, (4) for the two mutations subjected to functional studies the involved amino acid residues are strongly conserved in evolution, both at the intraspecific (*CACNA1A*, B, C, D, E, F, S or ATP1A1, A2, A3, A4) and interspecific levels (*CACNA1A*

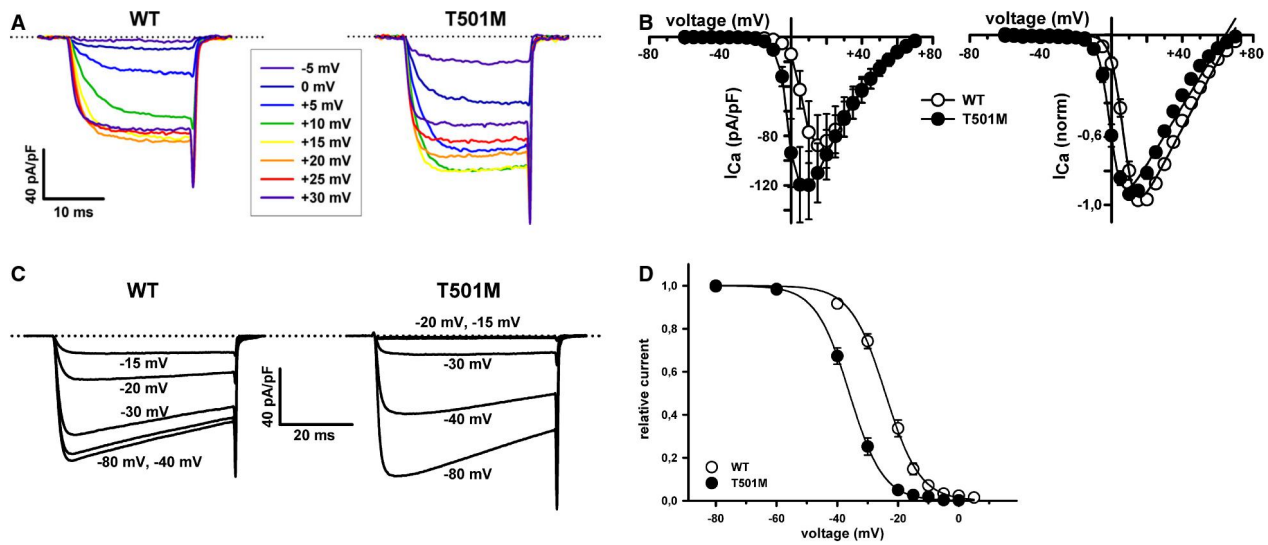


Figure 4. Mutation p.Thr501Met affects activation and inactivation properties of heterologously expressed P/Q channels. (A) Current traces illustrating voltage dependence of WT (left) and p.Thr501Met (right) P/Q channels, in response to 20 msec voltage pulses. Dotted lines in the current traces indicate the zero current level. (B) Current density–voltage relationships (left panels) and normalized I–V curves (right panels) for WT (○) and p.Thr501Met (●) P/Q channels expressed in HEK 293 cells. $V_{1/2, \text{act}}$ and k_{act} values were (in mV): WT (○, $n = 9$) 7.1 ± 0.8 and 3.3 ± 0.3 ; p.Thr501Met (●, $n = 14$) -0.04 ± 0.99 and 2.8 ± 0.3 , respectively. No significant difference was found for k_{act} values ($P = 0.29$). (C and D) Steady-state inactivation of WT or p.Thr501Met P/Q channels. Amplitudes of currents elicited by test pulses to +20 mV were normalized to the current obtained after a 30-sec prepulse to –80 mV and fitted by a single Boltzmann function (see Materials and Methods, eq. 2). $V_{1/2, \text{inact}}$ and k_{inact} values were (in mV): WT (○, $n = 10$) -24.2 ± 0.9 and -5.5 ± 0.4 ; p.Thr501Met (●, $n = 15$) -35.9 ± 1 and -5 ± 0.2 , respectively. No significant difference was found for k_{inact} values ($P = 0.53$).

or ATP1A2 subunits from human, cattle, rat, mouse and zebrafish), indicating functional/structural relevance, (5) all these mutations but one (p.Glu825Lys) have been reported previously in other HM or EA2 cohorts, and (6) functional analyses reported here (p.Thr501Met in *CACNA1A* and p.Glu825Lys in *ATP1A2*) and by other authors (p.Ser218Leu [Tottene et al. 2005; Weiss et al. 2008; Debiais et al. 2009; Adams et al. 2010], p.Arg583Gln [Kraus et al. 2000] and p.Thr666Met [Kraus et al. 1998; Tottene et al. 2002] in *CACNA1A*; p.Ala606Thr [Jen et al. 2007; Tavraz et al. 2008] in *ATP1A2*) demonstrate functional consequences of all six changes suggesting pathogenicity.

Interestingly, all but one of the patients that have HM plus additional ictal/interictal neurological features or atypical paroxysmal signs (e.g., epilepsy or cerebral edema on MRI) bore mutations in one of the two genes studied. In general, this was not the case for patients without such “extended” HM phenotype, with no mutations identified in those genes. The molecular defects associated with this extended phenotype are unlikely to mimic those present in common migraine. It is, however, possible that HM cases without known mutation and with less severe clinical presentations, which often overlap with common migraine (in our series most had MO and MA attacks in addition to HM) may represent a better model for pri-

mary headaches. In this regard, deciphering the molecular basis of this group of patients may shed new light on the global landscape of migraine genetics.

CACNA1A screening

Four patients presented missense mutations in the *CACNA1A* gene, all of them described in previous screenings by other authors: p.Ser218Leu, p.Arg583Gln, p.Thr666Met, and p.Thr501Met (Fig. 2A).

p.Ser218Leu

This change was identified as a *de novo* mutation in a SHM patient with aphasia, transient cerebral edema and generalized seizures. This transition in a CpG dinucleotide had been described in eight HM patients (Kors et al. 2001; Curtain et al. 2006; Chan et al. 2008; Debiais et al. 2009; Stam et al. 2009; Zangaladze et al. 2010) having appeared *de novo* in two of them (Stam et al. 2009). Previous electrophysiological studies for the p.Ser218Leu mutation revealed a lower activation threshold, an increase of channel recovery after inactivation (Tottene et al. 2005) and the reduction of the inhibitory pathway carried by G-protein-coupled-receptor activation (Weiss et al. 2008). This dramatic gain of function, compared to

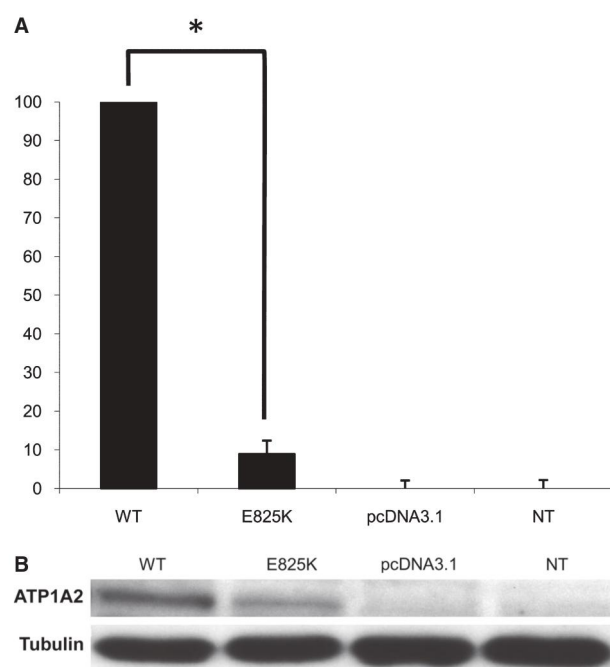


Figure 5. (A) Viability of HeLa cells transfected with the mutant *ATP1A2* cDNA (E825K) normalized to the viability of cells transfected with the ouabain-resistant wild-type *ATP1A2* cDNA (WT). NT, untransfected cells; pcDNA3.1, cells transfected with the empty vector. Four independent experiments were performed, each with triplicate measurements. The * symbol indicates the existence of significant differences between the p.Glu825Lys and the WT *ATP1A2* constructs ($P < 0.0003$). (B) Western blot assay of the different protein extracts using anti-myc and anti-tubulin antibodies. The molecular weight of the Na^+/K^+ -ATPase α_2 subunit and tubulin are indicated. The constructs with the *ATP1A2* ouabain-resistant cDNA carry the myc tag. The clone with the mutation displayed diminished band intensity.

other missense changes, is thought to explain the severe clinical outcome observed in the patients carrying this mutation. Studies with a mouse model provide evidence that p.Ser218Leu mutations directly affect Ca^{2+} -dependent facilitation and synaptic plasticity (Adams et al. 2010).

p.Arg583Gln

This prevalent mutation has been previously identified in FHM families and in sporadic patients (Battistini et al. 1999; Ducros et al. 2001; Terwindt et al. 2002; Alonso et al. 2003; Thomsen et al. 2007; Riant et al. 2010a). In family #A00_100, only the proband presents HM (Fig. 1A) and the mutation cosegregates with EA2, cerebellar atrophy and/or HM. Previous functional studies for the p.Arg583Gln mutation revealed a change in the voltage dependence of activation and inactivation toward more negative potentials due to the neutralization of resi-

due 583 that is positively charged in the WT channel, and a decrease in the recovery of inactivation (Kraus et al. 2000).

p.Thr666Met

This is also a prevalent mutation that has previously been found in 24 FHM or SHM probands (Ophoff et al. 1996; Ducros et al. 1999; Friend et al. 1999; Terwindt et al. 2002; Wada et al. 2002; Kors et al. 2003; Thomsen et al. 2007; Freilinger et al. 2008; Yabe et al. 2008; Riant et al. 2010a). Functional studies in heterologous systems showed a gain of function through the following mechanisms: a decrease in the recovery after inactivation (Kraus et al. 1998) and increased Ca^{2+} influx through the channel in a broad voltage range around the threshold of activation, which was also reduced (Tottene et al. 2002).

p.Thr501Met

This change, found in patient #A03_044 with FHM, nystagmus, and episodic and progressive ataxia, has been described in another family with EA2 (Mantuano et al. 2010) and in a case with bouts of episodic ataxia and confusion but no hemiplegia, in association with vermian cerebellar atrophy (Cleves et al. 2009). This is the second reported mutation in the S1 segment in any domain of the α_{1A} subunit in patients with HM. As the previously described p.Tyr1245Cys (Serra et al. 2009), p.Thr501Met alters channel activation and inactivation. It promotes channel activity by shifting the current activation curve to lower voltages (~ 9 mV) and increasing Ca^{2+} current density to a range of voltages that neurons can encounter during action potential firing. p.Thr501Met also shifts voltage-dependent steady-state inactivation to less depolarized voltages (~ 15 mV). These results further support an important role of the S1 segments in the function of voltage sensors leading to channel gating (Campos et al. 2007).

The functional consequences of mutation p.Thr501Met are consistent with a causative role in the disease. In this respect, a reduction in the voltage threshold of channel activation by ~ 10 mV is a trait shared by all FHM-causing mutations in *CACNA1A* (van den Maagdenberg et al. 2004; Tottene et al. 2005). Such gain of channel function specifically promotes cortical excitatory neurotransmission and favors cortical spreading depression (CSD) initiation and propagation in FHM knock-in (KI) mouse models (Tottene et al. 2009), which has been pointed out as the cause of the aura and migraine itself (Bolay et al. 2002; Pietrobon 2007).

Mutations in *CACNA1A* are also associated with other autosomal dominant neurological disorders characterized

by cerebellar dysfunction, such as EA2 (Ophoff et al. 1996). However, contrary to FHM mutations, most EA2 mutations produce loss-of-channel function (Strupp et al. 2007). Our patient carrying the p.Thr501Met CACNA1A mutation also developed cerebellar symptoms. This also occurred with other FHM-causing CACNA1A mutations (Ducros et al. 2001). As yet, it is not clear why some CACNA1A mutations cause pure FHM and other FHM with cerebellar signs, as functional studies in vitro do not reveal any notable difference among these two groups of FHM mutations (Pietrobon 2007). Nevertheless, the study of p.Arg192Gln and p.Ser218Leu KI animals may help us to unveil the role of FHM CACNA1A mutations in EA2 (van den Maagdenberg et al. 2004, 2010). While homozygous p.Arg192Gln (RQ/RQ) and heterozygous p.Ser218Leu (SL/WT) mice did not exhibit an overt phenotype, homozygous p.Ser218Leu (SL/SL) KI model exhibited the main features of the severe p.Ser218Leu clinical syndrome, including mild permanent cerebellar ataxia (van den Maagdenberg et al. 2004, 2010).

ATP1A2 screening

p.Ala606Thr

This mutation was found in a patient with FHM and focal epileptic seizures. It has previously been reported in three FHM families (Jen et al. 2007; Riant et al. 2005). Functional assays on HeLa cells transfected with WT and mutant ATP1A2 constructs suggested a loss of function of the sodium–potassium pump (Jen et al. 2007). Same results were found for mutations p.N717K and p.P786L, also located in the L4/5 cytoplasmic loop of the protein (Jen et al. 2007; Tavraz et al. 2008). A more detailed electrophysiological functional study showed that the Na⁺/K⁺-ATPase activity was decreased due to a lower affinity for potassium (Tavraz et al. 2008).

p.Glu825Lys

This novel change, located in the L6/7 loop (Fig. 2B), was identified in an individual with HM and seizures. Ouabain-resistant survival assays showed a decrease in cell viability in HeLa cells transfected with the mutant ATP1A2 construct (Fig. 5A), again supporting the idea that the mutation results in loss of function of the sodium–potassium pump. Also, Western blot analysis suggests that the mutant protein may be unstable. Other mutations in this loop that have been identified by others and were functionally tested are as follows: p.Met829Arg, p.Arg384*, and p.Arg834Gln (de Vries et al. 2007; Tavraz et al. 2008). p.Arg834* showed no cell survival in ouabain challenge assays, and electrophysiological analyses of

p.Arg834Gln displayed altered affinities for extracellular cations or reduced enzyme turnover. It was suggested that negatively charged residues in loop L6/7 contribute to the initial recognition of Na⁺ or K⁺ ions and constitute the cytoplasmic cation entry port (Shainskaya et al. 2000; Jorgensen et al. 2003). Other experiments found that loop L6/7 is important in the transmission of the activation signal initiated by cation binding to the phosphorylation domain of the protein (Xu et al. 2003). These experiments included a Glu to Ala mutation in a Ca²⁺-ATPase that is equivalent to the p.Glu825Lys identified in our patient.

Unidentified mutations/genes

Overall, 12 of 18 HM patients included in this study do not bear mutations in either CACNA1A or ATP1A2. Considering also the HM patients screened by us in a previous study (Cuenca-Leon et al. 2008), the level of molecular identification is 9/39 (23%), suggesting the involvement of other genes that still need to be uncovered. In sum, from these 39 patients, 22 were FHM (eight bearing mutations, 36%) and 17 were SHM (only one identified mutation, 6%). These data are in line with previous studies where the coverage was around 40% in FHM patients (Riant et al. 2005) and between 7% and 16% in SHM (Terwindt et al. 2002; de Vries et al. 2007), indicating that CACNA1A and ATP1A2 are major genes in the familial forms of HM but not in the sporadic ones, where there might be a larger genetic heterogeneity and/or other contributing factors. Only in one study with SHM patients presenting an early-onset of the disease the coverage was higher when analyzing the CACNA1A, ATP1A2, and SCN1A genes (Riant et al. 2010a). It is also possible that a few pathogenic mutations have remained unidentified in the two genes studied, including changes in introns or in distant regulatory regions, or CNVs in ATP1A2 that may be undetectable by PCR. Previously, a large rearrangement in the CACNA1A gene was described in a SHM patient (Labrum et al. 2009), and so it is conceivable that deletions or duplications in ATP1A2 could also be responsible for the disorder. However, CNV analysis has only reported this single deletion in CACNA1A so far in HM, and this type of alteration is more frequently found in episodic ataxia, where the typical pathogenic mechanism is a loss of function of the channel (Riant et al. 2008, 2010b; Labrum et al. 2009; Wan et al. 2011).

Mutations in SLC4A4 have been reported in pedigrees with proximal renal tubular acidosis (pRTA) with HM and migraine (Demirci et al. 2006; Suzuki et al. 2010), but this gene was not considered in this study as none of

the patients in our series showed renal abnormalities. Mutations in the *SCN1A* gene, previously linked to FHM and involved in several forms of epilepsy, would appear to be a rather unusual cause of HM. Indeed, more than 700 mutations have been identified in *SCN1A* with SMEI compared to just five in FHM (<http://www.molgen.vib-ua.be/SCN1AMutations>) (Claes et al. 2009). Furthermore, very recently the genetic heterogeneity of HM phenotype has been broadened with the *PRRT2* gene, previously related to paroxysmal kinesigenic dyskinesia and other episodic disorders. Eight mutations have been reported in 249 screened HM cases (Cloarec et al. 2012; Dale et al. 2012; Gardiner et al. 2012; Marini et al. 2012; Riant et al. 2012). Both *SCN1A* and *PRRT2* may be targeted by sequencing in the future, although they are not expected to explain a substantial proportion of our unresolved HM cases.

Finally, at least one other FHM locus has been mapped out of the three known *loci*, at 14q32, but the underlying gene still awaits identification (Cuenca-Leon et al. 2009). It is very likely that most of the unresolved 12 HM patients from the present cohort and 18 HM patients from a previous study by our group (Cuenca-Leon et al. 2008) bear mutations in other yet unknown HM genes that need to be uncovered. Thus, future studies will use whole-exome sequencing to find new genes responsible for the disease.

Acknowledgments

We thank the patients and their families for their participation. We are grateful to G. Casari (Vita-Salute San Raffaele University, Italy), who kindly provided us with the *ATP1A2* cDNA ouabain-resistant construct with the myc tag. We also thank J. Striessnig (University of Innsbruck, Austria) for the gift of human *CACNA1A* cDNA and F. Riant (Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hôpital Lariboisière AP-HP, France) for providing us with positive controls for the CNV analyses. The work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) and Plan E (Grants SAF2012-31089, SAF2012-38140, BES-2010-033895, SAF2009-13182-C03-01, SAF2009-13182-C03-02, and SAF2009-13182-C03-03), Fondo de Investigación Sanitaria (Cardiovascular Disease Network RD12/0042/0014) and Generalitat de Catalunya (grants 2009SGR0971, 2009SGR0078 and 2009SGR1369). M. A. V. and N. F.-C. are the recipients of an ICREA Academia Award (Generalitat de Catalunya) and a grant from "CIBER-ER," respectively. C. T. was supported by the European Union (Marie Curie, PIEF-GA-2009-254930).

Conflict of Interest

None declared.

References

- Adams, P. J., R. L. Rungta, E. Garcia, A. M. van den Maagdenberg, B. A. MacVicar, and T. P. Snutch. 2010. Contribution of calcium-dependent facilitation to synaptic plasticity revealed by migraine mutations in the P/Q-type calcium channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:18694–18699.
- Alonso, I., J. Barros, A. Tuna, J. Coelho, J. Sequeiros, I. Silveira, et al. 2003. Phenotypes of spinocerebellar ataxia type 6 and familial hemiplegic migraine caused by a unique *CACNA1A* missense mutation in patients from a large family. *Arch. Neurol.* 60:610–614.
- Bassi, M. T., N. Bresolin, A. Tonelli, K. Nazos, F. Crippa, C. Baschiroto, et al. 2004. A novel mutation in the *ATP1A2* gene causes alternating hemiplegia of childhood. *J. Med. Genet.* 41:621–628.
- Battistini, S., S. Stenirri, M. Piatti, C. Gelfi, P. G. Righetti, R. Rocchi, et al. 1999. A new *CACNA1A* gene mutation in acetazolamide-responsive familial hemiplegic migraine and ataxia. *Neurology* 53:38–43.
- Bolay, H., U. Reuter, A. K. Dunn, Z. Huang, D. A. Boas, and M. A. Moskowitz. 2002. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat. Med.* 8:136–142.
- Campos, F. V., B. Chanda, B. Roux, and F. Bezanilla. 2007. Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104:7904–7909.
- Carreño, O., M. T. Garcia-Silva, O. Garcia-Campos, A. Martinez-de Aragon, B. Cormand, and A. Macaya. 2011. Acute striatal necrosis in hemiplegic migraine with de novo *CACNA1A* mutation. *Headache* 51:1542–1546.
- Chan, Y. C., J. M. Burgunder, E. Wilder-Smith, S. E. Chew, K. M. Lam-Mok-Sing, V. Sharma, et al. 2008. Electroencephalographic changes and seizures in familial hemiplegic migraine patients with the *CACNA1A* gene *S218L* mutation. *J. Clin. Neurosci.* 15:891–894.
- Chenna, R., H. Sugawara, T. Koike, R. Lopez, T. J. Gibson, D. G. Higgins, et al. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res.* 31:3497–3500.
- Claes, L. R., L. Deprez, A. Suls, J. Baets, K. Smets, T. Van Dyck, et al. 2009. The *SCN1A* variant database: a novel research and diagnostic tool. *Hum. Mutat.* 30:E904–E920.
- Cleves, C., S. Parikh, A. D. Rothner, and S. J. Tepper. 2009. Link between confusional migraine, hemiplegic migraine and episodic ataxia type 2: hypothesis, family genealogy, gene typing and classification. *Cephalalgia* 30:740–743.
- Cloarec, R., N. Bruneau, G. Rudolf, A. Massacrier, M. Salmi, M. Bataillard, et al. 2012. *PRRT2* links infantile convulsions

- and paroxysmal dyskinesia with migraine. *Neurology* 79:2097–2103.
- Cuenca-Leon, E., R. Corominas, N. Fernandez-Castillo, V. Volpini, M. Del Toro, M. Roig, et al. 2008. Genetic analysis of 27 Spanish patients with hemiplegic migraine, basilar-type migraine and childhood periodic syndromes. *Cephalalgia* 28:1039–1047.
- Cuenca-Leon, E., R. Corominas, M. Montfort, J. Artigas, M. Roig, M. Bayes, et al. 2009. Familial hemiplegic migraine: linkage to chromosome 14q32 in a Spanish kindred. *Neurogenetics* 10:191–198.
- Curtain, R. P., R. L. Smith, M. Ovcarić, and L. R. Griffiths. 2006. Minor head trauma-induced sporadic hemiplegic migraine coma. *Pediatr. Neurol.* 34:329–332.
- Dale, R. C., A. Gardiner, J. Antony, and H. Houlden. 2012. Familial PRRT2 mutation with heterogeneous paroxysmal disorders including paroxysmal torticollis and hemiplegic migraine. *Dev. Med. Child Neurol.* 54:958–960.
- De Fusco, M., R. Marconi, L. Silvestri, L. Atorino, L. Rampoldi, L. Morgante, et al. 2003. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat. Genet.* 33:192–196.
- Debiais, S., C. Hommet, I. Bonnaud, M. A. Barthez, S. Rimbaut, F. Riant, et al. 2009. The FHM1 mutation S218L: a severe clinical phenotype? A case report and review of the literature. *Cephalalgia* 29:1337–1339.
- Demirci, F. Y., M. H. Chang, T. S. Mah, M. F. Romero, and M. B. Gorin. 2006. Proximal renal tubular acidosis and ocular pathology: a novel missense mutation in the gene (*SLC4A4*) for sodium bicarbonate cotransporter protein (NBCe1). *Mol. Vis.* 12:324–330.
- Dichgans, M., T. Freilinger, G. Eckstein, E. Babini, B. Lorenz-Depiereux, S. Biskup, et al. 2005. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366:371–377.
- Dravet, C. 2011. Dravet syndrome history. *Dev. Med. Child Neurol.* 53(Suppl 2):1–6.
- Ducros, A., C. Denier, A. Joutel, K. Vahedi, A. Michel, F. Darcel, et al. 1999. Recurrence of the T666M calcium channel CACNA1A gene mutation in familial hemiplegic migraine with progressive cerebellar ataxia. *Am. J. Hum. Genet.* 64:89–98.
- Ducros, A., C. Denier, A. Joutel, M. Cecillon, C. Lescoat, K. Vahedi, et al. 2001. The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. *N. Engl. J. Med.* 345:17–24.
- Escayg, A., B. T. MacDonald, M. H. Meisler, S. Baulac, G. Huberfeld, I. An-Gourfinkel, et al. 2000. Mutations of SCN1A, encoding a neuronal sodium channel, in two families with GEFS+2. *Nat. Genet.* 24:343–345.
- Fernandez-Fernandez, J. M., M. Tomas, E. Vazquez, P. Orio, R. Latorre, M. Senti, et al. 2004. Gain-of-function mutation in the KCNMB1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *J. Clin. Invest.* 113:1032–1039.
- Freilinger, T., M. Bohe, B. Wegener, B. Muller-Myhsok, M. Dichgans, and H. Knoblauch. 2008. Expansion of the phenotypic spectrum of the CACNA1A T666M mutation: a family with familial hemiplegic migraine type 1, cerebellar atrophy and mental retardation. *Cephalalgia* 28:403–407.
- Freilinger, T., N. Ackl, A. Ebert, C. Schmidt, B. Rautenstrauss, M. Dichgans, et al. 2011. A novel mutation in CACNA1A associated with hemiplegic migraine, cerebellar dysfunction and late-onset cognitive decline. *J. Neurol. Sci.* 300:160–163.
- Friend, K. L., D. Crimmins, T. G. Phan, C. M. Sue, A. Colley, V. S. Fung, et al. 1999. Detection of a novel missense mutation and second recurrent mutation in the CACNA1A gene in individuals with EA-2 and FHM. *Hum. Genet.* 105:261–265.
- Gardiner, A. R., K. P. Bhatia, M. Stamelou, R. C. Dale, M. A. Kurian, S. A. Schneider, et al. 2012. PRRT2 gene mutations: from paroxysmal dyskinesia to episodic ataxia and hemiplegic migraine. *Neurology* 79:2115–2121.
- Gardner, K., M. M. Barmada, L. J. Ptacek, and E. P. Hoffman. 1997. A new locus for hemiplegic migraine maps to chromosome 1q31. *Neurology* 49:1231–1238.
- Hamill, O. P., A. Marty, E. Neher, B. Sakmann, and F. J. Sigworth. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* 391:85–100.
- International Headache Society (IHS) H.C.S. 2004. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24(Suppl 1):9–160.
- Jen, J. C., A. Klein, E. Boltshauser, M. S. Cartwright, E. S. Roach, H. Mamsa, et al. 2007. Prolonged hemiplegic episodes in children due to mutations in ATP1A2. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 78:523–526.
- Jorgensen, P. L., K. O. Hakansson, and S. J. Karlish. 2003. Structure and mechanism of Na, K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu. Rev. Physiol.* 65: 817–849.
- Knierim, E., L. Leisle, C. Wagner, B. Weschke, B. Lucke, G. Bohner, et al. 2011. Recurrent stroke due to a novel voltage sensor mutation in Cav2.1 responds to verapamil. *Stroke* 42: e14–e17.
- Kors, E. E., G. M. Terwindt, F. L. Vermeulen, R. B. Fitzsimons, P. E. Jardine, P. Heywood, et al. 2001. Delayed cerebral edema and fatal coma after minor head trauma: role of the CACNA1A calcium channel subunit gene and relationship with familial hemiplegic migraine. *Ann. Neurol.* 49:753–760.
- Kors, E. E., J. Haan, N. J. Giffin, L. Pazdera, C. Schnittger, G. G. Lennox, et al. 2003. Expanding the phenotypic spectrum of the CACNA1A gene T666M mutation: a description of 5 families with familial hemiplegic migraine. *Arch. Neurol.* 60:684–688.

- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, H. Glossmann, S. Hering, and J. Striessnig. 1998. Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca²⁺ channel kinetics. *J. Biol. Chem.* 273:5586–5590.
- Kraus, R. L., M. J. Sinnegger, A. Koschak, H. Glossmann, S. Stenirri, P. Carrera, et al. 2000. Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca(2+) channel kinetics. *J. Biol. Chem.* 275:9239–9243.
- Labrum, R. W., S. Rajakulendran, T. D. Graves, L. H. Eunson, R. Bevan, M. G. Sweeney, et al. 2009. Large scale calcium channel gene rearrangements in episodic ataxia and hemiplegic migraine: implications for diagnostic testing. *J. Med. Genet.* 46:786–791.
- Lee, H. Y., Y. Huang, N. Bryneau, P. Roll, E. D. Roberson, M. Hermann, et al. 2012. Mutations in the novel protein PRRT2 cause paroxysmal kinesigenic dyskinesia with infantile convulsions. *Cell Rep.* 1:2–12.
- van den Maagdenberg, A. M., D. Pietrobon, T. Pizzorusso, S. Kaja, L. A. Broos, T. Cesetti, et al. 2004. A CACNA1A knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41:701–710.
- van den Maagdenberg, A. M., T. Pizzorusso, S. Kaja, N. Terpolilli, M. Shapovalova, F. E. Hoebeek, et al. 2010. High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Ca(v)2.1 S218L mice. *Ann. Neurol.* 67:85–98.
- Mantegazza, M., A. Gambardella, R. Rusconi, E. Schiavon, F. Annesi, R. R. Cassulini, et al. 2005. Identification of an Nav1.1 sodium channel (SCN1A) loss-of-function mutation associated with familial simple febrile seizures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:18177–18182.
- Mantuano, E., S. Romano, L. Veneziano, C. Gellera, B. Castellotti, S. Caimi, et al. 2010. Identification of novel and recurrent CACNA1A gene mutations in fifteen patients with episodic ataxia type 2. *J. Neurol. Sci.* 291:30–36.
- Marini, C., V. Conti, D. Mei, D. Battaglia, D. Lettori, E. Losito, et al. 2012. PRRT2 mutations in familial infantile seizures, paroxysmal dyskinesia, and hemiplegic migraine. *Neurology* 79:2109–2114.
- Miller, S. A., D. D. Dykes, and H. F. Polesky. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16:1215.
- Ophoff, R. A., G. M. Terwindt, M. N. Vergouwe, R. van Eijk, P. J. Oefner, S. M. Hoffman, et al. 1996. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543–552.
- Pietrobon, D. 2007. Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* 4:274–284.
- Pietrobon, D. 2013. Calcium channels and migraine. *Biochim. Biophys. Acta* 1828:1655–1665.
- Riant, F., M. De Fusco, P. Aridon, A. Ducros, C. Ploton, F. Marchelli, et al. 2005. ATP1A2 mutations in 11 families with familial hemiplegic migraine. *Hum. Mutat.* 26:281.
- Riant, F., R. Mourtada, P. Saugier-Verber, and E. Tournier-Lasserre. 2008. Large CACNA1A deletion in a family with episodic ataxia type 2. *Arch. Neurol.* 65:817–820.
- Riant, F., A. Ducros, C. Ploton, C. Barbance, C. Depienne, and E. Tournier-Lasserre. 2010a. De novo mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine. *Neurology* 75:967–972.
- Riant, F., C. Lescoat, K. Vahedi, E. Kaphan, A. Toutain, T. Soisson, et al. 2010b. Identification of CACNA1A large deletions in four patients with episodic ataxia. *Neurogenetics* 11:101–106.
- Riant, F., E. Roze, C. Barbance, A. Meneret, L. Guyant-Marechal, C. Lucas, et al. 2012. PRRT2 mutations cause hemiplegic migraine. *Neurology* 79:2122–2124.
- Serra, S. A., N. Fernandez-Castillo, A. Macaya, B. Cormand, M. A. Valverde, and J. M. Fernandez-Fernandez. 2009. The hemiplegic migraine-associated Y1245C mutation in CACNA1A results in a gain of channel function due to its effect on the voltage sensor and G-protein-mediated inhibition. *Pflugers Arch.* 458:489–502.
- Serra, S. A., E. Cuenca-Leon, A. Llobet, F. Rubio-Moscardo, C. Plata, O. Carreño, et al. 2010. A mutation in the first intracellular loop of CACNA1A prevents P/Q channel modulation by SNARE proteins and lowers exocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:1672–1677.
- Shainskaya, A., A. Schneeberger, H. J. Apell, and S. J. Karlisch. 2000. Entrance port for Na(+) and K(+) ions on Na(+), K(+)-ATPase in the cytoplasmic loop between trans-membrane segments M6 and M7 of the alpha subunit. Proximity of the cytoplasmic segment of the beta subunit. *J. Biol. Chem.* 275:2019–2028.
- Stam, A. H., G. J. Luijckx, B. T. Poll-The, I. B. Ginjaar, R. R. Frants, J. Haan, et al. 2009. Early seizures and cerebral oedema after trivial head trauma associated with the CACNA1A S218L mutation. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 80:1125–1129.
- Strupp, M., A. Zwergal, and T. Brandt. 2007. Episodic ataxia type 2. *Neurotherapeutics* 4:267–273.
- Suzuki, M., W. Van Paesschen, I. Stalmans, S. Horita, H. Yamada, B. A. Bergmans, et al. 2010. Defective membrane expression of the Na(+)-HCO(3)(-) cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107:15963–15968.
- Tavraz, N. N., T. Friedrich, K. L. Durr, J. B. Koenderink, E. Bamberg, T. Freilinger, et al. 2008. Diverse functional consequences of mutations in the Na+/K+-ATPase alpha2-subunit causing familial hemiplegic migraine type 2. *J. Biol. Chem.* 283:31097–31106.
- Terwindt, G., E. Kors, J. Haan, F. Vermeulen, A. Van den Maagdenberg, R. Frants, et al. 2002. Mutation analysis of the CACNA1A calcium channel subunit gene in 27 patients with sporadic hemiplegic migraine. *Arch. Neurol.* 59:1016–1018.

height of the peak corresponding to *RNF20* for the patient)/(height of the peak corresponding to the tested fragment for the average of controls/height of the peak corresponding to *RNF20* for the average of controls). We

considered a deletion when the ratio was under 0.6 and a duplication when it was over 1.4.

Data S1. Clinical features of patient #387A and his father.

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

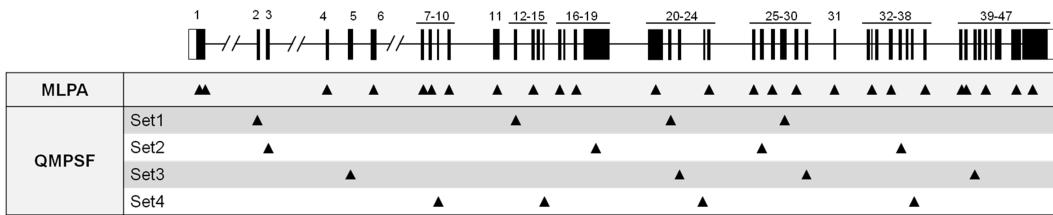
Clinical features of patient #387A and his father

This patient is an 8-years old Greek boy who developed simple febrile seizures at ages 11 and 14 months. He has suffered 4 paroxysmal neurological episodes precipitated by mild accidental head trauma without loss of consciousness.

The first episode was at 2 years of age. After the head trauma he was irritable and screaming but could stand or walk. Focal weakness was not reported. He presented right-sided numbness, had difficulty to walk and speak and the symptoms rapidly evolved into right-sided weakness, inability to talk and severe feeling of pain all over the head associated with photophobia, but no nausea or vomiting. All the episodes lasted 0.5 to 1 hour. Since age 7 years he suffers from frequent tension-type headaches, associated with abdominal discomfort.

His 46-year old father suffers since age 7 from 1-2 episodes per year of dizziness followed by dysarthria and right-sided hemiplegia accompanied by severe headache. Sometimes he refers photophobia and nausea after the attack. He was diagnosed with epilepsy in childhood and is currently being treated with valproic acid. His EEG has shown epileptiform discharges.

Chr. 19p13.1 – *CACNA1A*



Supplementary Figure 1

CNV study design using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments (QMPSF) approaches. Symbols (▲) indicate the exons covered by each assay. The MLPA kit allowed inspection of 24 exons. The analysis software Coffalyser v8 was used to evaluate the possible presence of CNVs, considering a deletion when the ratio was under 0.7 and a duplication when it was over 1.3. For QMPSF, we used four sets of primer pairs covering 16 additional exons. A reference fragment from the *RNF20* gene was co-amplified in each multiplex. Furthermore, two individuals with deletions corresponding to exons 20-47 and 32-47 of *CACNA1A* were also included in every assay as positive controls. Data were analyzed using the PeakScanner™ v1.0 software (Applied Biosystems), and the final ratios for each exon were expressed using the following formula: (height of the peak corresponding to the tested fragment for the patient / height of the peak corresponding to *RNF20* for the patient) / (height of the peak corresponding to the tested fragment for the average of controls / height of the peak

Article 2

Espectre mutacional del gen *CACNA1A* en 49 pacients amb atàxia episòdica de tipus 2.

Resum

L'atàxia episòdica és una canalopatia autosòmica dominant caracteritzada per episodis de desequilibri i descoordinació. L'atàxia episòdica de tipus 2 (*Episodic Ataxia type 2*, EA2) presenta episodis recurrents de vertigen i atàxia cerebel·lar, que poden durar entre minuts i dies, generalment amb nistagme interictal. Molts pacients EA2 són portadors de mutacions en el gen *CACNA1A*, que codifica la subunitat $\alpha 1A$ del canal de calci de tipus P/Q dependent de voltatge Cav2.1. La majoria d'aquestes mutacions són de canvi de sentit o sense sentit, i desemboquen en la pèrdua de funció del canal. D'altra banda, també s'han identificat deleccions exòniques en el gen gràcies a tècniques quantitatives, tals com l'amplificació múltiple amb sondes dependent de lligació (*Multiplex Ligation Dependent Probe Amplification*, MLPA) o l'amplificació múltiple quantitativa de fragments fluorescents petits (*Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments*, QMPSF). En aquest treball es presenta un cribratge mutacional del gen *CACNA1A* que inclou els exons, les regions intròniques flanquejants, els punts de ramificació i les regions promotora i 3'UTR en 49 pacients no emparentats diagnosticats amb EA2, la sèrie més gran descrita fins ara. En casos en què no es van identificar mutacions puntuals o *indels* per seqüenciació es va dur a terme una anàlisi de variants del número de còpies (*Copy Number Variant*, CNV) per a la recerca de grans deleccions o duplicacions. Globalment, el cribratge mutacional ha permès la identificació de sis mutacions puntuals diferents (tres de canvi de sentit i tres sense sentit) i dues *indels* codificants, en total cinc alteracions no descrites prèviament, que han permès cobrir el 20% dels genotips dels pacients. L'anàlisi de CNVs va identificar una delecció de l'exó 35 en un pacient, resultat d'una recombinació entre seqüències Alu flanquejants. Les nostres dades suggereixen que les variants són les responsables de la malaltia, tot i que caldrà dur a terme estudis funcionals.

Referència

Sintas C, Carreño O, Corominas R, Fernández-Castillo N, Vila-Pueyo M, Toma C, Cuenca-León E, Barroeta I, Roig C, Volpini V, Macaya A, Cormand B. *Mutation spectrum in the CACNA1A gene in 49 patients with Episodic Ataxia Type 2*. Manuscrit sotmès a *Molecular Genetics and Genomics*.

MUTATION SPECTRUM IN THE *CACNA1A* GENE IN 49 PATIENTS WITH EPISODIC ATAXIA TYPE 2

Cèlia Sintas^{1,2,4*}, Oriol Carreño^{1,2*}, Roser Corominas^{3,4}, Noèlia Fernández-Castillo^{1,2,4}, Marta Vila-Pueyo³, Claudio Toma^{1,2,4}, Ester Cuenca-León^{3,5,6}, Isabel Barroeta⁷, Carles Roig^{7,8}, Víctor Volpini⁹, Alfons Macaya³, Bru Cormand^{1,2,4}

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain

³Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

⁴Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras (CIBERER), Spain

⁵Psychiatric and Neurodevelopmental Genetics Unit (PNGU), Massachusetts General Hospital, Boston, Massachusetts, United States of America Stanley

⁶Center for Psychiatric Research, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, United States of America

⁷Department of Neurology, Hospital de la Sta, Creu i St Pau, Barcelona, Spain

⁸Department of Medicine, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

⁹Centre de Diagnòstic Genètic-Molecular, Institut d'Investigació Biomèdica de Bellvitge, l'Hospitalet de Llobregat, Spain

* These authors contributed equally to the work

Corresponding author:

Bru Cormand, PhD

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

Telephone: +34 934021013

Fax: +34 934034420

Email address: bcormand@ub.edu

ABSTRACT

Episodic ataxia is an autosomal dominant ion channel disorder characterized by episodes of imbalance and incoordination. Episodic ataxia type 2 (EA2) features recurrent episodes of vertigo and cerebellar ataxia, lasting from minutes to a few days, often with interictal nystagmus.

Many EA2 patients harbour mutations in the *CACNA1A* gene, encoding the α_{1A} subunit of the P/Q-type voltage-gated calcium channel $Ca_v2.1$. The vast majority of these mutations are loss-of-function nonsense or missense leading to decreased channel currents. In addition, *CACNA1A* exonic deletions have been reported in EA2 using quantitative approaches, such as multiplex ligation dependent probe amplification (MLPA) and quantitative multiplex of short fluorescent fragments (QMPSF).

We performed a mutational screening of the *CACNA1A* gene, including the promoter and 3'-UTR regions, in 49 unrelated patients diagnosed with EA2, the largest series reported so far. When point or small indel mutations were not found by sequencing, we performed a copy number variant (CNV) analysis to screen for duplications or deletions. Overall, mutational screening allowed identification of six different point mutations (three nonsense and three missense changes) and two coding indels, five of them novel, that covered 20% of the patients. CNV analysis identified a deletion spanning exon 35 as a result of a recombination event between flanking Alu sequences. Our data suggest that these variations are disease-causing, although functional studies are required.

KEY WORDS

CACNA1A, EA2, mutation, deletion, calcium channel

INTRODUCTION

Episodic ataxia type 2 (EA2, MIM #108500) is a rare autosomal dominant ion channel disorder characterized by episodes of midline cerebellar disturbance manifesting as ataxia, imbalance, vomiting, oscillopsia [1] and interictal nystagmus; progressive ataxia can eventually develop [2]. EA2 has a wide phenotypic spectrum which includes paroxysmal neurological features other than ataxia. Around 50% of patients also experience migraine, and 80% suffer from rotational vertigo during the attacks [3]. Ataxia episodes last from hours to 2-3 days and are usually triggered by emotional stress, physical exercise, alcohol or caffeine. Onset usually occurs during the second decade of life, although later onsets have been reported [3,4]. Acetazolamide administration can stop or diminish the frequency and severity of the attacks [5].

Mutations in the *CACNA1A* gene are the main known cause of EA2. However, a substantial number of patients do not harbour mutations in this gene, suggesting that EA2 is a genetically heterogeneous disorder. Since the first *CACNA1A* mutations were described in EA2 [6], over 80 EA2 alterations have been reported in the gene [3]. Several other neurological disorders are caused by mutations in *CACNA1A*, including familial hemiplegic migraine (FHM1, MIM #301011) and spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6, MIM #183086), and the gene has also been related to other hemiplegic migraine (HM)-associated phenotypes like alternating hemiplegia of childhood [7], acute striatal necrosis [8], hemiplegia-hemiconvulsion-epilepsy [9] or recurrent ischemic stroke [10].

CACNA1A encodes the pore-forming α_1 subunit of the neuronal voltage-gated P/Q-type calcium channel ($Ca_v2.1$), which is widely expressed in the central nervous system (CNS), specially in Purkinje cells and granule cells of the cerebellum. The $Ca_v2.1$ channel is responsible for the coupling of calcium influx to vesicular exocytosis, mediating neurotransmission [11].

The vast majority of *CACNA1A* EA2 causing mutations are predicted to cause loss of function of the channel, since nonsense, splicing and small frameshift indel mutations have been extensively reported. Furthermore, missense mutations leading to decreased channel currents have been described [4,3,12] and over the past years large deletions in *CACNA1A* have been reported in EA2 patients using quantitative approaches, such as Multiplex Ligation dependent Probe Amplification (MLPA) [13,14] or Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments (QMPSF) [15]. Functional studies have been carried out to investigate the pathogenic mechanism of EA2 mutations by expressing $Ca_v2.1$ channels carrying either missense or truncating *CACNA1A* changes in mammalian cells [16,17] and *Xenopus* oocytes [18]. Two main hypotheses, negative dominance and haploinsufficiency, have been tested. In this study we aimed to perform an extensive mutation analysis of the *CACNA1A* gene in 49 unrelated EA2 patients by means of sequencing and quantitative analyses to identify both point mutations and genomic rearrangements.

MATERIALS AND METHODS

Patients

All 49 patients were diagnosed with EA2 on clinical grounds by expert neurologists. Central to the diagnosis was eliciting a history of recurrent paroxysmal attacks of ataxia, vertigo, and nausea or vomiting typically lasting minutes to days in duration. Additional supporting criteria were i) the presence of interictal ataxia and nystagmus; ii) a history of the attacks being triggered by exercise, emotional stress, alcohol, caffeine, fever, or heat; iii) reduction of attack frequency/severity by acetazolamide; iv) absence of myokymia and v) a family history consistent with autosomal dominant inheritance.

Signs and symptoms associated with gait ataxia included dysarthria, diplopia, tinnitus, dystonia, hemiplegia, and headache, but their incidence in our cohort cannot be estimated from this retrospective clinical study. Most patients had brain MRI studies but these were not available for review; cerebellar atrophy was reported in only a minority of cases.

Sampling and mutation screening

Peripheral blood samples were collected from all probands and genomic DNA was isolated using a standard salting-out method [19]. All 48 exons, splice sites and branch points from the *CACNA1A* gene were sequenced. The promoter (894 bp upstream from the translation initiation codon) and the 3'UTR region, containing exon 48, were also screened as previously described [20,21]. All mutations were assessed by bidirectional sequencing and confirmed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis. Two hundred control individuals were screened by Sanger sequencing, and the presence of the identified mutations was checked at the Exome Variant Server (EVS, evs.gs.washington.edu, ESP6500 data release) and at the 1000 Genomes database (www.1000genomes.org, phase 3 integrated release). Mutation nomenclature follows Human Genome Variation Society (HGVS) guidelines (<http://www.hgvs.org/mutnomen/recs-DNA.html>) and refers to the *CACNA1A* cDNA sequence NM_001127221 (protein sequence NP_001120693), with nucleotide c.279A corresponding to the initiation codon (ATG).

CNV analysis

Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) was the first approach used for the CNV analysis. We used the MLPA *CACNA1A* kit SALSA-P279-A2 (MRC Holland, Amsterdam) that contains 25 probes covering 24 exons of the *CACNA1A* gene. This test was performed according to the manufacturer's instructions. Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments (QMPSF) was used as a complementary approach to cover most of the exons that were not covered by the MLPA assay. Four sets of probes targeting 16 additional exons were designed. For five additional exons, since they were located <1 kb from the ones targeted by QMPSF or MLPA and no repeat sequences were present between them, deletion risk was considered as very low. A reference fragment from the *RNF20* gene

was co-amplified in each multiplex. A new set of probes was designed to confirm the deletion identified by MLPA in one of the patients, containing the deleted exon and the flanking ones.

The MLPA analysis software Coffalyser v8 was used to evaluate the possible presence of CNVs, considering deletion when the ratio was under 0.7 and duplication when it was over 1.3. QMPSF data were analyzed using the PeakScanner™ v1.0 software (Applied Biosystems), and the final ratios for each exon were expressed using the following formula: (height of the peak corresponding to the tested fragment for the patient/height of the peak corresponding to *RNF20* for the patient)/(height of the peak corresponding to the tested fragment for the average of controls/height of the peak corresponding to *RNF20* for the average of controls). We considered a deletion when the ratio was under 0.6 and duplication when it was over 1.4. More details about the design and analysis are provided in Online Resource 1. PCR conditions and sample analysis procedures are available upon request. In order to map the breakpoint of the deletion spanning exon 35, we PCR-amplified and Sanger-sequenced a genomic region containing exons 34 to 36 from the carrier patient (primers and conditions available upon request).

Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) assay

Only in one case biological material was available to perform NMD assays. Fibroblast primary cultures from a control individual and from patient 432B (bearing the nonsense mutation p.W320*) were obtained from skin biopsies, cultured in a monolayer at 37°C under 5% CO₂ in T25 flasks (Greiner Bio-One, North America, Inc.) with DMEM medium (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) containing 12% fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Invitrogen Life Technologies, Heidelberg, Germany). After three weeks of maintenance, fibroblasts were trypsinized and cultured in 35mm dishes with DMEM medium containing 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin (Invitrogen Life Technologies, Heidelberg, Germany).

To proceed with the NMD assay, WT and mutated cells were then cultured in a six well-plate each, and three replicates were treated with cycloheximide, a NMD inhibitor, at 1mg/ml during 6 hours..

RNA extraction from fibroblasts and reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) were performed using QIAshredder (Qiagen, Hilden, Germany) and High Capacity cDNA kit (Applied Biosystems) and following the manufacturer's instructions. A segment of the *CACNA1A* cDNA including exon 6 was amplified in all samples. PCR products were sequenced and digested with *Accl*, enzyme that cuts the fragment bearing the mutation.

RESULTS

Patients

Ten out of 49 patients were found to harbour heterozygous *CACNA1A* mutations (Table 1). Their clinical signs were prototypical for EA2. However, since most patients were adults when interviewed, complete information regarding their clinical presentation and the periods with higher attack frequencies was difficult to retrieve. Acetazolamide was generally effective in preventing the spells. Brain MRI documented vermian cerebellar atrophy in just one of the ten cases with molecular diagnosis.

Sequencing analysis of *CACNA1A*

Sanger-sequence analysis of the *CACNA1A* gene in a cohort of 49 Spanish individuals diagnosed with EA2 allowed the identification of eight heterozygous mutations in nine patients (Fig. 1 and 2). These included three missense changes, three nonsense mutations leading to premature stop codons (one of them found in two unrelated patients) and two frameshift deletions (Table 1). All of them were confirmed by restriction analysis. Five of the mutations are novel and three have previously been reported. None of the mutations was present in a screening of 200 Spanish control individuals and they were all absent from the Exome Variant Server and the 1000 Genomes database. Patients' relatives were also screened when DNA was available (Fig. 2). When more than one individual in a family could be tested, cosegregation between mutation and disease phenotype was confirmed. Mutations found in pedigrees with parents available for analysis were all inherited.

Two of the nonsense mutations, p.W320* and p.Y1849*, are described here for the first time. The first one is located in the extracellular loop between S5 and S6 from domain I, maintaining only the N-terminus and part of the first domain of the protein (Fig. 1). Mutation p.Y1849*, in contrast, leads to the truncation of the cytoplasmic tail, leaving out of the subunit the calcium binding domain (Fig. 1). Two other patients carried mutation p.R1857* in our series, a mutation reported previously by other authors [22].

Two frameshift mutations caused by deletions of 1 bp and 2 bp were identified and also lead to truncated proteins. The novel mutation c.749delG (p.G250fs*60) is located in the S5-S6 extracellular loop from domain I, the same domain where the p.W320* change is located. The second one, c.2042-43delAG (p.Q681Rfs*100) produces a frame shift in domain II, also in the extracellular loop S5-S6, with a premature stop codon 100 amino acids downstream. This mutation had been described in previous works [23-26].

Finally, three missense mutations were identified. Two of the patients and the mutations had already been reported by our group, but they were added to the present study to provide a complete view of our EA2 series: Patient A98_279 carries mutation p.G638D [4] and patient A03_44, diagnosed with both EA2 and FHM carried mutation p.T501M [20]. Both reports were accompanied by functional assays. The third mutation, p.P2222L, described here for the first time, is located in a poly-proline region in the cytoplasmic tail of the protein.

CNV analysis of *CACNA1A*

The study of possible genetic rearrangements in the *CACNA1A* gene allowed the identification by MLPA of a deletion of the entire exon 35 (Fig. 3), 151 bp in length, in patient 474, which was confirmed by QMPSF.

In order to map the deletion breakpoint, a genomic region covering exons 34 to 36 was PCR-amplified and sequenced. A recombination occurred between two identical fragments located within Alu sequences in introns 34 (AluY) and 35 (AluSz), proximal and distal from exon 35 (Fig. 3), resulting in a 3,5 kb deletion. The deletion disrupts the coding frame from amino acid position 1,752 and is predicted to lead to a premature truncation only one codon downstream (p.S1752Cfs*2) in the extracellular S5-S6 loop of domain IV.

Nonsense mediated mRNA decay (NMD) assay

An NMD assay was performed from skin fibroblasts of patient 432B, bearing a heterozygous p.W320* mutation. Sanger sequencing and RFLP were performed and the mutated allele was present both in cells treated with cycloheximide and non-treated ones, indicating that this process does not trigger degradation of the mRNA encoding the truncated protein (data not shown).

DISCUSSION

Here we report an exhaustive screening of the *CACNA1A* gene in the largest sample of patients with episodic ataxia type 2 (EA2) so far, which was addressed through Sanger sequencing and CNV analyses. We identified nine different mutations in 10 of the 49 patients studied, five of which are novel (Table 1). This represents resolution of 20.4% of our sample, a percentage that is similar to others reported elsewhere [1,27]. Although most of the previously reported changes in EA2 are point mutations, deletions encompassing one or more *CACNA1A* exons have been described [13, 14,15,28]. For this reason, in addition to sequencing exons, splice sites, branch points and the promoter region of the gene, we used two complementary quantitative approaches, MLPA and QMPSF, to extend the mutational screening to genomic rearrangements within the gene. MLPA and QMPSF allowed inspection of 45 out of 48 *CACNA1A* exons (Online Resource 1). Thus, an exhaustive genetic diagnostic protocol consisting of two sequential approaches offered a wider and more comprehensive view of the genetic background of EA2.

We identified a total of three nonsense and three missense mutations, two small deletions and a deletion encompassing the exon 35 of the gene. From these, six were predicted to truncate the protein, either by introducing a stop codon (p.W320*, p.Y1849* and p.R1857*) or by causing a frame shift (p.G250Efs*60, p.Q681Rfs*100 and p.S1752Cfs*2). Disrupting mutations that result in a loss of function of the Ca_v2.1 calcium channel are the most commonly reported changes in EA2 patients. Functional analyses of the truncated *CACNA1A* subunit have showed diminished or null activity of the channel for EA2 mutations [17]. Thus, although truncating mutations have usually shown to cause a loss of function of the mutated subunit, the underlying pathophysiological mechanism that causes the EA2 phenotype remains still unclear. Two hypotheses have been proposed: haploinsufficiency, supported by the finding of nonsense mediated RNA decay (NMD) [29,14], and a dominant negative effect of the mutated subunit. The latter is more generally accepted as the major mechanism on the basis of functional studies that support an altered interaction between the WT and the mutated allele that would retain the complex in the endoplasmic reticulum, affecting protein trafficking and activating a proteasome response [30,31,16]. The dominant negative effect of the interaction may require the presence of the N-terminus of the protein in the mutant form, leading to a suppression of the Ca_v2.1 channel expression due to the interaction between truncated and full-length subunits [17]. All six truncating changes reported here are all located beyond the N-terminus of the channel and so are candidates to undergo dominant negative effects.

In our study, since skin fibroblasts from patient 432B (p.W320*) were available, the hypothesis of haploinsufficiency caused by a possible degradation of the mutated mRNA by NMD could be tested in HeLa cells. No mRNA degradation was observed for this particular mutation (data not shown). NMD could not be tested in the rest of the patients from our collection, as biological samples were not accessible for analysis.

Three heterozygous missense mutations (p.T501M, p.G638D and p.P2222L) were identified in three patients. The effects of missense mutations are not easy to predict functionally. Two of the mutations we describe in this study, p.G638D and p.T501M, had been reported in previous works from our group, where functional analyses were performed [4,20]. Mutation p.G638D showed a loss of function of the channel, in agreement with the most commonly described effect for EA2 mutations. On another hand, the patient bearing mutation p.T501M, a change reported previously in EA2 [26], presents with a phenotype that combines EA2 and HM. The functional analysis of this missense change revealed a gain of function of the channel, a pathogenic mechanism typical of HM rather than EA2. There are other reported cases where related phenotypes overlap, such as HM with progressive ataxia [32] or EA2 with migraine [26]. The third missense mutation, p.P2222L, was not functionally characterized. Nevertheless, this mutation cosegregates in the family with the EA2 phenotype and was also detected in the mother. SIFT [33] and PolyPhen-2 [34] were used to predict potential functional relevance of this change, which was scored as benign in both cases. However, this mutation is absent from the exome of 6,503 individuals from the EVS database and from the genome of 2,054 individuals from the 1000genomes collection, indicating that it is not a frequent polymorphic variant.

Taking together this and other studies, no specific prevalent mutations are found in EA2, which results in a large allelic heterogeneity. However, there are some regions in the *CACNA1A* gene that are found to be more frequently mutated in EA2 patients and also in other patients presenting ataxic features (cerebellar ataxia)[27]. In our study, five out of nine mutations are located in the S5-S6 extracellular loop of different domains (I, II and IV) (Fig. 1). Many disease-causing changes in EA2 seem to be preferentially located in these areas, both nonsense and missense. Therefore, this S5-S6 linker may represent a key region that influences the proper functionality of the subunit. This effect has also been seen in mouse models bearing changes in this region, which present a mild ataxia phenotype [35]. Only one mutation in our study, p.T501M, present in a patient with EA2 and HM, is located in a transmembrane domain (DII-S1) that belongs to the voltage sensor part, affecting both activation and inactivation of the channel [20].

Three other mutations identified here are located in the C-terminal tail. The two nonsense mutations p.Y1849* and p.R1857* are in exon 37, within the EF-hand responsible for calcium binding, so the IQ-like CaM interaction domain (IQ) and the Calmodulin Binding Domain (CBD) [36], located downstream, are also lost. Finally, although the missense mutation p.P2222L is located downstream from these interaction regions (EF-hand and calmodulin binding domains), it may affect the conformation of the tail and disturb the interaction between the *CACNA1A* subunit and other elements that bind the C-terminal region, such as auxiliary β -subunits [37,36], leading to an impaired function of the channel.

Genotype-phenotype correlations were not apparent in our cohort: all mutations described in this study produced comparable EA2 phenotypes regardless of their molecular nature or they location in transmembrane or cytoplasmic tail protein domains. Of note, two patients (cases

340 and 389A) displayed the same variant p.R1857*; in that particular instance the clinical presentation was similar in the early age of onset and presence of interictal cerebellar signs. In summary, we have identified nine potentially disease-causing mutations in ten patients with EA2. However, there is still a significant proportion of EA2 subjects with no mutations in *CACNA1A*, both in our study (about 80%) or in previous reports. Although there might be some degree of missing allelic heterogeneity in this gene, it is likely that other genes are involved in the disorder, which may be uncovered by means of next generation sequencing approaches.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank the patients and their families for their participation and the clinicians involved for their contribution to the study. We are grateful to F. Riant (Laboratoire de Génétique Moléculaire, Hopital Lariboisière AP-HP, France) for providing us with positive controls for the CNV analyses. The funding for this study was provided by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2009-13182-C01, SAF2009-13182-C03), AGAUR (2014SGR-0932, 2009SGR-0078) and Fundació La Marató de TV3 (grant 100731). These institutions had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. CS and OC were supported by Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2007-16450 and BES-2010-033895, respectively) and NF-C by Centro de Investigación Biomédica en Red en Enfermedades Raras (CIBERER, ISCIII). MV-P was supported by a predoctoral grant from VHIR, Barcelona (Spain). CT was supported by the European Union (Marie Curie, PIEF-GA-2009-254930). EC-L is the recipient of the Beatriu de Pinós programme scholarship (BP-DGR 2010).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest

ETHICS STATEMENT

This study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from all adult subjects, children, and their parents according to the Helsinki declaration.

REFERENCES

1. Rajakulendran S, Graves TD, Labrum RW, Kotzadimitriou D, Eunson L, Davis MB, Davies R, Wood NW, Kullmann DM, Hanna MG, Schorge S (2010) Genetic and functional characterisation of the P/Q calcium channel in episodic ataxia with epilepsy. *J Physiol* 588 (Pt 11):1905-1913. doi:jphysiol.2009.186437 [pii] 10.1113/jphysiol.2009.186437
2. Spacey SD, Materek LA, Szczygielski BI, Bird TD (2005) Two novel CACNA1A gene mutations associated with episodic ataxia type 2 and interictal dystonia. *Arch Neurol* 62 (2):314-316. doi:62/2/314 [pii] 10.1001/archneur.62.2.314
3. Rajakulendran S, Kaski D, Hanna MG (2012) Neuronal P/Q-type calcium channel dysfunction in inherited disorders of the CNS. *Nat Rev Neurol* 8 (2):86-96. doi:10.1038/nrneurol.2011.228
4. Cuenca-Leon E, Banchs I, Serra SA, Latorre P, Fernandez-Castillo N, Corominas R, Valverde MA, Volpini V, Fernandez-Fernandez JM, Macaya A, Cormand B (2009) Late-onset episodic ataxia type 2 associated with a novel loss-of-function mutation in the CACNA1A gene. *J Neurol Sci* 280 (1-2):10-14. doi:S0022-510X(09)00003-3
5. Spacey S (1993) Episodic Ataxia Type 2. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH et al. (eds) *GeneReviews(R)*. Seattle (WA).
6. Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M, Haan J, Lindhout D, van Ommen GJ, Hofker MH, Ferrari MD, Frants RR (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNA1A. *Cell* 87 (3):543-552. doi:S0092-8674(00)81373-2
7. de Vries B, Stam AH, Beker F, van den Maagdenberg AMJM, Vanmolkot KRJ, Laan LAEM, Ginjaar IB, Frants RR, Lauffer H, Haan J, Haas JP, Terwindt GM, Ferrari MD (2008) CACNA1A mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood. *Cephalalgia* 28 (8):887-891. doi: 10.1111/j.1468-2982.2008.01596.x
8. Carreno O, Garcia-Silva MT, Garcia-Campos O, Martinez-de Aragon A, Cormand B, Macaya A (2011) Acute striatal necrosis in hemiplegic migraine with de novo CACNA1A mutation. *Headache* 51 (10):1542-1546. doi:10.1111/j.1526-4610.2011.02014.x
9. Yamazaki S, Ikeno K, Abe T, Tohyama J, Adachi Y (2011) Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome associated with CACNA1A S218L mutation. *Pediatr Neurol* 45 (3):193-

196. doi:10.1016/j.pediatrneurol.2011.04.010

10. Knierim E, Leisle L, Wagner C, Weschke B, Lucke B, Bohner G, Dreier JP, Schuelke M (2011) Recurrent Stroke Due to a Novel Voltage Sensor Mutation in Cav2.1 Responds to Verapamil. *Stroke* 42 (2):e14-e17. doi:STROKEAHA.110.600023

11. Pietrobon D (2013) Calcium channels and migraine. *Biochim Biophys Acta* 1828 (7):1655-1665. doi:10.1016/j.bbamem.2012.11.012

12. Spacey SD, Hildebrand ME, Materek LA, Bird TD, Snutch TP (2004) Functional implications of a novel EA2 mutation in the P/Q-type calcium channel. *Ann Neurol* 56 (2):213-220. doi:10.1002/ana.20169

13. Labrum RW, Rajakulendran S, Graves TD, Eunson LH, Bevan R, Sweeney MG, Hammans SR, Tubridy N, Britton T, Carr LJ, Ostergaard JR, Kennedy CR, Al-Memar A, Kullmann DM, Schorge S, Temple K, Davis MB, Hanna MG (2009) Large scale calcium channel gene rearrangements in episodic ataxia and hemiplegic migraine: implications for diagnostic testing. *J Med Genet* 46 (11):786-791. doi:jmg.2009.067967

14. Wan J, Mamsa H, Johnston JL, Spriggs EL, Singer HS, Zee DS, Al-Bayati AR, Baloh RW, Jen JC (2011) Large Genomic Deletions in CACNA1A Cause Episodic Ataxia Type 2. *Front Neurol* 2:51. doi:10.3389/fneur.2011.00051

15. Riant F, Lescoat C, Vahedi K, Kaphan E, Toutain A, Soisson T, Wiener-Vacher SR, Tournier-Lasserre E (2010) Identification of CACNA1A large deletions in four patients with episodic ataxia. *Neurogenetics* 11 (1):101-106. doi:10.1007/s10048-009-0208-y

16. Jeng CJ, Sun MC, Chen YW, Tang CY (2008) Dominant-negative effects of episodic ataxia type 2 mutations involve disruption of membrane trafficking of human P/Q-type Ca²⁺ channels. *J Cell Physiol* 214 (2):422-433. doi:10.1002/jcp.21216

17. Page KM, Hebllich F, Margas W, Pratt WS, Nieto-Rostro M, Chaggar K, Sandhu K, Davies A, Dolphin AC (2010) N terminus is key to the dominant negative suppression of Ca(V)₂ calcium channels: implications for episodic ataxia type 2. *J Biol Chem* 285 (2):835-844. doi:M109.065045

18. Wappl E, Koschak A, Poteser M, Sinnegger MJ, Walter D, Eberhart A, Groschner K, Glossmann H, Kraus RL, Grabner M, Striessnig J (2002) Functional consequences of P/Q-type Ca²⁺ channel Cav2.1 missense mutations associated with episodic ataxia type 2 and progressive ataxia. *J Biol Chem* 277 (9):6960-6966. doi:10.1074/jbc.M110948200

19. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16 (3):1215
20. Carreno O, Corominas R, Serra SA, Sintas C, Fernandez-Castillo N, Vila-Pueyo M, Toma C, Gene GG, Pons R, Llaneza M, Sobrido MJ, Grinberg D, Valverde MA, Fernandez-Fernandez JM, Macaya A, Cormand B (2013) Screening of CACNA1A and ATP1A2 genes in hemiplegic migraine: clinical, genetic, and functional studies. *Molecular genetics & genomic medicine* 1 (4):206-222. doi:10.1002/mgg3.24
21. Cuenca-Leon E, Corominas R, Fernandez-Castillo N, Volpini V, Del Toro M, Roig M, Macaya A, Cormand B (2008) Genetic analysis of 27 Spanish patients with hemiplegic migraine, basilar-type migraine and childhood periodic syndromes. *Cephalalgia* 28 (10):1039-1047. doi:CHA1645
22. Graves TD, Imbrici P, Kors EE, Terwindt GM, Eunson LH, Frants RR, Haan J, Ferrari MD, Goadsby PJ, Hanna MG, van den Maagdenberg AM, Kullmann DM (2008) Premature stop codons in a facilitating EF-hand splice variant of CaV2.1 cause episodic ataxia type 2. *Neurobiol Dis* 32 (1):10-15. doi:S0969-9961(08)00126-5
23. Denier C, Ducros A, Vahedi K, Joutel A, Thierry P, Ritz A, Castelnovo G, Deonna T, Gerard P, Devoize JL, Gayou A, Perrouty B, Soisson T, Autret A, Warter JM, Vighetto A, Van Bogaert P, Alamowitch S, Rouillet E, Tournier-Lasserre E (1999) High prevalence of CACNA1A truncations and broader clinical spectrum in episodic ataxia type 2. *Neurology* 52 (9):1816-1821. doi: 10.1212/WNL.52.9.1816
24. van den Maagdenberg AM, Kors EE, Brunt ER, van Paesschen W, Pascual J, Ravine D, Keeling S, Vanmolkot KR, Vermeulen FL, Terwindt GM, Haan J, Frants RR, Ferrari MD (2002) Episodic ataxia type 2. Three novel truncating mutations and one novel missense mutation in the CACNA1A gene. *J Neurol* 249 (11):1515-1519. doi:10.1007/s00415-002-0860-8
25. Kim JM, Kim JS, Ki CS, Jeon BS (2006) Episodic Ataxia Type 2 due to a Deletion Mutation in the CACNA1A Gene in a Korean Family. *J Clin Neurol* 2 (4):268-271. doi:10.3988/jcn.2006.2.4.268
26. Mantuano E, Romano S, Veneziano L, Gellera C, Castellotti B, Caimi S, Testa D, Estienne M, Zorzi G, Bugiani M, Rajabally YA, Barcina MJ, Servidei S, Panico A, Frontali M, Mariotti C (2010) Identification of novel and recurrent CACNA1A gene mutations in fifteen patients with episodic ataxia type 2. *J Neurol Sci* 291 (1-2):30-36. doi:S0022-510X(10)00036-5

27. Mantuano E, Veneziano L, Spadaro M, Giunti P, Guida S, Leggio MG, Verriello L, Wood N, Jodice C, Frontali M (2004) Clusters of non-truncating mutations of P/Q type Ca²⁺ channel subunit Ca(v)2.1 causing episodic ataxia 2. *J Med Genet* 41 (6):e82. doi:10.1136/jmg.2003.015396
28. Riant F, Mourtada R, Saugier-veber P, Tournier-Lasserre E (2008) Large CACNA1A deletion in a family with episodic ataxia type 2. *Arch Neurol* 65 (6):817-820. doi:65/6/817
29. Veneziano L, Albertosi S, Pesci D, Mantuano E, Frontali M, Jodice C (2011) Dramatically different levels of Cacna1a gene expression between pre-weaning wild type and leaner mice. *J Neurol Sci* 305 (1-2):71-74. doi:10.1016/j.jns.2011.03.010
30. Page KM, Heblich F, Davies A, Butcher AJ, Leroy J, Bertaso F, Pratt WS, Dolphin AC (2004) Dominant-negative calcium channel suppression by truncated constructs involves a kinase implicated in the unfolded protein response. *J Neurosci* 24 (23):5400-5409. doi:10.1523/JNEUROSCI.0553-04.2004
31. Mezghrani A, Monteil A, Watschinger K, Sinnegger-Brauns MJ, Barrere C, Bourinet E, Nargeot J, Striessnig J, Lory P (2008) A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels. *J Neurosci* 28 (17):4501-4511. doi:10.1523/JNEUROSCI.2844-07.2008
32. Ducros A, Denier C, Joutel A, Vahedi K, Michel A, Darcel F, Madigand M, Guerouaou D, Tison F, Julien J, Hirsch E, Chedru F, Bisgard C, Lucotte G, Despres P, Billard C, Barthez MA, Ponsot G, Bousser MG, Tournier-Lasserre E (1999) Recurrence of the T666M calcium channel CACNA1A gene mutation in familial hemiplegic migraine with progressive cerebellar ataxia. *Am J Hum Genet* 64 (1):89-98. doi:S0002-9297(07)61661-9
33. Kumar P, Henikoff S, Ng PC (2009) Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols* 4 (7):1073-1081. doi:10.1038/nprot.2009.86
34. Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, Kondrashov AS, Sunyaev SR (2010) A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nature methods* 7 (4):248-249. doi:10.1038/nmeth0410-248
35. Li W, Zhou Y, Tian X, Kim TY, Ito N, Watanabe K, Tsuji A, Niimi K, Aoyama Y, Arai T, Takahashi E (2012) New ataxic tottering-6j mouse allele containing a Cacna1a gene mutation. *PLoS One* 7 (8):e44230. doi:10.1371/journal.pone.0044230

36. Soong TW, DeMaria CD, Alvania RS, Zweifel LS, Liang MC, Mittman S, Agnew WS, Yue DT (2002) Systematic identification of splice variants in human P/Q-type channel alpha1(2.1) subunits: implications for current density and Ca²⁺-dependent inactivation. *J Neurosci* 22 (23):10142-10152

37. Walker D, Bichet D, Campbell KP, De Waard M (1998) A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 1A subunit. *J Biol Chem* 273 (4):2361-2367. doi: 10.1074/jbc.274.18.12383

FIGURES

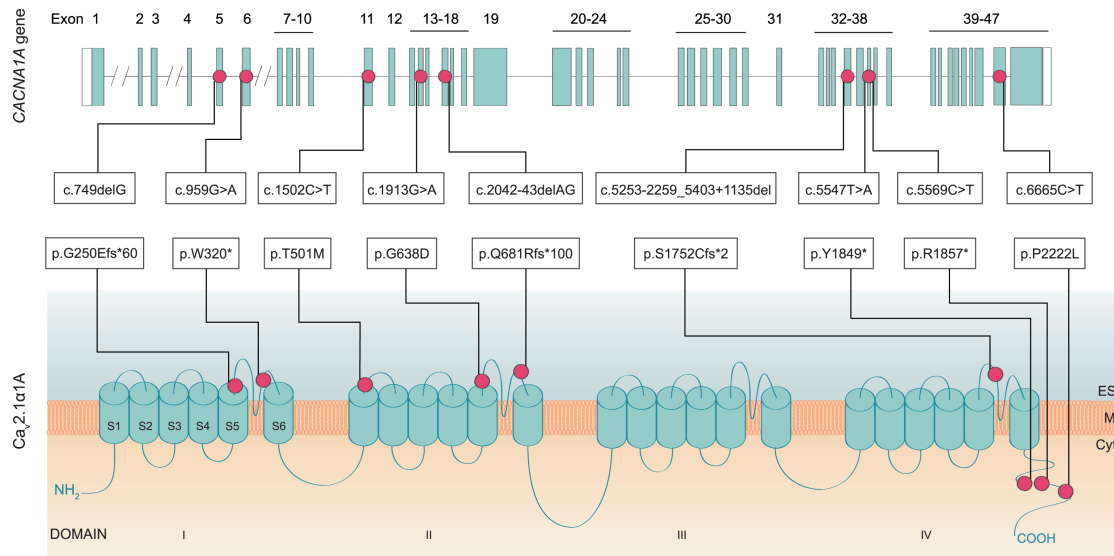


Figure 1. *CACNA1A* gene and protein structure with the identified mutations. *CACNA1A* gene structure (top figure), with boxes indicating exons. Protein structure of the $Ca_v2.1\alpha_{1A}$ subunit (bottom figure). The mutations reported in this work are indicated by dots. Cyt: cytoplasm; M: cytoplasmic membrane; ES: extracellular space; S: Segment

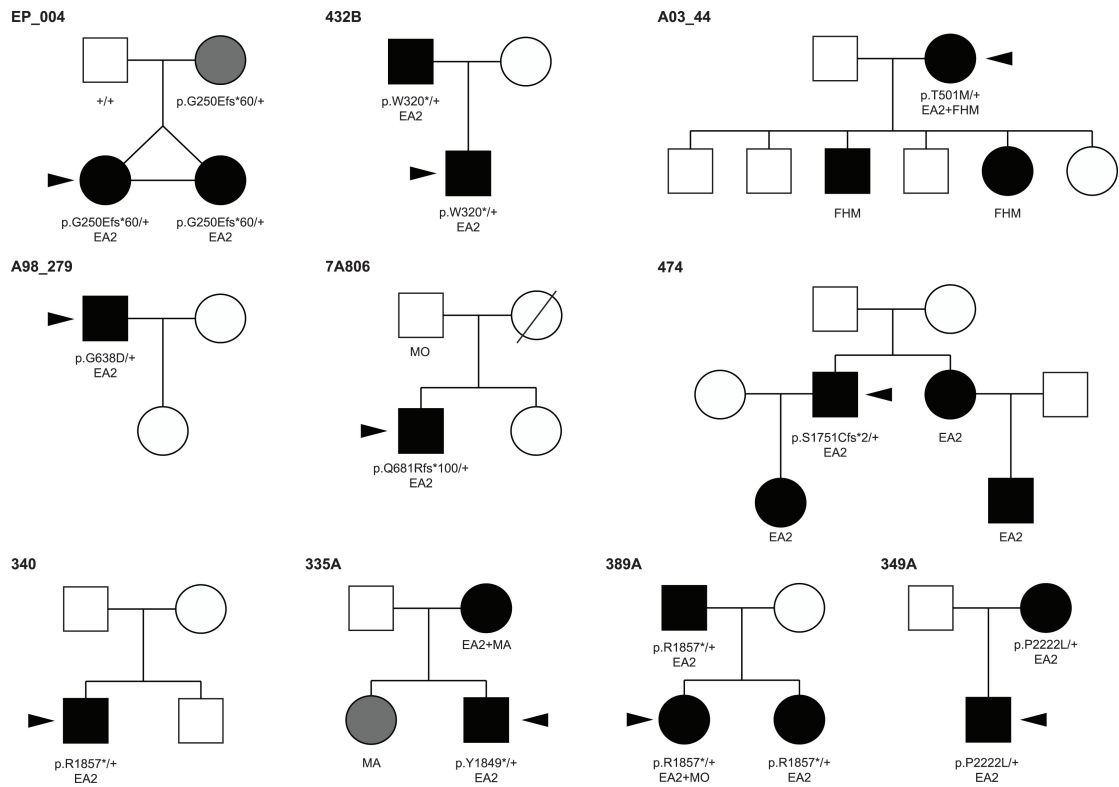


Figure 2. Pedigrees of patients with the mutations identified in the *CACNA1A* gene. Affected individuals are denoted by solid symbols; episodic ataxia is indicated in black and other phenotypes in gray; squares indicate males and circles indicate females. Proband status is indicated by a black arrow. Clinical characteristics are indicated below each individual (EA2: episodic ataxia type 2; HM: hemiplegic migraine; MO: migraine without aura). Gene variant carrier status is indicated below each individual when DNA was available for analysis.

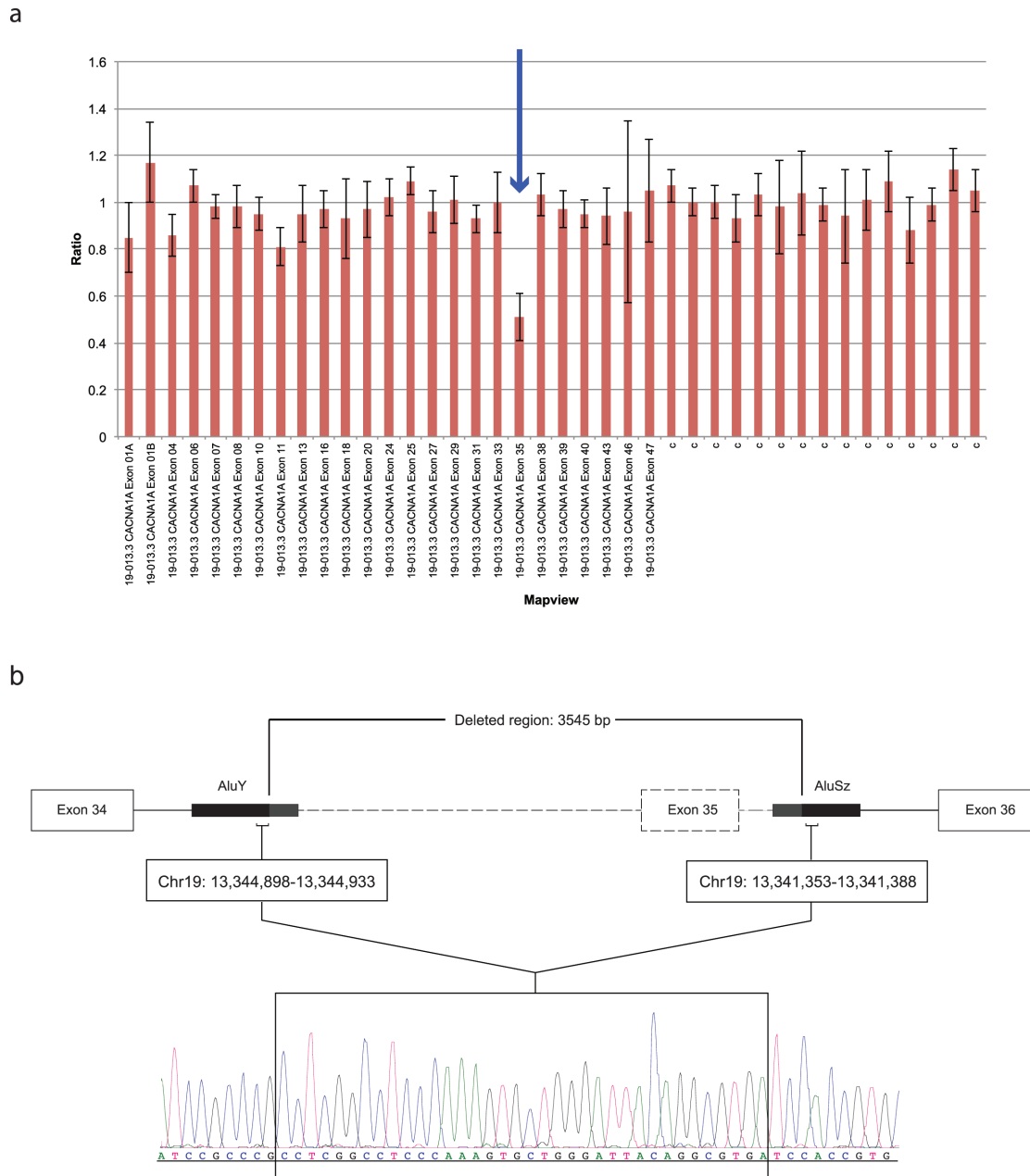
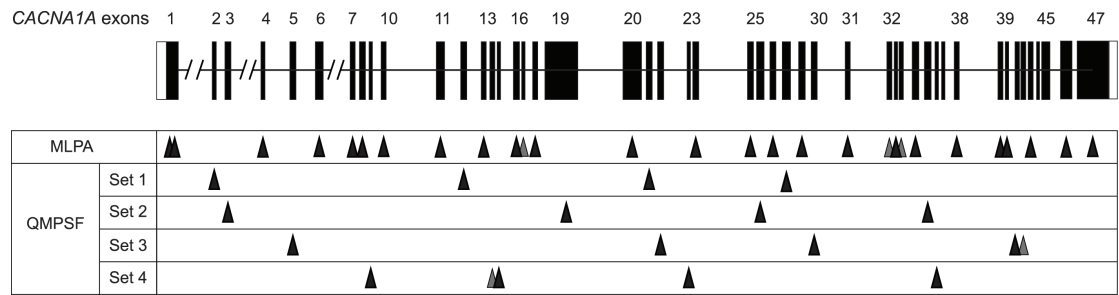


Figure 3. Genomic rearrangements studies in *CACNA1A*. **a)** Results from the MLPA analysis performed with Coffalyser. The deleted exon 35 is indicated with an arrow. C: control probe. **b)** Deletion breakpoint mapping. Sequence chromatogram of patient 474 corresponding to the homologous fragment from AluY and AluSz sequences. The identical shared sequence by the 5' and 3' Alu elements located in introns 34 and 35 that mediated the recombination is framed. Location of fragments taken from UCSC Genome Browser on Human Feb 2009 Assembly (GRCh37/hg19).



Online Resource 1. CNV study design for *CACNA1A* using Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) and Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments (QMPSF) approaches. Symbols (▲) indicate the exons inspected by each assay and grey symbols (▲) indicate close exons that were not included, but covered. The MLPA kit allowed inspection of 24 exons. For QMPSF, we used four sets of primer pairs covering 16 additional exons. Two individuals with deletions spanning *CACNA1A* exons 20–47 and 32–47 were also included in every assay as positive controls.

Table 1. Clinical information and results from the CACNA1A screening in patients with identified mutations.

Patient	Onset	Frequency of the episodes	Duration	Trigger(s)	MRI	Other features	Mutation			Restriction enzyme	Reference	
							cDNA	Exon	Prot			Domain
EP-004	infancy	uk	uk	uk	na	ACZ responsive, MO, learning disability, motor clumsiness	c.749delG	5	p.G250Efs*60	DI, S5-S6 loop	+TaqI (mismatch)	---
432B	6y	>1/m	15min-3h	stress, fatigue	normal	ACZ responsive	c.G959A	6	p.W320*	DI, S5-S6 loop	+AclI	---
A03_44	uk	uk	uk	uk	uk	FHM, interictal ataxia, nystagmus	c.C1502T	11	p.T501M	DII, S1	+FstI	Mantuano (2010)
A98_279	58y	almost daily	1/2-1h	uk	normal	episodic hand dystonia	c.G1913A	14	p.G638D	DII, S5-S6 loop	-AclI	Cuenca-León (2009)
7A806	5y	weekly	uk	uk	uk	MO	c.2042-43delAG	16	p.Q681Rfs*100	DII, S5-S6 loop	-DdeI	Denier (1999), Van den Maagdenberg (2002), Kim (2006), Mantuano (2010)
474	8y	1-4/mo	3-6h	uk	deep WM hyperintensities	worsen on CBZ and PHT, ACZ responsive	c.5253-2259_5403+1135del	35	p.S1753Cfs*2	DIV, S5-S6 loop	---	---
335a	<1y	uk	48h	na	normal	migraine, visual aura	c.T5547A	37	p.Y1849*	Cytoplasmatic tail	-PstI	---
340	4y	uk	na	exercise, fatigue, emotional stress	temporal arachnoidal cyst	congenital squint, nystagmus, ACZ responsive	c.C5569T	37	p.R1857*	Cytoplasmatic tail	+BspHI (mismatch)	Graves (2008)
389A	2y	2-3/wk	6-8h upon sleep	stress, exercise, coffee, tea	mild cerebellar atrophy	improves on ACZ, MO, interictal ataxia, nystagmus	c.C5569T	37	p.R1857*	Cytoplasmatic tail	+BspHI (mismatch)	Graves (2008)
349A	17m	1-2/month	1-2 h	stress	normal	nystagmus	c.C6665T	46	p.P2222L	Cytoplasmatic tail	-AclI	---

uk: unknown, na: not available; ACZ: acetazolamide, MO: migraine without aura, FHM: Familial Hemiplegic Migraine, CBZ: carbamazepine, PHT: phenytoin, D: domain, S: segment

Capítol 2. Estudi genètic de la migranya comuna: estudis d'associació cas-control.

Article 3

Un estudi de rèplica d'un resultat de GWAS previ en migranya no detecta associació en una mostra espanyola de tipus cas-control.

Resum

La migranya és un trastorn neurològic molt freqüent que presenta un fons genètic complex i es caracteritza per episodis recurrents de cefalea. Es classifica en migranya amb aura (MA) i migranya sense aura (MO). Fins ara s'han dut a terme molts estudis d'associació amb l'objectiu d'identificar variants genètiques de risc per a la migranya comuna, la majoria dels quals estan dirigits a gens candidats, amb resultats variables i sovint inconsistents. L'any 2010, un estudi GWAS en una mostra clínica va identificar una variant de risc funcionalment rellevant (l'SNP rs1835740), probablement relacionada amb l'homeòstasi del glutamat, que va mostrar associació significativa amb la migranya. Vàrem fer un estudi de rèplica d'aquest resultat en un estudi clínic amb una mostra espanyola de pacients MA i MO. Es va genotipar l'SNP rs1835740 en un total de 1521 pacients i 1379 controls i es va dur a terme un estudi d'associació de tipus cas-control. No vam identificar associació entre la variant estudiada i cap dels grups clínics considerats.

Referència

Sintas C, Carreño O, Fernández-Morales J, Cacheiro C, Sobrido MJ, Narberhaus B, Pozo-Rosich P, Macaya A, Cormand B. *A replication study of a GWAS finding in migraine does not identify association in a Spanish case-control sample.* Cephalalgia. 2012 Oct;32(14):1076-80. doi: 10.1177/0333102412457090. Epub 2012 Aug 20.

A replication study of a GWAS finding in migraine does not identify association in a Spanish case-control sample

Cephalalgia

32(14) 1076–1080

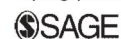
© International Headache Society 2012

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0333102412457090

cep.sagepub.com



Cèlia Sintas^{1,2,3}, Oriol Carreño^{1,2,3}, Jèssica Fernández-Morales⁴, Pilar Cacheiro⁵, María-Jesús Sobrido^{3,5}, Bernat Narberhaus⁶, Patricia Pozo-Rosich⁴, Alfons Macaya⁷ and Bru Cormand^{1,2,3}

Abstract

Background: Migraine is a prevalent neurological disorder with a complex genetic background characterized by recurrent episodes of headache. The disease is subclassified into migraine with aura (MA) and migraine without aura (MO). Many association studies have been performed to date to identify genetic risk variants for common migraine, most of them focusing on selected candidate genes, with variable and often inconsistent results. Recently, a clinic-based genome-wide association study for migraine reported a functionally relevant risk variant (SNP rs1835740), involved in glutamate homeostasis, which showed a significant association with MA. We aimed to replicate this finding in a clinic-based study of a Spanish cohort with MA and MO patients.

Methods: We genotyped SNP rs1835740 in a Spanish sample of 1521 patients and 1379 screened controls and performed a case-control association study.

Conclusion: No association was found between the assayed SNP and any of the clinical groups considered.

Keywords

Migraine, association study, rs1835740, MTDH, GWAS replication

Date received: 22 February 2012; revised: 4 June 2012; accepted: 6 July 2012

Introduction

Migraine is an episodic neurological disorder that affects between 10% and 20% of the population, being around three times more prevalent in women than in men (1,2). Common forms of migraine present a complex genetic basis, with heritability values ranging from 33% to 57% and the likely participation of multiple genes that interact with environmental factors (1). The International Classification of Headache Disorders (ICHD) distinguishes two clinical forms of the disorder: migraine with aura (MA) and migraine without aura (MO). Both presentations share clinical features such as the presence of recurrent headaches, generally accompanied by photophobia, phonophobia, nausea and aggravation by physical activity. They are distinguished by the presence of aura, characterized by transient neurological symptoms that accompany the headache.

Genetic studies in migraine include genome-wide hypothesis-free approaches that aim to identify new susceptibility variants. To date, three genome-wide association studies (GWASs) have reported four variants associated with common migraine (3–5).

The first risk variant, rs1835740G > A (8q22), was identified in the European population in a clinic-based study carried out by the International Headache Genetics Consortium (IHGC) (3) in 2731

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain

³Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER)-Institute of Health Carlos III, Spain

⁴Headache and Neurological Pain Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute and Headache Unit, Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

⁵Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica-SERGAS, Santiago de Compostela, Spain

⁶Neurology Service, Hospital Sant Joan de Déu (Fundació Althaia), Manresa, Barcelona, Spain

⁷Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

Corresponding author:

Bru Cormand, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Av. Diagonal 643, edifici annex, planta 3, 08028 Barcelona, Spain.

Email: bcormand@ub.edu

migraine cases and 10,747 controls from three countries, and replicated in four additional population cohorts, with a genome-wide significant overall meta-analysis p -value of 1.69×10^{-11} . The 'MA only' group, including individuals that had suffered MA but not MO episodes, displayed the most significant association, as compared with the 'Both MA and MO' and 'MO only' groups. SNP rs1835740 is located near the *MTDH* gene (*AEG-1*, *3D3*, *LYRIC*), encoding metadherin, and the *CPQ* gene (*PGCP*, *LDP*), encoding carboxypeptidase Q, both involved in the homeostasis of glutamate. eQTL analysis suggested that this genetic variation is a *cis*-regulator of *MTDH* expression in lymphoblastoid cell lines, with higher transcript levels associated with the risk allele (3). *MTDH* downregulates *SLC1A2* (*EAAT2*, *GLT-1*) (6), encoding the solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 2, thus leading to accumulation of glutamate in the synaptic cleft and potentially enhancing cortical spreading depression (CSD), the underlying mechanism of migraine aura (7).

Recently, three additional variants, rs2651899 (*PRDM16*, PR domain containing 16), rs10166942 (*TRPM8*, transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8) and rs11172113 (*LRPI*, low density lipoprotein receptor-related protein 1), were identified as nominally significant in a population-based GWAS from the Women's Genome Health Study, consisting of around 5000 migraineur women and a control group of 18,000 non-migraineur women (4). Interestingly, these single nucleotide polymorphisms (SNPs) met genome-wide significance in a meta-analysis combining the discovery cohort and three replication sets (4): the Dutch Genetic Epidemiology of Migraine study (GEM), the German Study of Health in Pomerania (SHIP) and the IHGC discovery stage cohort used in the first migraine GWAS (3). None of the three associations was preferential for MA or MO. *LRPI* modulates neuronal glutamate signalling, whereas *TRPM8* has been related to neuropathic pain.

Finally, a meta-analysis of migraine GWAS was performed in a population-based study of six European cohorts, by the Dutch-Icelandic migraine genetics consortium (DICE), which included >2000 cases and >8000 controls (5). No genome-wide significant association was found, although 32 SNPs reached a p -value below 1×10^{-5} . A replication study with a selection of 19 of these SNPs in two Dutch and one Australian cohort did not show any association.

We aimed to replicate the results of the only reported migraine GWAS that focuses on clinic-based samples, which rendered the first variant associated with common forms of migraine. We applied a clinic-based case-control association study design to test the

rs1835740 SNP in a Spanish cohort of 1521 patients and 1379 non-migraineur controls.

Materials and methods

The sample consists of 1521 Caucasian Spanish patients (78.2% women) and 1379 ethnically-matched migraine-free controls (79.2% women), recruited after a direct clinical interview and a physical exam at Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain), Hospital Sant Joan de Déu (Manresa, Barcelona, Spain) and at Fundació Pública Galega de Medicina Xenómica (Santiago de Compostela, Spain) between 2002 and 2010. According to the International Classification for Headache Disorders: 2nd edition (8), patients were classified as MO ($n=951$, 62.5%) or MA ($n=570$, 37.5%). The average age at assessment was 41 years (standard deviation, SD=14.12; range 5 to 86) for patients and 55 years (SD=16.85; range 19 to 96) for controls. The study was approved by the local ethics committees and informed consent was obtained from all the participants or their legal representatives according to the Helsinki Declaration.

DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes (9). Genotyping of the rs1835740 SNP was performed with a Taqman[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Three CEPH samples were included in every plate and a 100% concordance with HapMap data was observed.

Power calculation for analysis under a dominant model, $\alpha=0.05$, lifetime risk of 1.3, disease prevalence of 0.15 and minor allele frequency (MAF) found in controls (0.241), performed with Genetic Power Calculator (pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc) (10), displayed values of 95.5% in the MO group, 87.2% in the MA group and 98.5% in the 'All migraine' group. Statistical analysis for the association study was carried out using the SNPAssoc R library (11). First, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested in our control sample, which was found to be in equilibrium ($p=0.12$). Then, both allele and genotype frequencies were compared between cases and controls, considering codominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive models and adjusting by sex. Three main phenotypic groups were considered in the analysis: MO, MA and 'All migraine'. Additionally, in order to better match the comparisons performed in the original GWAS that we aimed to replicate, the MA group was divided into two subcategories: 'MA only', which includes MA patients that suffered mostly MA episodes, and 'Both MA and MO', including MA patients that suffered MA and MO episodes.

Results and discussion

The present study did not find association between the SNP rs1835740 and any of the clinical groups tested in our cohort, which included ‘All migraine’, MO, MA and the subdivisions of the MA group in ‘MA only’ and ‘Both MA and MO’. The clinical stratification of the analysis is relevant given the varying proportion of the different clinical subgroups in our study (37.5% MA, 62.5% MO) with respect to the cohorts of the original GWAS (only MA in the discovery sample; 0%–84.8% MA and 15.2%–100% MO in the replication samples). The analyses included allele comparisons and also genotype tests under codominant, recessive, dominant, log-additive and overdominant models (see the main results in Table 1). The lowest *p*-value, clearly not significant, was achieved between the MO group and the non-migraineur controls (*p* = 0.15), and the highest *p*-value (*p* = 0.96) corresponded to the MA group, in contrast with the results reported previously (3), where the best association was seen in MA rather than in other clinical groups.

Several reasons may explain the discrepant results between our study and the original one by Anttila et al.: 1) Differences in the study design: first, in the original GWAS, the male:female ratio was different in cases (1:4) and controls (1:1), whereas in our study it was approximately 1:4 in the two groups; second, the controls in the present study were negative for migraine history, whereas they were population-based in the original work; third, the MAF values reported in the two studies are comparable for the cases, but they differ in controls; and fourth, sample size is larger in the GWAS (about 6000 cases and 50,000 controls) compared with the present study (1500 cases and 1300 controls), although the statistical power of our sample exceeds 87%. 2) It is also possible that, the original association being correct, the rs1835740 may not be the actual susceptibility variant, although the fact that it seems to be functionally relevant (3) and its definition as a singleton SNP according to CEU HapMap data (www.hapmap.org, release #28) work against this possibility. 3) Finally, the associated genetic variant may exert population-specific effects depending on genetic/epigenetic background or variable environmental exposures.

Although divergent from the original GWAS (3), our results are in line with previous attempts to replicate the initial finding. Thus, a GWAS in a population-based cohort of migraineurs from the Women’s Genome Health Study failed to identify association of rs1835740 with overall migraine (*p* = 0.22) nor with MA or MO (4). The inspection of SNPs covering the entire genomic region did not reach locus-wide significance either. In a second GWAS (5), rs1835740 and two nearby SNPs (rs982502, rs2436046) did not show

Table 1. Association study of single nucleotide polymorphism (SNP) rs1835740 with several migraine phenotypes in 1521 cases and 1379 screened controls from Spain.

Diagnosis	Genotypes										Alleles				
	Codominant					Recessive					Dominant		p-value	OR (95% CI)	
	N	Ca-Co	MAF	Ca-Co	MAF	GG	GA	AA	GG	GA	AA	AA vs. AG vs. GG			AA vs. G
All migraine	1521-1379	0.231-0.241	906 (59.6)	528 (34.7)	87 (5.7)	804 (58.3)	484 (35.1)	91 (6.6)	0.5748	0.3307	0.86 (0.64–1.17)	0.4963	0.95 (0.82–1.10)	0.3434	0.94 (0.83–1.06)
MO	951-1379	0.223-0.241	577 (60.7)	324 (34.1)	50 (5.3)	804 (58.3)	484 (35.1)	91 (6.6)	0.3101	0.1855	0.79 (0.55–1.12)	0.2568	0.91 (0.77–1.07)	0.1454	0.9 (0.79–1.04)
MA	570-1379	0.244-0.241	329 (57.7)	204 (35.8)	37 (6.5)	804 (58.3)	484 (35.1)	91 (6.6)	0.9593	0.9243	0.98 (0.66–1.46)	0.8188	1.02 (0.84–1.25)	0.8826	1.01 (0.86–1.19)
MA only**	283-1379	0.235-0.241	167 (59.0)	99 (35.0)	17 (6.0)	804 (58.3)	484 (35.1)	91 (6.6)	0.9430	0.7370	0.91 (0.53–1.56)	0.8665	0.98 (0.75–1.27)	0.7822	0.97 (0.78–1.2)
Both MA and MO**	154-1379	0.247-0.241	90 (58.4)	52 (33.8)	12 (7.8)	804 (58.3)	484 (35.1)	91 (6.6)	0.8570	0.6237	1.17 (0.63–2.20)	0.9309	0.99 (0.70–1.38)	0.8911	1.02 (0.78–1.34)

MO: migraine without aura; MA: migraine with aura; MAF: minor allele frequency; Ca: cases; Co: controls; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

*Number of individuals (percentage).

**These subgroups are the result of splitting the MA category (see Materials and methods).

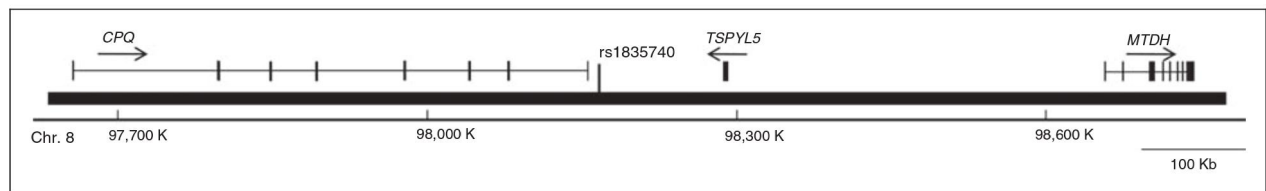


Figure 1. Location of rs1835740 on chromosome 8q22.1, close to the genes *CPQ* (carboxypeptidase Q), *TSPYL5* (TSPY-like 5) and *MTDH* (metadherin). Arrows indicate direction of transcription. Allelic variation of the rs1835740 SNP modulates the transcriptional activity of *MTDH*. Adapted from ENSEMBL (www.ensembl.org, release 63, June 2011).

significant association with migraine in a meta-analysis of six cohorts ($p=0.64$). An association study of SNPs within the *CPQ* and *MTDH* genes, located proximal and distal from rs1835740, respectively (Figure 1), identified a gene-based association with *MTDH* that overcame the Bonferroni correction for multiple testing ($p=0.002$) (5). Furthermore, the Dutch replication cohort inspected in the original GWAS (3) also displayed negative results ($p>0.25$ with ‘All migraine’, ‘MA only’ and ‘Both MA and MO’), whereas there was association in the combined discovery sample from Germany, Finland and the Netherlands ($p=5.38e-09$, ‘All migraine’), and nominal associations in three out of four replication samples (p -values between 0.010 and 0.038, with different migraine phenotypes). Finally, a recent study tested pre-existing genotype data from one of the replication cohorts of the original GWAS for association between rs1835740 and several clinical features of MA, displaying non-significant results (12).

It is possible that the discordant results of the studies by Chasman et al. (4) and Ligthart et al. (5) with respect to the first migraine GWAS (3) may relate to differences in migraine ascertainment, as the original study used a clinic-based cohort, whereas the subsequent works focused on migraineurs from the general population. In this regard, our study is the only one that uses a clinic-based cohort to inspect the genome-wide association signal on rs1835740, with negative results. The patient samples, as described above, were recruited from three Spanish hospitals, and the controls, originating from the same geographical areas as the patients, were screened for migraine and lacked any family history of migraine in their first degree relatives.

In sum, although the association described between rs1835740 and MA in the original clinic-based GWAS remains a robust finding, sustained by a meta-analysis in seven cohorts (3), our study displays a clear negative result in the Spanish population. The in-depth inspection of the *MTDH* genomic region in other clinic-based cohorts is warranted to gain more insight into the possible involvement of this gene in migraine.

Funding

This work was supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (grant nos SAF 2009-13182-C01 and SAF 2009-13182-C03) and Agència de Gestió d’Ajuts Universitaris i de Recerca (grant nos 2009SGR-078, 2009SGR0971). MJS and PC received support for this work from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF2005-07978), Consellería de Educación-Xunta de Galicia (REGENPSI network 2009/019), Fundación Pedro Barrié de la Maza (DIANA program) and FEDER funds.

Acknowledgements

We are grateful to patients and controls for their participation in the study. We thank R Corominas, E Cuenca-León and M Vila for technical assistance.

References

- Schürks M. Genetics of migraine in the age of genome-wide association studies. *J Headache Pain* 2012; 13: 1–9.
- De Vries B, Frants RR, Ferrari MD, et al. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet* 2009; 126: 115–132.
- Anttila V, Stefansson H, Kallela M, et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet* 2010; 42: 869–873.
- Chasman DI, Schurks M, Anttila V, et al. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet* 2011; 43: 695–698.
- Ligthart L, de Vries B, Smith AV, et al. Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 901–907.
- Lee SG, Kim K, Kegelman TP, et al. Oncogene AEG-1 promotes glioma-induced neurodegeneration by increasing glutamate excitotoxicity. *Cancer Res* 2011; 71: 6514–6523.
- Anttila V, Wessman M, Kallela M, et al. Towards an understanding of genetic predisposition to migraine. *Genome Med* 2011; 3: 17.
- International Headache Society (IHS) HCS. The International Classification of Headache Disorders. 2nd edn. *Cephalalgia* 2004; 24(Suppl. 1): 9–160.

9. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
10. Purcell S, Cherny SS and Sham PC. Genetic Power Calculator: Design of linkage and association genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 2003; 19: 149–150.
11. Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, et al. SNPAssoc: An R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; 23: 644–645.
12. Esserlind AL, Kirchmann M, Hauge AW, et al. A genotype–phenotype analysis of the 8q22.1 variant in migraine with aura. *Eur J Neurol* 2012; 19: 603–609.

Article 4

Una anàlisi d'associació a escala genòmica identifica *loci* de susceptibilitat per a la migranya sense aura.

Resum

La migranya sense aura (MO) és la forma més comuna de migranya, caracteritzada per episodis inhabilitants de cefalea associats amb símptomes del sistema nerviós autònom. Per identificar variants genètiques associades amb aquest subtipus migranyós, s'ha dut a terme un estudi d'associació en una mostra clínica de 2326 alemanys i holandesos amb migranya sense aura i 4580 controls. S'han seleccionats SNPs de 12 *loci* que han assolit P-valors $<1 \times 10^{-5}$ per a un estudi de rèplica en 2508 individus MO i 2652 controls, que inclou una mostra de Barcelona. SNPs en dos d'aquests *loci* s'han replicat de manera convincent: al *locus* 1q22 (al gen *MEF2D*; rèplica $P=4.9 \times 10^{-4}$; mostres de descoberta i de rèplica combinades $P=7.06 \times 10^{-11}$) i a 3p24 (prop del gen *TGFBR2*; rèplica $P=1.0 \times 10^{-4}$; mostres combinades $P=1.17 \times 10^{-9}$). A més, SNPs als *loci* de *PHACTR1* i *ASTN2* han donat resultats suggerents ($P=0.01$; mostres combinades $P=3.20 \times 10^{-8}$ pel primer gen, i $P=0.02$; mostres combinades $P=3.86 \times 10^{-8}$ pel segon). També s'han replicat associacions en *loci* prèviament descrits en els gens (o a prop de) *TRPM8* i *LRP1*. Aquest estudi ha permès identificar els primers *loci* de susceptibilitat a la migranya sense aura, contribuint així al coneixement d'aquest trastorn neurològic.

Referència

Freilinger T, Anttila V, de Vries B, Malik R, Kallela M, Terwindt GM, Pozo-Rosich P, Winsvold B, Nyholt DR, van Oosterhout WP, Arto V, Todt U, Hämäläinen E, Fernández-Morales J, Louter MA, Kaunisto MA, Schoenen J, Raitakari O, Lehtimäki T, Vila-Pueyo M, Göbel H, Wichmann E, Sintas C, Uitterlinden AG, Hofman A, Rivadeneira F, Heinze A, Tronvik E, van Duijn CM, Kaprio J, Cormand B, Wessman M, Frants RR, Meitinger T, Müller-Myhsok B, Zwart JA, Färkkilä M, Macaya A, Ferrari MD, Kubisch C, Palotie A, Dichgans M, van den Maagdenberg AM; International Headache Genetics Consortium. *Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura*. Nat Genet. 2012 Jun 10;44(7):777-82. doi: 10.1038/ng.2307.

Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura

Tobias Freilinger^{1,2,36}, Verneri Anttila^{3,4,36}, Boukje de Vries^{5,36}, Rainer Malik¹, Mikko Kallela⁶, Gisela M Terwindt⁷, Patricia Pozo-Rosich^{8,9}, Bendik Winsvold^{3,10}, Dale R Nyholt¹¹, Willebrordus P J van Oosterhout⁷, Ville Artto⁶, Unda Todt¹², Eija Hämäläinen^{3,4}, Jèssica Fernández-Morales^{3,9}, Mark A Louter^{7,13}, Mari A Kaunisto^{4,14}, Jean Schoenen¹⁵, Olli Raitakari¹⁶, Terho Lehtimäki¹⁷, Marta Vila-Pueyo¹⁸, Hartmut Göbel¹⁹, Erich Wichmann²⁰, Cèlia Sintas^{21,22}, Andre G Uitterlinden²³, Albert Hofman²⁴, Fernando Rivadeneira^{23,24}, Axel Heinze¹⁹, Erling Tronvik²⁵, Cornelia M van Duijn²⁴, Jaakko Kaprio^{4,26,27}, Bru Cormand^{21,22,28}, Maija Wessman^{4,14}, Rune R Frants⁵, Thomas Meitinger^{29,30}, Bertram Müller-Myhsok³¹, John-Anker Zwart¹⁰, Markus Färkkilä⁶, Alfons Macaya¹⁸, Michel D Ferrari⁷, Christian Kubisch¹², Aarno Palotie^{3,4,32-34,37}, Martin Dichgans^{1,37} & Arn M J M van den Maagdenberg^{5,7,37} for the International Headache Genetics Consortium³⁵

Migraine without aura is the most common form of migraine, characterized by recurrent disabling headache and associated autonomic symptoms. To identify common genetic variants associated with this migraine type, we analyzed genome-wide association data of 2,326 clinic-based German and Dutch individuals with migraine without aura and 4,580 population-matched controls. We selected SNPs from 12 loci with 2 or more SNPs associated with P values of $<1 \times 10^{-5}$ for replication testing in 2,508 individuals with migraine without aura and 2,652 controls. SNPs at two of these loci showed convincing replication: at 1q22 (in *MEF2D*; replication $P = 4.9 \times 10^{-4}$; combined $P = 7.06 \times 10^{-11}$) and at 3p24 (near *TGFBR2*; replication $P = 1.0 \times 10^{-4}$; combined $P = 1.17 \times 10^{-9}$). In addition, SNPs at the *PHACTR1* and *ASTN2* loci showed suggestive evidence of replication ($P = 0.01$; combined $P = 3.20 \times 10^{-8}$ and $P = 0.02$; combined $P = 3.86 \times 10^{-8}$, respectively). We also replicated associations at two previously reported migraine loci in or near *TRPM8* and *LRP1*. This study identifies the first susceptibility loci for migraine without aura, thereby expanding our knowledge of this debilitating neurological disorder.

Migraine is a disabling episodic neurovascular brain disorder affecting 12% of the general population¹⁻⁴. Migraine attacks are typically characterized by severe, throbbing unilateral headache and nausea, vomiting and photo- and phonophobia (migraine without aura). In up to one-third of affected individuals, attacks may be associated with neurological aura symptoms (migraine with aura). Previous genome-wide association studies (GWAS) identified a migraine susceptibility locus on chromosome 8q22, close to *MTDH*, in the clinic-based International Headache Genetics Consortium (IHGC) migraine

with aura study⁵ and at three other loci in or near *PRDM16*, *LRP1* and *TRPM8* in the population-based Women's Genome Health Study (WGHS) of migraine⁶. Suggestive evidence for association was also found for *TRPM8* ($P < 1 \times 10^{-5}$) in the clinic-based IHGC migraine with aura GWAS⁵. Here, we report the first GWAS of migraine without aura, the most common form of migraine. We analyzed two large samples from headache centers in Germany and The Netherlands, including 2,326 individuals with migraine without aura and 4,580 population-matched controls (**Supplementary Fig. 1** and **Supplementary Note**). A quantile-quantile plot of the joint analysis (**Supplementary Fig. 2**) and an overall genomic inflation factor ($\lambda_{1,000}$) of 1.03 were used as final quality control measures. In the discovery data set, we identified 1 locus associated at genome-wide significance ($P < 5 \times 10^{-8}$) on chromosome 1q22, as well as 11 additional loci containing multiple SNPs with suggestive evidence for association ($P < 1 \times 10^{-5}$) (**Supplementary Table 1**). Eighteen SNPs from these 12 loci were taken forward to the replication stage in 4 independent clinic-based European migraine without aura samples (2,508 cases and 2,652 controls) (**Supplementary Fig. 1** and **Supplementary Table 1**). Eight SNPs in six loci showed P values of <0.05 in the replication study, and five of these SNPs also showed P values of $<5 \times 10^{-8}$ in the meta-analysis combining the discovery and replication cohorts (**Fig. 1**, **Table 1** and **Supplementary Fig. 3**). Associations were replicated for four loci (at 1q22, 3p24, 6p24 and 9q33), although replication was less convincing for the loci at 6p24 and 9q33, with replication P values of 0.012 and 0.018, respectively, even though association P values for these loci were $<5 \times 10^{-8}$ in the overall meta-analysis. In addition, we tested top SNPs of the four previously identified migraine-associated loci (at 1p36, 2q37, 8q22 and 12q13)^{5,6} in the replication stage (**Fig. 2** and **Supplementary Table 1**),

A full list of affiliations appears at the end of the paper.

Received 13 December 2011; accepted 3 May 2012; published online 10 June 2012; doi:10.1038/ng.2307

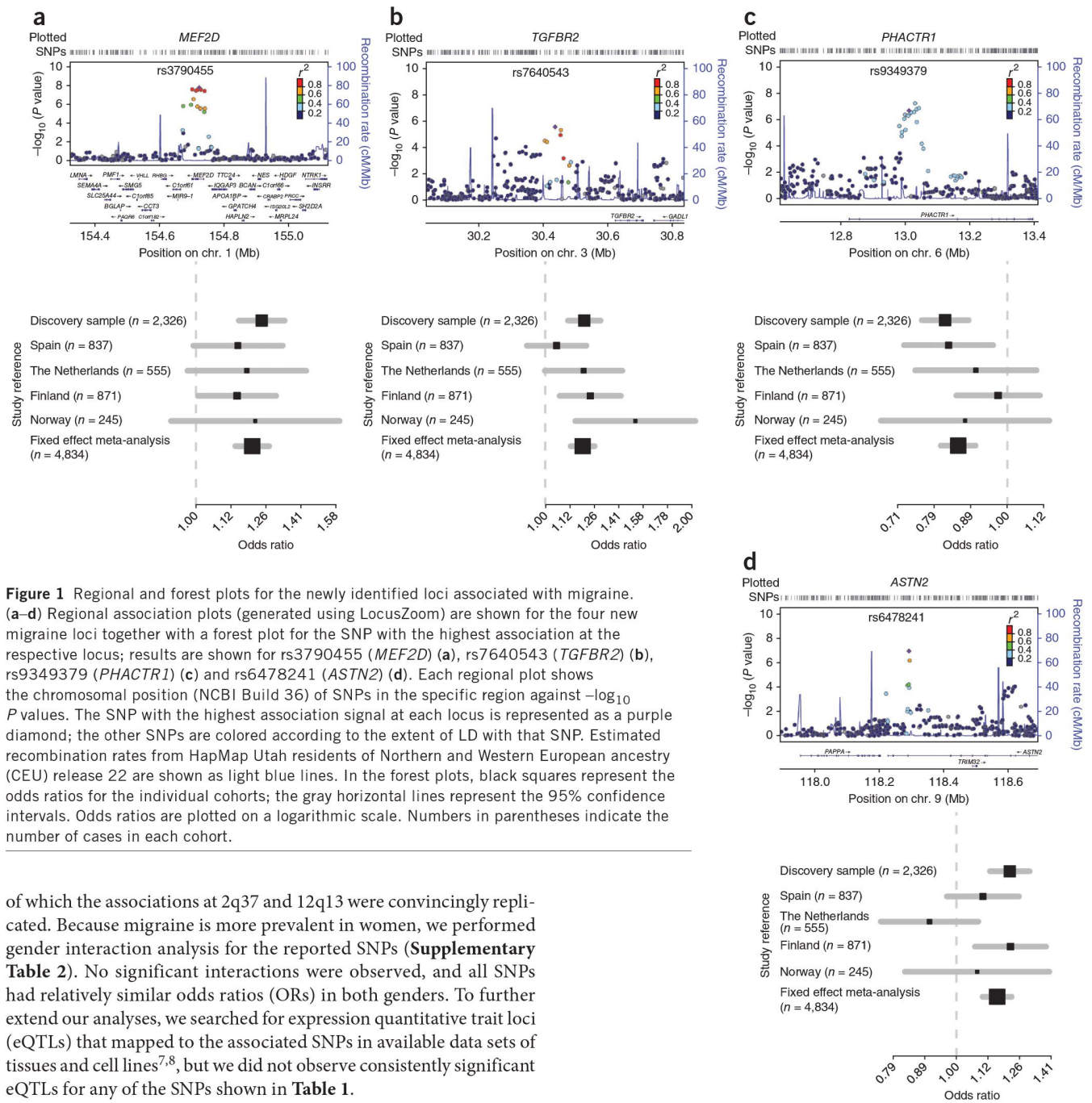


Figure 1 Regional and forest plots for the newly identified loci associated with migraine. (a–d) Regional association plots (generated using LocusZoom) are shown for the four new migraine loci together with a forest plot for the SNP with the highest association at the respective locus; results are shown for rs3790455 (*MEF2D*) (a), rs7640543 (*TGFBR2*) (b), rs9349379 (*PHACTR1*) (c) and rs6478241 (*ASTN2*) (d). Each regional plot shows the chromosomal position (NCBI Build 36) of SNPs in the specific region against $-\log_{10}$ *P* values. The SNP with the highest association signal at each locus is represented as a purple diamond; the other SNPs are colored according to the extent of LD with that SNP. Estimated recombination rates from HapMap Utah residents of Northern and Western European ancestry (CEU) release 22 are shown as light blue lines. In the forest plots, black squares represent the odds ratios for the individual cohorts; the gray horizontal lines represent the 95% confidence intervals. Odds ratios are plotted on a logarithmic scale. Numbers in parentheses indicate the number of cases in each cohort.

of which the associations at 2q37 and 12q13 were convincingly replicated. Because migraine is more prevalent in women, we performed gender interaction analysis for the reported SNPs (Supplementary Table 2). No significant interactions were observed, and all SNPs had relatively similar odds ratios (ORs) in both genders. To further extend our analyses, we searched for expression quantitative trait loci (eQTLs) that mapped to the associated SNPs in available data sets of tissues and cell lines^{7,8}, but we did not observe consistently significant eQTLs for any of the SNPs shown in Table 1.

The locus at 1q22 contained six SNPs that were associated with genome-wide significance ($P < 5 \times 10^{-8}$) in the discovery stage of the analysis and that were all in close linkage disequilibrium (LD; $r^2 > 0.98$). The rs1050316 and rs3790455 SNPs were taken forward to the replication stage, and associations were successfully replicated (overall meta-analysis *P* values of 3.21×10^{-10} (OR = 1.19) and 7.06×10^{-11} (OR = 1.20), respectively) (Fig. 1, Table 1 and Supplementary Fig. 3). All associated SNPs were located within the *MEF2D* gene (encoding myocyte enhancer factor 2D) (intronic and within the 3' UTR). The *MEF2D* protein is a transcription factor that is highly expressed in brain. *MEF2D* regulates neuronal differentiation by supporting the survival of newly formed neurons⁹. Perhaps even more relevant to migraine, neuronal activity-dependent activation of *MEF2D* restricts the number of excitatory synapses¹⁰. As the brain in migraine is

hyperexcitable¹¹, it is tempting to speculate that *MEF2D* dysregulation might affect neuronal excitatory neurotransmission in individuals with migraine without aura. There is some evidence for increased levels of glutamate (the main brain excitatory neurotransmitter) in individuals with migraine^{12,13}, and increased glutamatergic neurotransmission was reported in a transgenic knock-in mouse model with a pathogenic mutation in the human *CACNA1A* gene associated with hemiplegic migraine¹⁴. A role for *MEF2D* dysregulation in migraine is also plausible given that several *MEF2* transcriptional targets have been associated with other neurological disorders, such as epilepsy^{15–17}. Notably, pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide-38 (PACAP-38), which is encoded by one of the

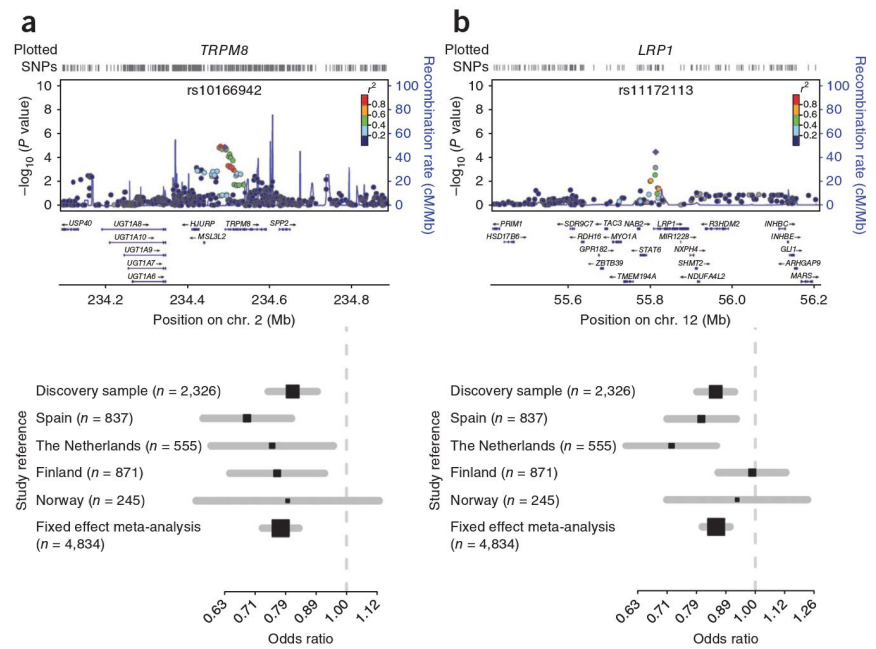
Table 1 SNPs at the six loci associated with migraine without aura

SNP	General SNP information				Discovery samples			All replications			Overall meta-analysis						
	Chr.	Position ^a	Location	Gene ^b	Minor allele frequency	Minor allele	Sequence type ^c	P value	OR (95% CI)	r ²	P value	OR (95% CI)	r ²	P value	OR (95% CI)	r ² with top SNP	
Locus 1																	
rs1050316	1	154701327	Intragenic	<i>MEF2D</i>	G	0.34	Imputed	2.59 × 10⁻⁸	1.24 (1.15–1.33)	0.00	1.15 × 10 ⁻³	1.14 (1.06–1.24)	0.00	3.21 × 10⁻¹⁰	1.19 (1.13–1.26)	0.00	0.987
rs2274316	1	154712866	Intragenic	<i>MEF2D</i>	C	0.35	Genotyped	3.60 × 10⁻⁸	1.23 (1.14–1.33)	0.00	–	–	–	–	–	–	0.986
rs1925950	1	154717364	Intragenic	<i>MEF2D</i>	G	0.35	Imputed	2.97 × 10⁻⁸	1.24 (1.15–1.33)	0.00	–	–	–	–	–	–	0.988
rs3790455	1	154722925	Intragenic	<i>MEF2D</i>	C	0.34	Genotyped	1.71 × 10⁻⁸	1.24 (1.15–1.34)	0.00	4.85 × 10 ⁻⁴	1.16 (1.07–1.26)	0.00	7.06 × 10⁻¹¹	1.20 (1.14–1.27)	0.00	–
rs3790459	1	154728331	Intragenic	<i>MEF2D</i>	A	0.35	Imputed	2.85 × 10⁻⁸	1.24 (1.15–1.33)	0.00	–	–	–	–	–	–	0.989
rs12136856	1	154739738	Intergenic	<i>MEF2D</i>	C	0.34	Imputed	3.90 × 10⁻⁸	1.23 (1.15–1.33)	0.00	–	–	–	–	–	–	0.985
Locus 2																	
rs7640543	3	30437407	Intergenic	<i>TGFBP2</i>	A	0.32	Genotyped	2.72 × 10 ⁻⁶	1.20 (1.11–1.30)	0.00	1.02 × 10 ⁻⁴	1.18 (1.09–1.29)	0.51	1.17 × 10⁻⁹	1.19 (1.13–1.26)	0.19	–
Locus 3																	
rs9349379	6	13011943	Intragenic	<i>PHACTR1</i>	G	0.38	Genotyped	2.06 × 10 ⁻⁷	0.82 (0.77–0.89)	0.00	0.01	0.90 (0.83–0.98)	0.00	3.20 × 10⁻⁸	0.86 (0.81–0.91)	0.10	–
Locus 4																	
rs6478241	9	118292450	Intragenic	<i>ASTN2</i>	A	0.38	Genotyped	1.14 × 10 ⁻⁷	1.22 (1.13–1.31)	0.00	0.02	1.10 (1.02–1.19)	0.57	3.86 × 10⁻⁸	1.16 (1.10–1.23)	0.56	–
Locus 5																	
rs10166942	2	234489832	Intergenic	<i>TRPM8</i>	C	0.18	Genotyped	1.32 × 10 ⁻⁵	0.82 (0.74–0.89)	0.00	5.62 × 10 ⁻⁹	0.74 (0.67–0.82)	0.00	9.83 × 10⁻¹³	0.78 (0.73–0.84)	0.00	–
rs17862920	2	234492734	Intragenic	<i>TRPM8</i>	T	0.10	Genotyped	2.19 × 10 ⁻⁵	0.78 (0.69–0.87)	0.00	6.44 × 10 ⁻⁵	0.75 (0.66–0.87)	0.00	5.97 × 10⁻⁹	0.77 (0.70–0.84)	0.00	0.520
Locus 6																	
rs11172113	12	55813550	Intragenic	<i>LRP1</i>	C	0.40	Genotyped	3.38 × 10 ⁻⁵	0.86 (0.80–0.92)	0.00	2.33 × 10 ⁻⁴	0.86 (0.79–0.93)	0.67	2.97 × 10⁻⁸	0.86 (0.81–0.91)	0.45	–

SNPs showing significant association either in the discovery stage (locus 1) or after meta-analysis of the discovery and replication samples (loci 2–6). Genome-wide significant *P* values and successful replications are shown in boldface. ORs are reported for the minor allele. Chr., chromosome; r², heterogeneity index. r² indicates the LD between the SNP and the top SNP at the respective locus.

^aChromosomal positions are based on NCBI Build 36. ^bFor intragenic SNPs, the gene is listed in which the SNP is located, whereas, for intergenic SNPs, the nearest gene is listed. ^cIndicates whether a SNP was genotyped or imputed.

Figure 2 Regional and forest plots for the previously reported loci associated with migraine that replicate in the current migraine without aura study. **(a,b)** Regional association plots (generated using LocusZoom) are shown for the two previously reported migraine loci⁶ that significantly replicated in the current study together with forest plots for the SNP with the highest association at these loci; results are shown for rs10166942 (*TRPM8*) **(a)** and rs11172113 (*LRP1*) **(b)**. Each regional plot shows the chromosomal position (NCBI Build 36) of SNPs in the specific region against $-\log_{10} P$ values. The SNP with the highest association signal in each locus is represented as a purple diamond; the other SNPs are colored according to the extent of LD with this SNP. Estimated recombination rates from HapMap CEU release 22 are shown as light blue lines. In the forest plots, black squares represent the odds ratios for the individual cohorts; the gray horizontal lines represent the 95% confidence intervals. Odds ratios are plotted on a logarithmic scale. Numbers in parentheses indicate the number of cases in each cohort.



activity-regulated MEF2D target genes and modulates excitatory synaptic transmission, may trigger migraine-like attacks in persons with migraine without aura¹⁸. In mice, PACAP-38 is involved in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation¹⁹, which is the presumed origin of the migraine headache²⁰.

The locus at 3p24 contained the top SNP rs7640543 (discovery $P = 2.72 \times 10^{-6}$, OR = 1.20). This SNP showed strong replication of association ($P = 1.02 \times 10^{-4}$) and reached genome-wide significance in the meta-analysis of the discovery and replication samples ($P = 1.17 \times 10^{-9}$, OR = 1.19) (Fig. 1, Table 1 and Supplementary Fig. 3). rs7640543 is located ~200 kb upstream of *TGFBR2* (encoding transforming growth factor β receptor 2). The encoded serine-threonine kinase is involved in the regulation of cell proliferation and differentiation, as well as in extracellular matrix production²¹. *TGFBR2* is an attractive candidate gene for migraine, as the missense mutation in *TGFBR2* leading to a p.Arg460His substitution not only caused seemingly monogenic, familial aortic dissection but also caused migrainous headaches in 11 of 14 mutation carriers in a large multigenerational family²². This may fit with the observation that migraineurs seemed to have a twofold increased risk for cervical artery dissection²³.

For the locus at 6p24, the rs9349379 SNP reached genome-wide significance when combining the data from the discovery and replication samples ($P = 3.20 \times 10^{-8}$, OR = 0.86) (Fig. 1, Table 1 and Supplementary Fig. 3). Five SNPs (with association at $P < 1 \times 10^{-5}$) were taken forward to the replication stage (Supplementary Table 1). All five SNPs were located in *PHACTR1* (encoding phosphatase and actin regulator 1). The encoded protein is a member of the PHACTR/scapin family, which controls synaptic activity and synapse morphology through regulation of protein phosphatase 1 and actin binding^{24,25}. *PHACTR1* has further been implicated in endothelial cell function²⁶ and susceptibility to early-onset myocardial infarction²⁷. Thus, the link between *PHACTR1* and migraine could be neuronal, through aberrant synaptic transmission, or vascular, as endothelial dysfunction, cardiovascular disease and myocardial infarction all seemed to be linked with migraine²⁸. Like *TGFBR2*, *PHACTR1* may also be involved in systemic vascular disease through a TGF- β signaling pathway.

The locus at 9p33 with the top SNP rs6478241 reached genome-wide significance in the meta-analysis of the discovery and replication

samples, although there was heterogeneity ($I^2 = 0.57$) in the replication samples ($P = 3.86 \times 10^{-8}$, OR = 1.16) (Fig. 1, Table 1 and Supplementary Fig. 3). In one of the four replication cohorts, the effect direction was opposite to those observed in the discovery sample and the other replication samples. This locus should be considered tentatively, and further studies are needed to confirm its relevance to migraine. rs6478241 is located in *ASTN2*, a member of the astrotactin gene family, which has a role in the glial-guided migration that seems important for development of the laminar architecture of cortical regions in the brain²⁹. Although structural abnormalities in migraineurs have been reported in the somatosensory cortex³⁰ and the cerebellum³¹, they more likely reflect degenerative processes related to severe migraine attacks than developmental problems. Therefore, it remains unclear at present how *ASTN2* could have a role in migraine pathophysiology.

In addition, two of the four previously reported migraine loci^{5,6} showed significant association in the current clinic-based migraine without aura GWAS. Two top SNPs ($r^2 = 0.52$) in the migraine-associated locus at 2q37 reached genome-wide significance in the overall migraine without aura meta-analysis (rs10166942: $P = 9.83 \times 10^{-13}$, OR = 0.78; rs17862920: $P = 5.97 \times 10^{-9}$, OR = 0.77) (Fig. 2, Table 1 and Supplementary Fig. 3). The rs10166942 SNP is located approximately 1 kb upstream of the predicted transcriptional start site of *TRPM8* (encoding transient receptor potential melastatin 8), whereas rs17862920 is located in the first intron of *TRPM8*. *TRPM8* encodes a cold- and menthol-activated ion channel that is expressed in sensory neurons. The gene was identified as a migraine susceptibility gene, both in the population-based WGHS migraine GWAS⁶ and in the clinic-based IHGC migraine with aura GWAS⁵. The effect direction of these SNPs was the same in all three studies, and the effect size estimates were similar (OR = 0.78 in the clinic-based IHGC migraine with aura study for rs17862920 versus 0.77 in the present study; OR = 0.85 in the population-based WGHS migraine study for rs10166942 versus 0.78 in the present study). *TRPM8* could be involved in cutaneous allodynia³²⁻³⁴, which is defined as pain due to thermal or mechanical stimuli that normally do not provoke pain, and is present in the majority of individuals with migraine.

The top SNP at the previously reported migraine-associated locus at 12q13 (ref. 6) reached genome-wide significance in the overall migraine without aura meta-analysis (rs11172113: overall $P = 2.97 \times 10^{-8}$, OR = 0.86) (Fig. 2, Table 1 and Supplementary Fig. 3). rs11172113 is located within the first intron of *LRP1*, which encodes the low-density lipoprotein receptor-related protein 1, a protein that is expressed in multiple tissues, including neurons and vasculature. LRP1 is a cell surface receptor that acts as a sensor of the extracellular environment: it is involved in the proliferation of vascular smooth muscle cells and modulates synaptic transmission^{35,36}. A possible role for LRP1 in migraine can be envisaged because of its neuronal and/or vascular function.

Addressing the question of whether migraine with aura and migraine without aura represent different disease entities^{37,38}, we tested the top SNPs from the six loci from the current migraine without aura study *in silico* in our previous IHGC migraine with aura GWAS data set⁵ (Supplementary Table 3). Except for the locus at 3p24, all loci showed P values below 0.05 in the migraine with aura data set, and ORs were in the same direction in both studies. The *TRPM8* locus showed the most significant P value for association (rs1786920: 2.19×10^{-5} , OR = 0.78; rs10166942: 1.32×10^{-5} , OR = 0.82) in the migraine with aura data set. Notably, rs10166942 also showed association in the WGHS migraine study ($P = 2.30 \times 10^{-7}$, OR = 0.86 in the initial scan)⁶. This suggests that *TRPM8* may have a role in various forms of migraine. In contrast, the rs1835740 SNP at 8q22 in the IHGC migraine with aura GWAS⁵ pointing at *MTDH* as the putative migraine susceptibility gene⁵ did not show association in the present GWAS ($P = 0.70$) nor in the population-based WGHS migraine GWAS⁶ ($P = 0.22$). This may suggest that *MTDH* confers more susceptibility to aura than to headache.

In conclusion, we present the first GWAS of migraine without aura, the most common migraine type, and identify several associated loci. Two loci (*MEF2D* and *TGFBR2*) showed convincing association in the replication stage and genome-wide significance levels in the combined meta-analysis. Replication for the *PHACTR1* and *ASTN2* loci was weaker, and additional studies are needed to test their relevance as migraine susceptibility loci. In addition, two of the four previously identified loci associated with migraine (*TRPM8* and *LRP1*) were replicated in this clinic-based migraine without aura study. Functional studies are necessary to dissect the exact underlying molecular pathways in order to identify putative treatment targets for this common debilitating brain disorder.

URLs. GWAMA, <http://www.well.ox.ac.uk/gwama/>; NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>; HapMap 3 data, <http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/>; IMPUTE2, http://mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/impute_v2.html; SNPTEST, <http://www.stats.ox.ac.uk/~marchini/software/gwas/snpctest.html>; LocusZoom, <http://csg.sph.umich.edu/locuszoom/>; Genotype-Tissue Expression (GTEx) eQTL Browser, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gtex/test/GTEX2/gtex.cgi>.

METHODS

Methods and any associated references are available in the online version of the paper.

Note: Supplementary information is available in the online version of the paper.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank all individuals in the respective cohorts for their generous participation. This work was supported by the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) (grant 01GS08121 to M.D., along with support to E.W. in the context of the German National Genome Research Network, (NGFN-2 and NGFN-plus) for the Heinz Nixdorf Recall Study); the Spanish Ministry of

Science and Innovation (grant SAF2009-13182-C03 to A.M. and B.C.); the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (grants 2009SGR78 and 2009SGR971 to A.M. and B.C., respectively); an unrestricted grant of the Vascular Dementia Research Foundation (to M.D.); the Netherlands Organization for Health Research and Development (ZonMw) (90700217) and VIDI (ZonMw) (91711319 to G.M.T.); the Netherlands Organisation for Scientific Research (NWO) VICI (918.56.602) and Spinoza (2009) grants (to M.D.F.); the Center for Medical Systems Biology (CMSB) established in the Netherlands Genomics Initiative/Netherlands Organisation for Scientific Research (NGI/NWO) (project 050-060-409 to C.M.v.D., R.R.F., M.D.F. and A.M.J.M.v.d.M. and 050-060-810 to C.M.v.D.) and the generation and management of GWAS genotype data for the Rotterdam Study (175.010.2005.011 and 911-03-012) (funded by the Erasmus Medical Center, Erasmus University Rotterdam and the Ministries of Education, Culture and Science, Health, Welfare and Sports), as well as the NGL-sponsored Netherlands Consortium for Healthy Aging (NCHA) and the Research Institute for Diseases in the Elderly (014-93-015; RIDE2); the German Federal Ministry of Education and Research (BMBF) within the framework of the National Genome Research Network (NGFN-Plus; grants 01GS08120 and 01GS1103 to C.K.); the German Federal Ministry of Education and Research and the State of Bavaria, supported within the Munich Center of Health Sciences (MC Health) as part of LMUinnovativ) for the KORA research platform, which was initiated by the Helmholtz Center Munich, German Research Center for Environmental Health; the National Health and Medical Research Council (NHMRC) Research Fellowship (613674) and the Australian Research Council (ARC) Future Fellowship (FT0991022) schemes (to D.R.N.); the Wellcome Trust (grant 098051 to A.P.); the Academy of Finland (grant 251704 to A.P. and 139795 to M.W.); the Academy of Finland, Center of Excellence in Complex Disease Genetics (grants 213506 and 129680 to A.P. and J.K.); the South-Eastern Norway Regional Health Authority (2010075 and 2011083 to B.W. and J.-A.Z.), the Unger-Vetlesen Medical Fund (to B.W.) and the Ullevaal fund (to B.W.); the European Community's Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013), the ENGAGE Consortium, (grant agreement HEALTH-F4-2007-201413); EU/SYNSYS-Synaptic Systems (grant 242167 to A.P.); the Sigrid Juselius Foundation, Finland (to A.P.); the Folkhälsan Research Foundation, Helsinki (to M.W.); and the Helsinki University Central Hospital (to M.K., V. Artto and M.F.).

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Funding was obtained by M.D., M.D.F., A.P., A.M.J.M.v.d.M., C.K. and C.M.v.D. Overall study design was guided by T.F., V. Anttila, B.d.V., R.M., D.R.N., J.-A.Z., C.K., A.P., M.D. and A.M.J.M.v.d.M. Cohorts were supervised and phenotyped by T.F., M.K., G.M.T., P.P.-R., B.W., W.P.J.v.O., V. Artto, U.T., J.F.-M., M.A.L., M.A.K., J.S., O.R., T.L., M.V.-P., H.G., E.W., C.S., A.G.U., A. Heinze, A. Hoffman, E.T., C.M.v.D., J.K., B.C., T.M., J.-A.Z., M.F. and A.M. Analysis and genotyping were performed by V. Anttila, B.d.V., R.M., B.W., D.R.N., E.H., A.G.U., F.R., M.W., T.M. and B.M.-M. The manuscript was written by T.F., V. Anttila, B.d.V., D.R.N., B.C., M.W., R.R.F., J.-A.Z., C.K., A.P., M.D. and A.M.J.M.v.d.M. All authors participated in critical review of the manuscript for intellectual content.

COMPETING FINANCIAL INTERESTS

The authors declare no competing financial interests.

Published online at <http://www.nature.com/doi/10.1038/ng.2307>.

Reprints and permissions information is available online at <http://www.nature.com/reprints/index.html>.

1. Launer, L.J., Terwindt, G.M. & Ferrari, M.D. The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: the GEM study. *Neurology* **53**, 537–542 (1999).
2. Stovner, L.J., Zwart, J.A., Hagen, K., Terwindt, G.M. & Pascual, J. Epidemiology of headache in Europe. *Eur. J. Neurol.* **13**, 333–345 (2006).
3. Stovner, L. *et al.* The global burden of headache: a documentation of headache prevalence and disability worldwide. *Cephalgia* **27**, 193–210 (2007).
4. Olesen, J., Lekander, I., Andlin-Sobocki, P. & Jönsson, B. Funding of headache research in Europe. *Cephalgia* **27**, 995–999 (2007).
5. Anttila, V. *et al.* Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat. Genet.* **42**, 869–873 (2010).
6. Chasman, D.I. *et al.* Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat. Genet.* **43**, 695–698 (2011).
7. Dimas, A.S. *et al.* Common regulatory variation impacts gene expression in a cell type-dependent manner. *Science* **325**, 1246–1250 (2009).
8. Nica, A.C. *et al.* The architecture of gene regulatory variation across multiple human tissues: the MuTHER study. *PLoS Genet.* **7**, e1002003 (2011).
9. Lin, X., Shah, S. & Balleit, R.F. The expression of *MEF2* genes is implicated in CNS neuronal differentiation. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **42**, 307–316 (1996).
10. Flavell, S.W. *et al.* Activity-dependent regulation of *MEF2* transcription factors suppresses excitatory synapse number. *Science* **311**, 1008–1012 (2006).

11. Aurora, S.K. & Wilkinson, F. The brain is hyperexcitable in migraine. *Cephalalgia* **27**, 1442–1453 (2007).
12. Ferrari, M.D., Odink, J., Bos, K.D., Malessy, M.J. & Bruyn, G.W. Neuroexcitatory plasma amino acids are elevated in migraine. *Neurology* **40**, 1582–1586 (1990).
13. Martínez, F., Castillo, J., Rodríguez, J.R., Leira, R. & Noya, M. Neuroexcitatory amino acid levels in plasma and cerebrospinal fluid during migraine attacks. *Cephalalgia* **13**, 89–93 (1993).
14. Tottene, A. *et al.* Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca_v2.1 knockin migraine mice. *Neuron* **61**, 762–773 (2009).
15. Flavell, S.W. *et al.* Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron* **60**, 1022–1038 (2008).
16. Morrow, E.M. *et al.* Identifying autism loci and genes by tracing recent shared ancestry. *Science* **321**, 218–223 (2008).
17. Pfeiffer, B.E. *et al.* Fragile X mental retardation protein is required for synapse elimination by the activity-dependent transcription factor MEF2. *Neuron* **66**, 191–197 (2010).
18. Schyrtz, H.W. *et al.* PACAP38 induces migraine-like attacks in patients with migraine without aura. *Brain* **132**, 16–25 (2009).
19. Markovics, A. *et al.* Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide plays a key role in nitroglycerol-induced trigeminovascular activation in mice. *Neurobiol. Dis.* **45**, 633–644 (2012).
20. Goadsby, P.J., Lipton, R.B. & Ferrari, M.D. Migraine—current understanding and treatment. *N. Engl. J. Med.* **346**, 257–270 (2002).
21. Lin, H.Y., Wang, X.F., Ng-Eaton, E., Weinberg, R.A. & Lodish, H.F. Expression cloning of the TGF- β type 2 receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* **68**, 775–785 (1992).
22. Law, C. *et al.* Clinical features in a family with an R460H mutation in transforming growth factor β receptor 2 gene. *J. Med. Genet.* **43**, 908–916 (2006).
23. Rist, P.M., Diener, H.C., Kurth, T. & Schürks, M. Migraine, migraine aura, and cervical artery dissection: a systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia* **31**, 886–896 (2011).
24. Allen, P.B., Greenfield, A.T., Svenningsson, P., Haspelagh, D.C. & Greengard, P. Phactrs 1–4: a family of protein phosphatase 1 and actin regulatory proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 7187–7192 (2004).
25. Greengard, P., Allen, P.B. & Nairn, A.C. Beyond the dopamine receptor: the DARPP-32/protein phosphatase-1 cascade. *Neuron* **23**, 435–447 (1999).
26. Jarray, R. *et al.* Depletion of the novel protein PHACTR-1 from human endothelial cells abolishes tube formation and induces cell death receptor apoptosis. *Biochimie* **93**, 1668–1675 (2011).
27. Myocardial Infarction Genetics Consortium. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nat. Genet.* **41**, 334–341 (2009).
28. Tietjen, G.E. Migraine as a systemic vasculopathy. *Cephalalgia* **29**, 987–996 (2009).
29. Wilson, P.M., Fryer, R.H., Fang, Y. & Hatten, M.E. *Astn2*, a novel member of the astroctactin gene family, regulates the trafficking of ASTN1 during glial-guided neuronal migration. *J. Neurosci.* **30**, 8529–8540 (2010).
30. DaSilva, A.F., Granziera, C., Snyder, J. & Hadjikhani, N. Thickening in the somatosensory cortex of patients with migraine. *Neurology* **69**, 1990–1995 (2007).
31. Kruit, M.C. *et al.* Migraine as a risk factor for subclinical brain lesions. *J. Am. Med. Assoc.* **291**, 427–434 (2004).
32. Proudfoot, C.J. *et al.* Analgesia mediated by the TRPM8 cold receptor in chronic neuropathic pain. *Curr. Biol.* **16**, 1591–1605 (2006).
33. Caspani, O., Zurborg, S., Labuz, D. & Heppenstall, P.A. The contribution of TRPM8 and TRPA1 channels to cold allodynia and neuropathic pain. *PLoS ONE* **4**, e7383 (2009).
34. d'Agostino, V.C., Francia, E., Licursi, V. & Cerbo, R. Clinical and personality features of allodynic migraine. *Neurol. Sci.* **31** (suppl. 1), S159–S161 (2010).
35. Lillis, A.P., van Duyn, L.B., Murphy-Ullrich, J.E. & Strickland, D.K. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiol. Rev.* **88**, 887–918 (2008).
36. May, P. *et al.* Neuronal LRP1 functionally associates with postsynaptic proteins and is required for normal motor function in mice. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 8872–8883 (2004).
37. Russell, M.B., Rasmussen, B.K., Fenger, K. & Olesen, J. Migraine without aura and migraine with aura are distinct clinical entities: a study of four hundred and eighty-four male and female migraineurs from the general population. *Cephalalgia* **16**, 239–245 (1996).
38. Kallela, M., Wessman, M., Havanka, H., Palotie, A. & Färkkilä, M. Familial migraine with and without aura: clinical characteristics and co-occurrence. *Eur. J. Neurol.* **8**, 441–449 (2001).

¹Institute for Stroke and Dementia Research, Klinikum der Universität München, Munich, Germany. ²Department of Neurology, Klinikum der Universität München, Munich, Germany. ³Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, UK. ⁴Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM), University of Helsinki, Helsinki, Finland. ⁵Department of Human Genetics, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands. ⁶Department of Neurology, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland. ⁷Department of Neurology, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands. ⁸Department of Neurology, Vall d'Hebron University Hospital, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ⁹Headache Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁰Department of Neurology, Oslo University Hospital and University of Oslo, Oslo, Norway. ¹¹Neurogenetics Laboratory, Queensland Institute of Medical Research, Brisbane, Queensland, Australia. ¹²Institute of Human Genetics, University of Ulm, Ulm, Germany. ¹³Department of Psychiatry, Leiden University Medical Centre, Leiden, The Netherlands. ¹⁴Folkhälsan Research Center, Helsinki, Finland. ¹⁵Headache Research Unit, Department of Neurology and Groupe Interdisciplinaire de Génoprotéomique Appliquée (GIGA)-Neurosciences, Liège University, Liège, Belgium. ¹⁶Department of Clinical Physiology, University of Turku and Turku University Central Hospital, Turku, Finland. ¹⁷Department of Clinical Chemistry, Tampere University Hospital and University of Tampere, Tampere, Finland. ¹⁸Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. ¹⁹Kiel Pain and Headache Center, Kiel, Germany. ²⁰Institute of Epidemiology, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany. ²¹Department of Genetics, University of Barcelona, Barcelona, Spain. ²²Biomedical Network Research Centre on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain. ²³Department of Internal Medicine, Erasmus Medical Center, Rotterdam, The Netherlands. ²⁴Department of Epidemiology, Erasmus University Medical Center, Rotterdam, The Netherlands. ²⁵Department of Neuroscience, Norwegian University of Science and Technology, Trondheim, Norway. ²⁶Department of Public Health, University of Helsinki, Helsinki, Finland. ²⁷Department of Mental Health and Alcohol Research, National Institute for Health and Welfare, Helsinki, Finland. ²⁸Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain. ²⁹Institute of Human Genetics, Helmholtz Zentrum München, Neuherberg, Germany. ³⁰Institute of Human Genetics, Klinikum Rechts der Isar, Technische Universität München, Munich, Germany. ³¹Max Planck Institute of Psychiatry, Munich, Germany. ³²The Broad Institute of MIT and Harvard, Boston, Massachusetts, USA. ³³Department of Medical Genetics, University of Helsinki, Helsinki, Finland. ³⁴Department of Medical Genetics, Helsinki University Central Hospital, Helsinki, Finland. ³⁵A full list of members and affiliations is provided in the **Supplementary Note**. ³⁶These authors contributed equally to this work. ³⁷These authors jointly directed this work. Correspondence should be addressed to A.P. (ap8@sanger.ac.uk) or A.M.J.M.v.d.M. (maagdenberg@lumc.nl).

ONLINE METHODS

Overall study design. The discovery stage of the study was based on an analysis of *de novo* genotyping in two large migraine without aura sample sets from headache clinics in Germany (Munich and Kiel) and The Netherlands (Leiden) (**Supplementary Fig. 1**). Population-matched controls were recruited from studies with existing genotyping data (details of study cohorts and controls are given in the **Supplementary Note**). For both sample sets, raw data were imputed to approximately 1.4 million SNPs using HapMap 3 release 2 (ref. 39) as a reference panel. As an initial step, genome-wide logistic regression analysis was performed independently in both samples, and meta-analysis was then performed for the two data sets. Subsequently, the top SNPs from the meta-analysis were tested for replication in four smaller, clinic-based migraine without aura samples from Finland (Helsinki), Spain (Barcelona), Norway (Trondheim) and The Netherlands (Leiden) (**Fig. 1** and **Supplementary Fig. 1**).

Ethical aspects. Written informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by the respective local research ethics committees of the Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilian-University (Germany), the University of Leiden Medical Centre (The Netherlands), the Helsinki University Central Hospital (Finland), the Vall d'Hebron Research Institute (Spain) and the Regional Committee for Medical and Health Research Ethics (Norway).

Discovery-stage genotyping. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples according to standard protocols. Genotyping of the German GWAS sample was performed at the Genome Analysis Center at Helmholtz Zentrum München using the Illumina Human 610-Quad v1 ($n = 838$) or Illumina Human 660W-Quad v1 ($n = 391$) SNP microarrays according to the Infinium II protocol from the manufacturer. Genotype calling was performed using Illumina Gencall data analyses software. Genotyping of the complete Dutch GWAS sample was performed at the Wellcome Trust Sanger Institute using Illumina 660W technology. Genotype calling was performed using Illuminus software⁴⁰.

Replication-stage genotyping. For the replication study, all cases and controls were genotyped at the Wellcome Trust Sanger Institute using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry with Sequenom MassARRAY methodology. Amplification reactions and parameters were based on the manufacturer's instructions. Each 384-well plate contained positive (Centre d'Etude du Polymorphisme Humain (CEPH) DNA) and negative controls to check for assay performance and contamination, respectively. Spectrocaller software supplied by the manufacturer was used to automatically call the genotypes. Clusters were checked manually, and all doubtful calls were evaluated.

In the replication stage, we selected all loci with at least two SNPs with $P < 1 \times 10^{-5}$ in the discovery stage for follow-up (**Supplementary Table 1**). Two SNPs each were selected from the loci considered to be most convincing (*MEF2D*, *PHACTR1*, near *TGFBR2* and *FHL5*), and one SNP each was selected from the remaining loci (**Supplementary Table 1**). At the *PHACTR1* locus, as we observed both effect directions for minor alleles in the discovery stage, we chose three additional SNPs (for a total of five) for follow-up at this locus to robustly cover possible heterogeneity. In addition, the top SNPs from the four previously reported migraine-associated loci (**Supplementary Table 1**) were included in the replication stage.

Quality control. To ensure high data quality, the data sets from the primary study were subjected to per-SNP and per-sample quality control analysis before and after imputation. In both types of analysis, cutoffs of 1% for minor allele frequency and 1×10^{-6} for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) P values were used for cases and controls independently (as the cases and controls were genotyped independently in both populations), and the latter was also used for the combined set of cases and controls. Further, SNPs with call rates of <97% were excluded. Subjects with a genotyping rate of <97% and subjects who were closely related to each other ($\pi_{\text{hat}} > 0.15$) were removed, as were those with cryptic relatedness and those considered to be heterozygosity outliers. In addition, population outliers were excluded by manual selection from

a multidimensional scaling plot of the genome-wide identity-by-state (IBS) pairwise distance matrix in PLINK.

Before imputation, 452,154 SNPs for 3,772 individuals (1,208 cases and 2,564 controls) were in the German data set, and 494,760 SNPs for 3,134 individuals (1,118 cases and 2,016 controls) were in the Dutch data set.

Imputation. Imputation of the German and Dutch discovery samples was performed using IMPUTE2 (v2.1.0 for the German samples and v2.1.2 for the Dutch samples)⁴¹. For the phased haploid reference panel, we used HapMap 3 release 2 February 2009) samples ($n = 1,011$)⁴² as provided by the IMPUTE2 website (see URLs). We followed the recommended parameters for imputation, with the exception that we used different numbers of copying states ($\kappa = 60$ for the German and 80 for the Dutch samples) and a larger buffer size for the Dutch samples (500 kb instead of 250 kb). After imputation, we used individual call posterior probability of >0.9 and info measure I(A) of >0.6 as cutoffs to ensure high imputation data quality. From 1,411,821 SNPs after imputation, 165,433 SNPs were excluded on the basis of quality control analysis.

Statistical analysis. For the GWAS data from the two initial study samples, we analyzed the imputed allele dosage data with SNPTEST software (version 2.2.0; see URLs) to generate population-specific summary statistics. We used the presence of migraine as a binary phenotype and assumed an additive model. In accordance with our previous clinic-based migraine with aura GWAS⁵, association analysis was not corrected for age or gender. The primary reason for not using age as a covariate was that age information was not available for some of the control cohorts. However, the majority of the individuals in the cohorts were of working age, similar to our case samples. The missing data score likelihood option was used to handle missing data. For the replication studies, genotyped markers were analyzed using the same model as was used for the discovery samples for the population-specific results.

A fixed-effect meta-analysis of the summary statistics was conducted using GWAMA⁴³ (see URLs), first on the two discovery samples for the primary results. In the discovery sample meta-analysis, only SNPs that were present in both data sets were retained and filtered for having heterogeneity measure I^2 of <0.5. This moderately high threshold for I^2 was chosen to reflect the expectation of some differences in association signals of common markers due to varying LD structure. After replication, all six study sets (two discovery and four replication samples) were included in the overall meta-analysis. Reasonable genomic inflation was observed ($\lambda = 1.095$, $\lambda_{1000} = 1.031$). Consistency of allelic effects across studies was examined using the Cochran's Q ⁴⁴ and I^2 (ref. 45) metrics. Between-study (effect) heterogeneity was indicated by Q -statistic P values ($P \leq 0.1$) and moderate (25–50%) or larger I^2 values⁴⁶. Meta-analysis of SNPs associated with $P \leq 1 \times 10^{-5}$ and showing evidence of effect heterogeneity was also performed using a random-effects model⁴⁷. Manhattan and quantile-quantile plots were generated from the resulting data of 1,246,388 SNPs (**Supplementary Fig. 2**).

In gender effects analysis, we analyzed the effect of including gender information in the association analysis for the directly genotyped SNPs at each of the newly identified loci. We analyzed the SNPs in PLINK⁴⁸ using a logistic regression model assuming additive effects and with covariate adjustment for population identity and compared the output with results from male- and female-only analyses. In addition, we compared the results to those from a regression analysis where an additional interaction component between gender and genotype was included in the model.

eQTL analysis. In the eQTL analysis, we assessed publicly available data from two published eQTL studies^{7,8}. In these data sets, as described in the original publications, association between the genotypes of the most interesting SNPs and gene expression were analyzed using Spearman rank correlation for all genes within a 2-Mb window surrounding the SNP of interest. Significance was assessed by comparing the observed P value at a 0.001 threshold with the minimum P values from each of the 10,000 permutations of the expression values relative to genotypes^{7,8,49}. In an additional approach to identify eQTLs, we explored the US National Institutes of Health (NIH) Genotype-Tissue

Expression (GTEx) database. GTEx data did not show any evidence of association between genotypes and gene expression (data not shown).

39. Frazer, K.A. *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* **449**, 851–861 (2007).
40. Teo, Y.Y. *et al.* A genotype calling algorithm for the Illumina BeadArray platform. *Bioinformatics* **23**, 2741–2746 (2007).
41. Howie, B.N., Donnelly, P. & Marchini, J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet.* **5**, e1000529 (2009).
42. Altshuler, D.M. *et al.* Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* **467**, 52–58 (2010).
43. Mägi, R. & Morris, A.P. GWAMA: software for genome-wide association meta-analysis. *BMC Bioinformatics* **11**, 288 (2010).
44. Cochran, W.G. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics* **10**, 101–129 (1954).
45. Higgins, J.P. & Thompson, S.G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* **21**, 1539–1558 (2002).
46. Ioannidis, J.P., Patsopoulos, N.A. & Evangelou, E. Heterogeneity in meta-analyses of genome-wide association investigations. *PLoS ONE* **2**, e841 (2007).
47. DerSimonian, R. & Laird, N. Meta-analysis in clinical trials. *Control. Clin. Trials* **7**, 177–188 (1986).
48. Purcell, S. *et al.* PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am. J. Hum. Genet.* **81**, 559–575 (2007).
49. Stranger, B.E. *et al.* Population genomics of human gene expression. *Nat. Genet.* **39**, 1217–1224 (2007).

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Genome-wide association analysis identifies six susceptibility loci for migraine without aura

Tobias Freilinger, Verneri Anttila, Boukje de Vries, Rainer Malik, Mikko Kallela, Gisela M Terwindt, Patricia Pozo-Rosich, Bendik Winsvold, Dale R Nyholt, Willebrordus P J van Oosterhout, Ville Artto, Unda Todt, Eija Hämäläinen, Jessica Fernandez-Morales, Mark A Louter, Mari A Kaunisto, Jean Schoenen, Olli Raitakari, Terho Lehtimäki, Marta Vila-Pueyo, Hartmut Göbel, Erich Wichmann, Cèlia Sintas, Andre G Uitterlinden, Albert Hofman, Fernando Rivadeneira, Axel Heinze, Erling Tronvik, Cornelia M. van Duijn, Jaakko Kaprio, Bru Cormand, Maija Wessman, Rune R Frants, Thomas Meitinger, Bertram Müller-Myhsok, John-Anker Zwart, Markus Färkkilä, Alfons Macaya, Michel D Ferrari, Christian Kubisch, Aarno Palotie, Martin Dichgans, Arn M J M van den Maagdenberg for the International Headache Genetics Consortium

Supplementary Note: Clinical subject ascertainment and control samples

Overall study design

The discovery stage of the study was based on an analysis of *de novo* genotyping in two large MO sample sets from headache clinics in Germany (Munich/Kiel) and the Netherlands (Leiden) (**Supplementary Fig. 1**). Population-matched controls were recruited from studies with existing genotyping data (for details on study cohorts and controls, cf. below). For both sample sets, raw data were imputed to approximately 1.4M SNPs using HapMap3 release 2¹ as reference panel. As an initial step, genome-wide logistic regression analysis was performed independently in both samples, followed by meta-analysis of the two datasets. Subsequently, the top SNPs of the meta-analysis were tested for replication in four smaller clinic-based MO samples from Finland (Helsinki), Spain (Barcelona), Norway (Trondheim) and the Netherlands (Leiden) (**Fig. 1** and **Supplementary Fig. 1**).

Ethical aspects

Written informed consent was obtained from all participants, and the study was approved by the respective local research ethics committees of the Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-University in Munich (Germany), the University of Leiden Medical Centre (The Netherlands), the Helsinki University Central Hospital (Finland), the Vall d'Hebron Research Institute in Barcelona (Spain), and the Regional Committee for Medical and Health Research Ethics in Trondheim (Norway).

Discovery study

The German sample of 1,229 MO cases was recruited in Munich and Kiel and data were examined by a headache specialist at the Klinikum Großhadern of the Ludwig-Maximilians-University, Munich, and the Kiel Pain and Headache Center, Kiel. Phenotyping was based on a German translation of the FMSQ_{FS}². Particular emphasis was put on reliable exclusion of aura symptoms. In case of insufficient or conflicting information, an additional telephone interview was performed. Information was obtained on all aspects of the ICHD-II³ criteria as well as on other aspects (such as age at onset, prodromal symptoms, triggers, acute and prophylactic medication, family history, general past medical history, co-morbidity and place of birth). Of the German MO sample set, 837 cases were part of the replication phase of the IHGC MA study⁴, and analysed *only* for SNP rs1835740 (*MTDH*) in that study.

The Dutch sample contains 1,235 Dutch MO patients that were available from the clinic-based Leiden University Migraine Neuro Analysis (LUMINA) study. Self-reported migraineurs were recruited via the project's website. A set of screening questions validated previously in a population-based study⁵ was used. Participants fulfilling the screening criteria then completed an extended questionnaire that focuses on signs and symptoms of migraine headache and aura as outlined in ICHD-II³. Individual diagnoses were made using an algorithm based on these criteria and that was validated by a semi-structured telephone interview performed by experienced study physicians or by well-trained medical students⁶. A subset of the patients was asked to participate upon visiting the outpatient clinic.

Control samples

Population-matched controls were obtained from pre-existing previously genotyped studies. German controls were available from the KORA S4/F4 (n = 840) as well as from the GSK (n

= 490), the MIPSYKL (n = 861) and the HNR (n = 380) studies. Control samples (n = 2,040) for the Dutch sample were obtained from the Rotterdam Study (RSII)⁷.

Replication studies

The replication phase of the study consisted of four separately recruited clinic-based migraine without aura patient samples from Finland, Spain, the Netherlands, and Norway.

The Finnish replication sample consisted of 871 migraine without aura cases and 1,024 controls. Each migraine patient belongs to a multigenerational Finnish family with at least three affected family members. Patients were examined by a neurologist, and fulfilled the validated Finnish Migraine Specific Questionnaire for Family studies (FMSQ_{FS})². When necessary a follow-up telephone interview was performed. All patients were diagnosed by the same headache specialist (M. Kallela) according to the current International Headache Society diagnostic criteria (ICHD-II)³. The 1,024 control samples were obtained from the Young Finns study.⁸

The Spanish replication sample was recruited between 2002 and 2010 from Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH) Barcelona, and consisted of 837 unrelated migraineurs and 971 unrelated migraine-free controls matched for ethnicity (Caucasian Spanish) and sex frequency (75% women). All patients were diagnosed by clinical neurologists in the HUVH team as having MO based on the International Criteria for Headache Disorders 2nd edition (ICHD-II)³ after administration of a structured questionnaire and direct interview and examination. The control samples were recruited between 2006 and 2010 and consisted of Caucasian Spanish unrelated adults subjects (blood donors, individuals that underwent surgery unrelated to migraine or unaffected partners of migraine patients) that were matched for sex with patients and recruited in the same geographical area. Migraine and positive

family history of migraine or any type of severe or recurrent headache in first-degree relatives were excluded in control subjects through personal interview. All the adult participants, and the children or their parents gave their informed consent prior to participate in the study, according to the Helsinki Declaration.

The Dutch replication cohort included 555 MO cases that were recently recruited via the clinic-based Leiden University Migraine Neuro Analysis (LUMINA) study. The diagnosis and classification followed the same procedure as in the initial Dutch sample. Control samples (n = 456) came from volunteers that donated blood to the Leiden blood bank.

The Norwegian replication sample consisted of 245 MO subjects that were consecutively recruited from the outpatient clinic of the Norwegian Headache Center and diagnosed by a neurologist according to the ICHD-II criteria³. Control samples (201 subjects) were recruited from blood-donors in collaboration with the Department of Immunology and Transfusion Medicine in Trondheim Norway. No direct interview was made, but participants filled out a questionnaire to determine eligibility for participation. Criteria for inclusion were age > 40 years (since status as "non-migraineur" cannot be determined with relative certainty before this age), no present or former history of migraine or other types of chronic headaches, and on average less than one headache day per month. Subjects had to be of Caucasian origin.

Discovery stage genotyping

Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples according to standard protocols. Genotyping of the German GWAS sample was performed at Genome Analysis Center, Helmholtz Zentrum München, Germany using the Illumina Human 610-Quad v1 (n = 838) or Illumina Human 660W-Quad v1 SNP microarrays according to the Infinium II protocol from the manufacturer (Illumina Inc., San Diego, CA, USA) (n = 391). Genotype calling was

performed using the Illumina Gencall data analyses software. Genotyping of the complete Dutch GWAS sample was performed at the Wellcome Trust Sanger Institute using the Illumina 660W technology. Genotype calling was performed using the Illuminus software.

Replication stage genotyping

For the replication study, all cases and controls were genotyped at the Wellcome Trust Sanger Institute using matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry (MS), using the Sequenom MassARRAYTM methodology (Sequenom Inc, San Diego, CA, USA). Amplification reactions and parameters were based on the manufacturer's instructions. Each 384-wells plate contained positive (CEPH DNA) and negative controls, to check for assay performance and contaminations, respectively. Spectrocaller software supplied by the manufacturer was used to automatically call the genotypes. Clusters were checked manually and all doubtful calls were evaluated.

Quality control

To ensure high data quality, the datasets from the primary study were subjected to per-SNP and per-sample quality control (QC) before and after imputation. In both cases, cut-offs of 1% for minor allele frequency and 1×10^{-6} for HWE were used for cases and controls independently (as the cases and controls were genotyped independently in both populations), and the latter again for the combined set of cases and controls. Further, SNPs with call rates < 97% were excluded. Subjects with a genotyping rate <97% and subjects which were closely related to each other ($\pi_{\text{hat}} > 0.15$) were removed, as were those with cryptic relatedness and those deemed to be heterozygosity outliers. In addition, population outliers were excluded using a manual selection from a multidimensional scaling plot of the genome-wide IBS pairwise distance matrix in PLINK.

Before imputation, 452,154 SNPs for 3,772 individuals (1,208 cases and 2,564 controls) were in the German dataset, and 494,760 SNPs for 3,134 individuals (1,118 cases and 2,016 controls) were in the Dutch dataset.

Imputation

Imputation of the German and Dutch discovery samples was performed using IMPUTE 2 (v2.1.0 for the German samples, v2.1.2 for the Dutch samples)⁹. For the phased haploid reference panel, we used HapMap3 release 2 data for the 120 non-related CEU trios¹⁰. We used the recommended parameters for the imputation, with the exception of a different number of copying states ($\kappa=60$ for Germans, $\kappa=80$ for Dutch) and a larger buffer size for the Dutch (500 kb instead of 250 kb). After imputation, we used individual call posterior probability > 0.9 and info measure $I(A) > 0.6$ as cut-offs to ensure high imputation data quality. From 1,411,821 SNPs after imputation, 165,433 SNPs were dropped due to QC reasons.

Statistical analysis

For the GWA data from the two initial study samples, we analyzed the imputed allele dosage data with the SNPTEST software (version 2.2.0; see Web Resources) to generate population-specific summary statistics. We used the presence of migraine as a binary phenotype, and assumed an additive model. The missing data score likelihood option was used for handling missing data. For the replication studies, genotyped markers were analyzed using the same model as the discovery samples for the population-specific results.

A fixed-effect meta-analysis of the summary statistics was conducted using GWAMA¹¹ (see Web Resources) first on the two discovery samples for the primary results. In the discovery sample meta-analysis, only SNPs that were present in both datasets were

retained and filtered for the heterogeneity measure $I^2 < 0.5$. This moderately high threshold for I^2 was chosen to reflect the expectation of some differences in association signals of common markers due to varying LD structure. After replication, all six study sets (two discovery and four replication samples) were included in the overall meta-analysis. Reasonable genomic inflation was observed ($\lambda = 1.095$, $\lambda_{1000} = 1.031$). Consistency of allelic effects across studies was examined utilising the Cochran's Q^{12} and I^2 metrics¹³. Between-study (effect) heterogeneity was indicated by Q-statistic p-values ($P \leq 0.1$) and moderate (25-50%) or larger I^2 values¹⁴. Meta-analysis of SNPs associated with $P \leq 1 \times 10^{-5}$ and showing evidence of effect heterogeneity were also analysed using a random-effects model¹⁵. Manhattan and quantile-quantile plots were generated from the resulting data of 1,246,388 SNPs (**Supplementary Fig. 2**).

Web resources

GWAMA - www.well.ox.ac.uk/gwama

NCBI36 - www.ncbi.nlm.nih.gov

Hapmap3 data - www.hapmap.org

Impute 2 - http://mathgen.stats.ox.ac.uk/impute/impute_v2.html

SNPTEST - <http://www.stats.ox.ac.uk/~marchini/software/gwas/snptest.html>

Locuszoom - <http://csg.sph.umich.edu/locuszoom/>

References

1. Frazer, K.A. *et al.* A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. *Nature* **449**, 851-861 (2007).

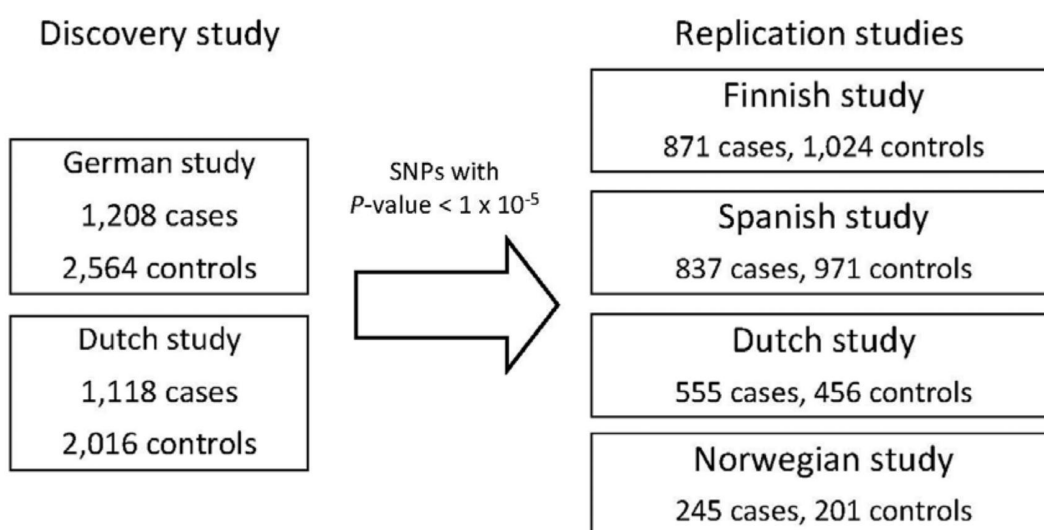
2. Kallela, M., Wessman, M. & Farkkila, M. Validation of a migraine-specific questionnaire for use in family studies. *Eur. J. Neurol.* **8**, 61-66 (2001).
3. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* **24 Suppl 1**, 9-160 (2004).
4. Anttila, V. *et al.* Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat. Genet.* **42**, 869-873 (2010).
5. Launer, L.J., Terwindt, G.M. & Ferrari, M.D. The prevalence and characteristics of migraine in a population-based cohort: the GEM study. *Neurology* **53**, 537-542 (1999).
6. Van Oosterhout, W.P.J. *et al.* Validation of the web-based LUMINA questionnaire for recruiting large cohorts of migraineurs. *Cephalalgia*, **31**, 1359-1367 (2011).
7. Hofman, A. *et al.* The Rotterdam Study: 2010 objectives and design update. *Eur. J. Epidemiol.* **24**, 553-572 (2009).
8. Raitakari, O.T. *et al.* Cardiovascular risk factors in childhood and carotid artery intima-media thickness in adulthood: the Cardiovascular Risk in Young Finns Study. *JAMA* **290**, 2277-2283 (2003).
9. Howie, B.N., Donnelly, P. & Marchini, J. A flexible and accurate genotype imputation method for the next generation of genome-wide association studies. *PLoS Genet.* **5**, e1000529 (2009).
10. Altshuler, D.M. *et al.* Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* **467**, 52-58 (2010).
11. Magi, R. & Morris, A.P. GWAMA: software for genome-wide association meta-analysis. *BMC bioinformatics* **11**, 288 (2010).
12. Cochran, W.G. The combination of estimates from different experiments. *Biometrics* **10**, 101-129 (1954).

13. Higgins, J.P. & Thompson, S.G. Quantifying heterogeneity in a meta-analysis. *Stat. Med.* **21**, 1539-1558 (2002)
14. Ioannidis, J.P., Patsopoulos, N.A. & Evangelou, E. Heterogeneity in meta-analyses of genome-wide association investigations. *PLoS One* **2**, e841 (2007)
15. DerSimonian, R. & Laird, N. Meta-analysis in clinical trials. *Control Clin. Trials* **7**, 177-188 (1986)

Supplementary Figures and Tables

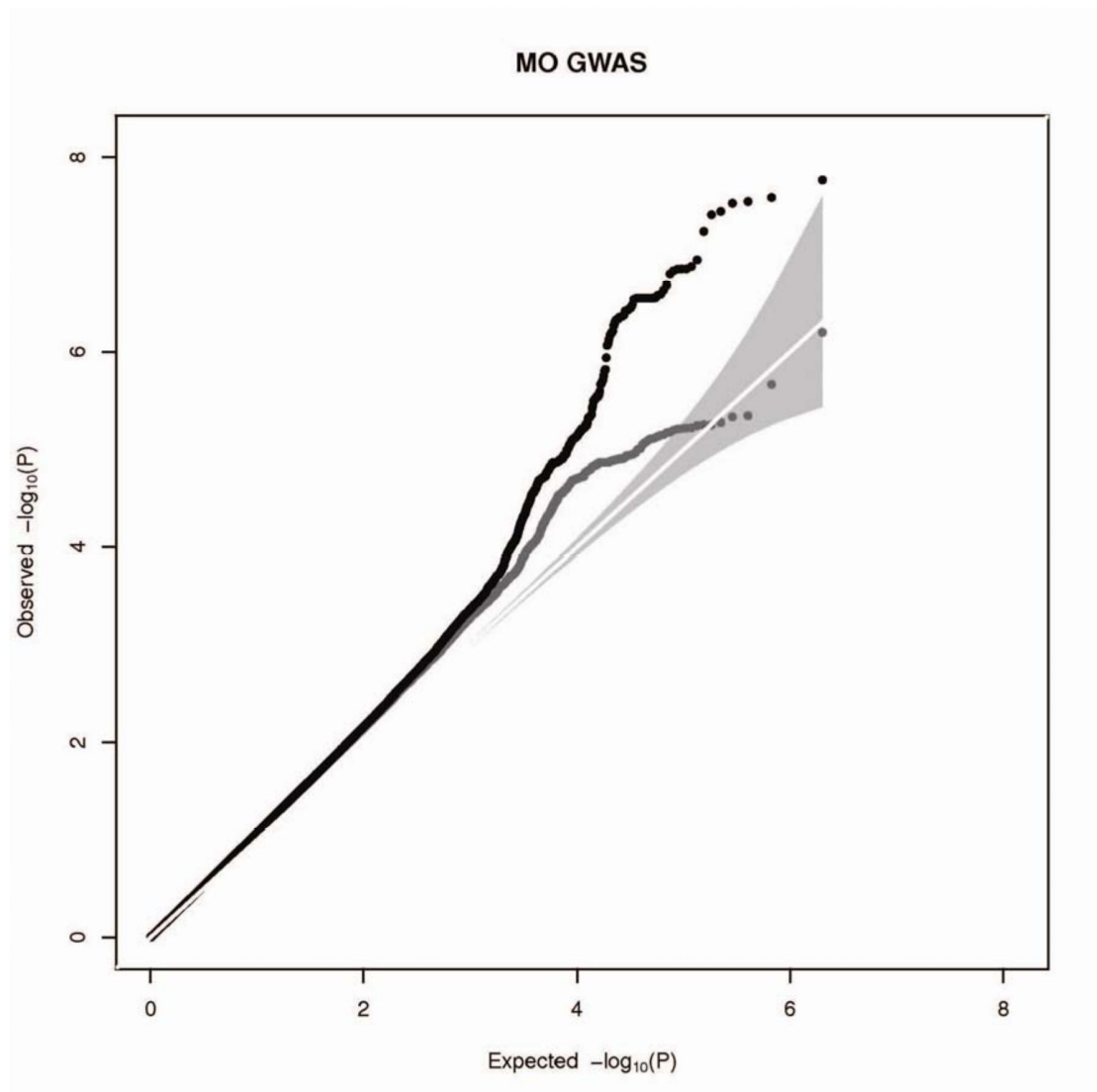
Supplementary Figure 1. Study design

In the discovery phase of the study, migraine without aura (MO) patients from two clinic-based collections were analyzed in a joint genome-wide association analysis. The most significant association signals ($P < 1.0 \times 10^{-5}$) were followed up in independent clinic-based samples from Finland, Spain, the Netherlands, and Norway.



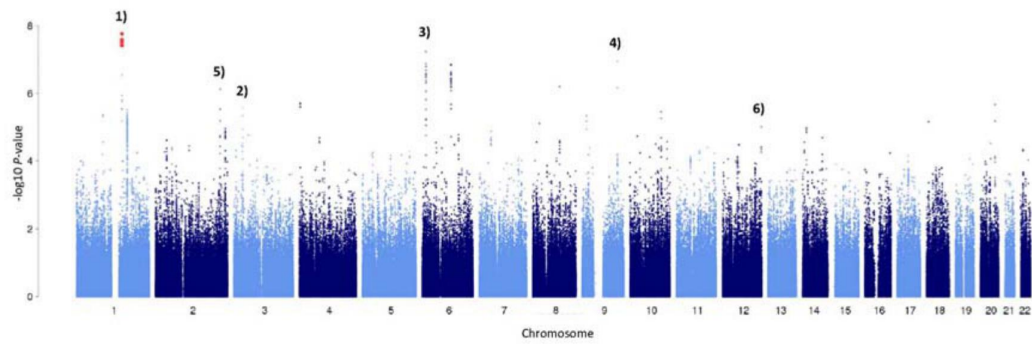
Supplementary Figure 2. Quantile-quantile plot of the meta-analysis

Quantile-Quantile (Q-Q) plot of P -values from the study. The analysis shows the expected (X-axis) and observed (Y-axis) distribution of $-\log_{10} P$ -values of the joint analysis of the two discovery cohorts (in black). The grey line shows the same distribution, but with SNPs at the loci taken to replication excluded. The genomic inflation factor (λ_{1000}) was 1.03.



Supplementary Figure 3. Manhattan plot

Genome-wide association plot showing $-\log_{10} P$ -values per chromosome of the analysis of the discovery sample. SNPs indicated in red are below the threshold for genome-wide significance ($P < 5 \times 10^{-8}$). The six MO loci are indicated in the graph with numbers: 1) 1q22, 2) 3p24, 3) 6p24, 4) 9q33, 5) 2q37, 6) 12q13.



Supplementary Table 1. Replication results for loci containing at least two SNPs with P -values $< 10^{-5}$ and SNPs from previously reportedmigraine loci (*MTDH*, *TRPM8*, *LRP1* and *PRDM16*)^{5,6}

Chr	SNP	General SNP information			Discovery samples			Replication samples P -values				All replications			Overall meta-analysis				
		Position ^a	Minor allele (minor allele frequency)	Gene ^b	P -Value	OR (95% CI)	I^2	Spain (n=846)	Finland (n=868)	Norway (n=249)	Netherlands (n=555)	P -value	OR (95% CI)	I^2	P -value	OR (95% CI)	I^2	Q-stat. P -value	REM P -value
1	rs10733092	91,399,137	G (0.27)	<i>HFM1</i>	4.38×10^{-6}	1.21 [1.11-1.31]	0.23	0.48	0.75	-	0.02	0.12	0.94 [0.87-1.02]	0.42	0.032	1.06 [1.01-1.13]	0.83	9.55E-05	0.52
1	rs1050316	154,701,327	G (0.34)	<i>MEF2D</i>	2.59×10^{-8}	1.24 [1.15-1.33]	0.00	0.04	0.047	0.18	0.34	1.15×10^{-3}	1.14 [1.06-1.24]	0.00	3.21×10^{-10}	1.19 [1.13-1.26]	0.00	0.79	3.18×10^{-10}
1	rs3790455	154,722,925	C (0.34)	<i>MEF2D</i>	1.71×10^{-8}	1.24 [1.15-1.34]	0.00	0.06	0.04	0.17	0.09	4.83×10^{-4}	1.16 [1.07-1.26]	0.00	7.06×10^{-11}	1.20 [1.14-1.27]	0.00	0.89	2.88×10^{-10}
1	rs17350991	172,350,091	T (0.26)	<i>RABGAP1L</i>	3.17×10^{-6}	0.83 [0.76-0.90]	0.00	0.32	0.11	-	0.48	0.92	1.00 [0.92-1.08]	0.50	8.03×10^{-4}	0.91 [0.86-0.96]	0.73	0.01	0.14
2	rs6756590	216,916,816	T (0.44)	<i>MARCH4</i>	7.52×10^{-7}	0.84 [0.78-0.90]	0.00	0.30	0.10	0.24	1.13×10^{-4}	0.08	0.93 [0.86-1.01]	0.82	1.21×10^{-6}	0.88 [0.83-0.93]	0.76	4.57E-03	0.19
3	rs7640543	30,437,407	A (0.32)	<i>TGFBR2</i>	2.72×10^{-6}	1.20 [1.11-1.30]	0.00	0.46	4.01×10^{-3}	3.33×10^{-3}	0.05	1.02×10^{-04}	1.18 [1.09-1.29]	0.51	1.17×10^{-09}	1.19 [1.13-1.26]	0.19	0.29	5.34×10^{-06}
4	rs12641989	3,389,638	A (0.10)	<i>RGS12</i>	2.03×10^{-6}	1.33 [1.18-1.50]	0.36	0.97	0.73	-	0.29	0.39	0.94 [0.83-1.08]	0.00	3.10×10^{-3}	1.14 [1.05-1.25]	0.76	2.28E-03	0.25
6	rs9381462	12,981,761	G (0.48)	<i>PHACTRI</i>	3.06×10^{-5}	0.84 [0.78-0.91]	0.00	0.12	0.69	0.09	0.06	0.04	1.09 [1.00-1.18]	0.39	1.44×10^{-5}	1.14 [1.08-1.20]	0.35	0.17	1.84×10^{-3}
6	rs1332847	13,000,740	T (0.29)	<i>PHACTRI</i>	5.95×10^{-6}	1.20 [1.11-1.30]	0.00	0.04	0.81	0.65	0.98	0.12	1.07 [0.98-1.16]	0.00	1.25×10^{-5}	1.14 [1.07-1.21]	0.15	0.32	3.95×10^{-5}
6	rs9349579	13,011,943	G (0.38)	<i>PHACTRI</i>	2.06×10^{-7}	0.82 [0.77-0.89]	0.00	0.01	0.67	0.33	0.31	0.01	0.90 [0.83-0.98]	0.00	3.15×10^{-8}	0.86 [0.81-0.91]	0.10	0.36	2.23×10^{-6}
6	rs2327021	13,030,675	G (0.36)	<i>PHACTRI</i>	5.79×10^{-8}	1.23 [1.14-1.32]	0.00	0.02	0.46	-	0.99	0.07	1.07 [1.00-1.16]	0.21	2.62×10^{-7}	1.15 [1.09-1.21]	0.55	0.07	9.31×10^{-4}
6	rs7739181	13,042,673	A (0.35)	<i>PHACTRI</i>	1.33×10^{-7}	1.22 [1.14-1.32]	0.00	0.05	0.48	0.75	0.76	0.06	1.08 [1.00-1.17]	0.00	2.50×10^{-7}	1.16 [1.09-1.22]	0.16	0.31	8.60×10^{-8}
6	rs2499797	96,955,390	G (0.18)	<i>FHL5</i>	1.41×10^{-7}	1.29 [1.17-1.41]	0.00	0.29	0.98	0.92	0.01	0.06	1.11 [0.99-1.23]	0.30	2.25×10^{-7}	1.20 [1.12-1.29]	0.43	0.12	4.78×10^{-3}
6	rs11757063	96,991,607	A (0.21)	<i>FHL5</i>	2.32×10^{-7}	1.26 [1.16-1.38]	0.00	0.03	0.79	0.61	0.03	0.02	1.13 [1.02-1.25]	0.24	5.68×10^{-8}	1.20 [1.12-1.28]	0.26	0.24	5.31×10^{-4}
8	rs11777116	24,100,246	T (0.08)	<i>ADAM28</i>	7.83×10^{-6}	1.35 [1.19-1.55]	0.47	0.50	0.19	-	0.47	0.43	1.06 [0.92-1.23]	0.03	1.26×10^{-4}	1.21 [1.10-1.34]	0.59	0.04	0.04
9	rs6478241	118,292,450	A (0.38)	<i>ASTN2</i>	1.14×10^{-7}	1.22 [1.13-1.31]	0.00	0.15	2.82×10^{-3}	0.57	0.28	0.02	1.10 [1.02-1.19]	0.57	3.86×10^{-8}	1.16 [1.10-1.23]	0.56	0.04	8.78×10^{-10}
10	rs1712517	105,023,005	T (0.48)	<i>INA</i>	3.59×10^{-6}	1.18 [1.10-1.27]	0.00	0.60	0.83	0.07	0.07	0.13	0.94 [0.87-1.02]	0.34	8.82×10^{-6}	1.13 [1.07-1.17]	0.46	0.10	0.01
12	rs6598163	130,891,192	G (0.48)	<i>MMP17</i>	9.97×10^{-6}	1.19 [1.10-1.28]	0.00	0.50	2.05×10^{-3}	0.19	0.91	7.00×10^{-3}	0.90 [0.83-0.97]	0.32	4.67×10^{-7}	1.15 [1.09-1.21]	0.14	0.32	1.62×10^{-7}
1	rs2651899	3073572	C (0.45)	<i>PRDM16</i>	3.15×10^{-3}	1.11 [1.04-1.19]	0.00	0.73	0.03	0.11	0.93	0.046	1.08 [1.00-1.17]	0.10	4.18×10^{-4}	1.10 [1.04-1.16]	0.00	0.56	2.46×10^{-4}
2	rs10166942	234,489,832	C (0.18)	<i>TRPM8</i>	1.32×10^{-3}	0.82 [0.74-0.89]	0.00	1.08×10^{-5}	3.76×10^{-3}	0.21	0.02	5.62×10^{-3}	0.74 [0.67-0.82]	0.00	9.83×10^{-13}	0.78 [0.73-0.84]	0.00	0.61	1.73×10^{-11}
2	rs17862920	234,492,734	T (0.10)	<i>TRPM8</i>	2.19×10^{-3}	0.78 [0.69-0.87]	0.00	1.46×10^{-3}	0.22	0.30	0.04	6.44×10^{-3}	0.75 [0.66-0.84]	0.00	5.97×10^{-9}	0.77 [0.70-0.84]	0.00	0.93	5.92×10^{-8}
8	rs1835740	98,236,089	T (0.22)	<i>MTDH</i>	0.70	1.02 [0.93-1.11]	0.00	0.09	0.12	0.18	4.79×10^{-3}	0.69	0.98 [0.90-1.08]	0.80	0.986	1.00 [0.94-1.07]	0.68	0.01	0.55
12	rs1172113	55,813,550	C (0.39)	<i>LRP1</i>	3.38×10^{-3}	0.86 [0.80-0.92]	0.00	2.50×10^{-3}	0.86	0.62	2.74×10^{-4}	2.33×10^{-4}	0.86 [0.79-0.93]	0.67	2.97×10^{-8}	0.86 [0.81-0.91]	0.45	0.10	1.06×10^{-4}

Genome-wide significant P -values and successful replications are shown in boldface. ^aChromosomal positions are based on NCBI build 36. ^bFor

intra-genic SNPs, the gene in which the SNP is located is listed, whereas for intergenic SNPs the nearest gene is listed. REM = random effects model.

Supplementary Table 2. *In silico* replication of the top SNPs of the MO GWAS in the previously published MA GWA study⁵

SNP	Chr	Position	Minor allele (minor allele frequency)	Gene ^a	P-value in current MO study (n=2,324/4,580) ^b	OR in MO	P-value in previous MA study (n=2,731/10,747) ^b	OR in MA
Locus 1:								
rs1050316	1	154,701,327	G (0.34)	<i>MEF2D</i>	2.59x10 ⁻⁸	1.24 [1.15-1.33]	0.02	1.09 [1.02-1.16]
rs2274316	1	154,712,866	C (0.35)	<i>MEF2D</i>	3.60x10 ⁻⁸	1.23 [1.14-1.33]	0.01	1.09 [1.02-1.17]
rs1925950	1	154,717,364	G (0.35)	<i>MEF2D</i>	2.97x10 ⁻⁸	1.24 [1.15-1.33]	0.02	1.09 [1.02-1.16]
rs3790455	1	154,722,925	C (0.34)	<i>MEF2D</i>	1.71x10 ⁻⁸	1.24 [1.15-1.34]	0.01	1.09 [1.02-1.16]
rs3790459	1	154,728,331	A (0.35)	<i>MEF2D</i>	2.85x10 ⁻⁸	1.24 [1.15-1.33]	0.01	1.09 [1.02-1.17]
rs12136856	1	154,739,738	C (0.34)	<i>MEF2D</i>	3.90x10 ⁻⁸	1.23 [1.15-1.33]	0.01	1.09 [1.02-1.17]
Locus 2:								
rs7640543	3	30,437,407	A (0.32)	<i>TGFBP2</i>	2.72x10 ⁻⁶	1.20 [1.11-1.30]	0.10	1.06 [0.90-1.14]
Locus 3:								
rs9349379	6	13,011,943	G (0.38)	<i>PHACTRI</i>	2.06x10 ⁻⁷	0.82 [0.77-0.89]	0.02	0.93 [0.87-0.99]
Locus 4:								
rs6478241	9	118,292,450	A (0.38)	<i>ASTN2</i>	1.14x10 ⁻⁷	1.22 [1.13-1.31]	2.65x10 ⁻⁴	1.13 [1.06-1.21]
Locus 5:								
rs10166942	2	234,489,832	C (0.18)	<i>TRPM8</i>	1.32x10 ⁻⁵	0.82 [0.74-0.89]	3.50x10 ⁻⁵	0.83 [0.77-0.91]
rs17862920	2	234,492,734	T (0.10)	<i>TRPM8</i>	2.19x10 ⁻⁵	0.78 [0.69-0.87]	3.70x10 ⁻⁵	0.79 [0.70-0.88]
Locus 6:								
rs11172113	12	55,813,550	C (0.39)	<i>LRP1</i>	3.38x10 ⁻⁵	0.86 [0.80-0.92]	5.00x10 ⁻⁵	0.87 [0.82-0.93]

ORs are reported for the minor allele. ^aFor intragenic SNPs, the gene in which the SNP is located is listed, whereas for intergenic SNPs the nearest gene is listed. ^bNumber of cases/number of controls.

Article 5

Rèplica de resultats previs d'estudis d'associació a gran escala en una mostra espanyola de migranya amb aura.

Resum

La migranya és una condició inhabilitant prevalent que afecta aproximadament el 15% de la població. La migranya amb aura (MA), un subtipus que afecta un terç dels pacients, es caracteritza per la presència de símptomes neurològics que apareixen just abans o en el moment de l'episodi migranyós. Diversos estudis d'associació a gran escala han intentat identificar variants de susceptibilitat implicades en migranya, tot senyalant diversos *loci* candidats per a aquest trastorn. Amb l'objectiu de replicar resultats previs d'estudis d'associació a gran escala, s'ha dut a terme un estudi d'associació cas-control amb dotze variants de tipus SNP en una mostra espanyola de 512 pacients MA i 535 controls. S'han detectat associacions nominals per als SNPs rs2651899 (gen *PRDM16*), rs10166942 (prop del gen *TRPM8*), rs12134493 (prop del gen *TSPAN2*) i rs1054861 (prop del gen *MMP16*). El nostre estudi mostra resultats nominals de replicació a la mostra espanyola de migranya amb aura per a quatre dels *loci* prèviament descrits en la migranya comuna. No obstant, caldria fer estudis amb mides mostrals més grans per tal de confirmar aquests resultats i donar-los més robustesa.

Referència

Sintas C, Fernández-Morales J, Vila-Pueyo M, Narberhaus B, Arenas C, Pozo-Rosich P, Macaya A, Cormand B. *Replication study of previous migraine genome-wide association study findings in a Spanish sample of migraine with aura*. Cephalalgia. 2014 Nov 11. pii: 0333102414557841.

Replication study of previous migraine genome-wide association study findings in a Spanish sample of migraine with aura

Cephalalgia

0(0) 1–7

© International Headache Society 2014

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0333102414557841

cep.sagepub.com



Cèlia Sintas^{1,2,3}, Jèssica Fernández-Morales^{4,5},
Marta Vila-Pueyo⁶, Bernat Narberhaus⁷, Concepció Arenas⁸,
Patricia Pozo-Rosich^{4,5}, Alfons Macaya⁶ and Bru Cormand^{1,2,3}

Abstract

Background: Migraine is a common disabling condition that affects approximately 15% of the population. Several genome-wide association studies have attempted to identify susceptibility variants involved in migraine, reporting several candidate loci for the disorder.

Methods: In order to replicate findings from previous genome-wide association studies, a case–control association study was performed. Twelve single nucleotide polymorphisms were genotyped in a Spanish sample of 512 migraine with aura patients and 535 migraine-free controls.

Results: Nominal associations were found for single nucleotide polymorphisms rs2651899 (within the *PRDM16* gene), rs10166942 (near *TRPM8*), rs12134493 (close to *TSPAN2*) and rs10504861 (near *MMP16*) in our migraine with aura sample.

Conclusions: Our study provides suggestive replication, in a Spanish migraine with aura sample, of four genome-wide association study findings previously reported in common migraine. However, larger sample sets should be explored to confirm our results.

Keywords

Migraine with aura, association study, *PRDM16*, *TRPM8*, *TSPAN2*, *MMP16*

Date received: 5 February 2014; revised: 7 June 2014; 22 September 2014; accepted: 4 October 2014

Introduction

Migraine is a disabling complex neurological disorder that manifests with episodic and recurrent attacks, affecting around 15% of the population. It is more prevalent in women than men (three to one female:male ratio) (1). Genetic factors are thought to play an important role in common migraine, although environmental influence is also relevant (2).

Two clinical forms of the disorder are distinguished (International Classification of Headache Disorders, ICHD): migraine with aura (MA) and migraine without aura (MO) (3). Both are characterized by the presence of recurrent headaches associated with photophobia, phonophobia, nausea and aggravation by physical activity and are differentiated by the presence of aura. Aura symptoms, which often precede and accompany the headache episode, develop gradually and are most commonly visual but can be sensory,

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain

³Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER)-Institute of Health Carlos III, Spain

⁴Headache and Neurological Pain Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

⁵Headache Unit, Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Spain

⁶Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

⁷Neurology Service, Hospital Sant Joan de Déu (Fundació Althaia), Spain

⁸Department of Statistics, University of Barcelona, Spain

Corresponding author:

Bru Cormand, Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona Av. Diagonal 643, Edifici Prevosti, 3^a planta 08028 Barcelona, Spain.

Email: bcormand@ub.edu

motor, or any combination of these, and can last from a few minutes to several days, although they typically abate in less than 60 minutes (4). MO is the most common migraine presentation, whereas MA is found in about one-third of migraine patients and is thought to have a stronger genetic load (4).

Association studies have been carried out to identify susceptibility variants underlying common migraine at two levels: analysis of candidate genes and genome-wide association studies (GWAS). Several GWAS have been performed so far, four of which reported significant results, disclosing a total of 20 associated variants (1,4–7).

The first risk variant identified, rs1835740, was revealed by a two-stage clinic-based study performed by the International Headache Genetics Consortium (IHGC) in individuals from Europe (5), the first stage consisting of a clinic-based MA sample. Although replication attempts have failed to find association in other populations (1,6,8), this variant is likely to be functional and is located close to the *MTDH* and *PGCP* genes, both related to glutamate homeostasis. Additionally, three new genome-wide significant loci were reported in a second GWAS, carried out by Chasman et al. (1) in a population-based study from the Women's Genome Health Study: *PRDM16*, *LRP1* and a variant located close to *TRPM8*, all of them identified when the discovery and the replication cohorts (the Dutch Genetic Epidemiology of Migraine study, the German Study of Health in Pomerania and the IHGC discovery stage cohort used in the first migraine GWAS) were combined.

In contrast, no genome-wide significant associations were found in a meta-analysis of population-based migraine GWAS performed by the Dutch-Icelandic Migraine Genetics Consortium and including six European cohorts (6).

More recently, the IHGC carried out a clinic-based GWAS focused on MO patients and reported 12 nominally significant signals in the discovery stage (p -value $< 10e-5$) (7), two of which, located in the *LRP1* gene and close to *TRPM8*, had already been reported in a previous GWAS (7).

Finally, a GWAS meta-analysis was performed on 29 clinic- and population-based studies including 23,285 migraine cases and 95,425 population-matched controls (4). Association with 12 variants within or close to the following genes were reported: *PRDM16*; *MEF2D*; *TRPM8*; *TGFBR2*; *PHACTR1*; *ASTN2*; *LRP1*; *FHL5*; *C7orf10*; *MMP16*; *TSPAN2*; *AJAP1*. The last five associations were reported in this study for the first time.

Here we performed a clinic-based case-control association study in 512 MA patients and 535 non-migraine individuals from Spain aiming at replicating significant

associations identified in those previous GWAS that included MA patients (1,4), although they also included MO individuals. The other three GWAS were not considered here because one of them did not render positive findings (6), another one included only MO patients (7) and the third one (5) was already subjected to replication by us in a previous report (8).

Materials and methods

Patients and controls

The original sample consisted of 517 Caucasian Spanish patients (78.13% women) and 535 ethnically matched migraine-free controls (73.83% women), recruited at Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) and Hospital Sant Joan de Déu (Manresa, Barcelona, Spain) between 2002 and 2010. All patients were unrelated and, to the best of our knowledge, unrelated to control individuals. They were diagnosed with MA according to the ICHD 2nd edition (3) and have not been included in any previous migraine GWAS. Detailed clinical characteristics of the sample are provided in Table 1. For a complementary genetic analysis, the clinical MA sample was divided in two subgroups, 'MA only' (patients developing aura in at least 2/3 of the migraine episodes, $n = 318$) and 'Both MA and MO' (patients with less than 2/3 of the crises with aura, $n = 180$), similar to one of the two previous reports that we aim to replicate (4) and also performed in the first migraine GWAS (5). This distinction was introduced to distinguish the group of patients with

Table 1. Clinical findings in 517 patients with migraine with aura included in this study.

Feature	% of MA patients ^a
Positive family history of migraine ^b	77.2%
Age of onset (years)	13.5 (± 12) ^c
<i>Main features</i>	
Pulsating quality of pain	69.9%
Unilateral pain	73.4%
Moderate-severe pain intensity	94.3%
Aggravation by physical activity	93.9%
<i>Other features</i>	
Photophobia	92.3%
Phonophobia	87.1%
Nausea	85.9%
Vomiting	61.8%

MA: migraine with aura.

^aThe percentage of available answers per item ranged from 88.3 to 99.2%.

^bIn first degree relatives.

^cMean \pm SD.

rare MA episodes, but still fulfilling ICHD criteria, from those suffering an aura in most of their attacks. The control sample consisted of unrelated blood donors who lacked any personal or family history of any type of severe recurrent headaches and were approximately sex-matched with the cases. The exclusion of the disease phenotype was based on a personal interview. Controls were collected from the same small geographical area in Barcelona (Spain) as cases, and both were Spanish and Caucasian, as were their parents and grandparents. The study was approved by the local Ethics Committees and informed consent was obtained from all the participants or their legal representatives according to the Helsinki Declaration.

DNA isolation, SNP selection and genotyping

DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by a standard salting-out procedure (9).

Given that our clinic-based sample included only MA patients, we chose for replication those SNPs that displayed a genome-wide significant association in previous GWA studies including MA samples (1,4) (Table 2). A total of 13 SNPs were selected for genotyping: rs2651899 (*PRDM16*); rs10915437 (between *PRDM16* and *AJAPI*); rs10166942 and rs7577262 (near *TRPM8*), rs11172113 (*LRPI*); rs12134493 (near *TSPAN2*); rs2274316 (*MEF2D*); rs6790925 (near *TGFBR2*); rs9349379 (*PHACTR1*); rs13208321 (near *FHL5*); rs4379368 (*C7orf10*); rs10504861 (near *MMP16*); rs6478241 (*ASTN2*). All of them had previously been found to be associated with migraine groups, with and without aura, except for SNP rs10504861, which was only found associated with the MO group but also included in our study (4).

Genotyping of all SNPs was performed using the Sequenom technology at the National Genotyping Center (Cegen, Santiago de Compostela, Spain). Three samples from the Centre d'Étude du Polymorphisme Humain (CEPH) were included in every plate and a 100% concordance with HapMap data was observed when available. One SNP, rs2274316 in *MEF2D*, failed and it was not considered in the association study. Five patients displayed less than 85% genotyping rate and were removed from the study, so the analysis was finally carried out on 512 patients.

Statistical analysis

The analysis of minimal statistical power for the χ^2 test, performed under a dominant model using the Genetic Power Calculator software (pnu.gmh.harvard.edu/~purcell/gpc) with $\alpha=0.05$, an odds ratio (OR) of 1.25, a prevalence of 0.15 for the disorder and the highest minor allele frequency (MAF) found in controls (0.455), rendered a value of 47% in the overall sample.

Statistical analysis for the association study was carried out using the SNPAssoc R library (10). Hardy–Weinberg equilibrium (HWE) was tested in our control sample, and P -values were all over 0.05, except for rs10915437 ($P=0.0470$), which was not further considered in our analysis. We compared allele and genotype frequencies using χ^2 tests and considering co-dominant, dominant, recessive, overdominant and log-additive models. For the log-additive model the Mantel–Haenszel χ^2 test was implemented. All the results were adjusted by sex using a likelihood ratio test. Corrections for multiple testing were applied using 10,000 permutations with PLINK (11) and Bonferroni's correction. For the latter, the threshold for significance was established as $0.0003=0.05/(11 \times 3 \times 5)$, with 11 SNP tests, three clinical groups and five genetic models.

Association between case–control status and the different genetic variants was also estimated using logistic regression and including sex as a predictive variable ($\text{logit} = \beta_0 + \beta_1 * \text{SNP} + \beta_2 * \text{sex}$). Analyses assuming additive, dominant, recessive and co-dominant models for each SNP were performed separately and then compared using Akaike Information Criterion (AIC). All the analyses were performed with the R software (<http://CRAN.R-project.org>).

Results

We successfully genotyped 12 SNP markers selected from two previous GWA studies (1,4) in 512 MA patients and 535 gender and ethnically matched controls from Spain. One of them was not considered in our analysis as it was not in HWE. Our study included both allele and genotype comparisons (Table 3).

We achieved nominal associations for two out of three genome-wide significant findings from the study by Chasman et al. (1): rs2651899 in the *PRDM16* gene (allelic model, $P=0.0056$) and rs10166942, located near *TRPM8* (recessive, $P=0.0442$) (Table 3). However, none of the SNPs survived Bonferroni's correction for multiple testing (all P -values > 0.0003) or permutation corrections (all permuted P -values > 0.05 , data not shown). The evaluation of the remaining nine SNPs, selected from the meta-analysis study performed by Anttila et al. (4), failed to replicate any of the associations in our MA sample.

We subsequently split the sample into the subclinical groups 'MA only' and 'Both MA and MO' to gain clinical homogeneity at the expense of reducing the size of the sample, following the subdivision reported in Anttila et al. (4). Only one of the previous association signals remained significant (rs2651899, 'MA only', allelic model, $P=0.0034$) but novel nominal associations were obtained with 'Both MA and MO'

Table 2. Selected SNPs for replication of GWAS findings. Comparison of the direction of the effect for the nominally associated SNPs in our study.

Associated SNP	Selected study	Position ^a	Gene	Distance	Reference study			Replication study		
					Minor allele	OR	Associated migraine group	Minor allele	OR	Associated migraine group, model
rs12134493	Anttila et al. (4)	chr1:115677946	near <i>TSPAN2</i>	45, 825 bp downstream	A	1.14	All samples	A	1.52	MA + MO, dominant
rs2274316 ^b	Anttila et al. (4)	chr1:156446242	<i>MEF2D</i>	Intragenic	C	1.07	All samples			
rs2651899	Chasman et al. (1)/ Anttila et al. (4)	chr1:3083712	<i>PRDM16</i>	Intragenic	C / C	1.07–1.25/1.09	Migraine/ All samples	C	1.27 / 1.34	All samples / MA only, allelic
rs10915437 ^c	Anttila et al. (4)	chr1:4183006	near <i>AJAPI</i>	532,099 bp upstream	G	0.86	Clinics only (MA and MO)			
rs11172113	Chasman et al. (1)/ Anttila et al. (4)	chr12:57527283	<i>LRP1</i>	Intragenic	C / C	0.81–0.90/0.90	Migraine/ All samples ^d			
rs7577262	Anttila et al. (4)	chr2:234818869	near <i>TRPM8</i>	7,174 bp upstream	A	0.87	All samples ^{d,e}			
rs10166942	Chasman et al. (1)	chr2:234825093	near <i>TRPM8</i>	950 bp upstream	C	0.80–0.86	Migraine	C	0.48	All samples, recessive
rs6790925	Anttila et al. (4)	chr3:30480085	near <i>TGFBR2</i>	167,909 bp upstream	T	1.15	Clinics only (MA and MO)			
rs9349379	Anttila et al. (4)	chr6:12903957	<i>PHACTR1</i>	Intragenic	G	0.86	MO only ^f			
rs13208321	Anttila et al. (4)	chr6:96860354	near <i>FHL5</i>	150,070 bp	A	1.18	All samples ^d			
rs4379368	Anttila et al. (4)	chr7:40466200	<i>C7orf10</i>	Intragenic	T	1.11	All samples ^d			
rs10504861	Anttila et al. (4)	chr8:89547932	near <i>MMP16</i>	208,215 bp upstream	T	0.86	MO only	T	0.26	MA + MO, recessive
rs6478241	Anttila et al. (4)	chr9:119252629	<i>ASTN2</i>	Intragenic	A	1.16	Clinics only (MA and MO) ^f			

MA: migraine with aura; MO: migraine without aura; SNP: single nucleotide polymorphism.

^aGenome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly.

^bGenotyping failed in our study.

^cExcluded from our study (controls not in Hardy–Weinberg equilibrium).

^dAdditional association with the 'MO only' group.

^eAdditional association with the 'clinics only (MA and MO)' group.

^fAdditional association with the 'All samples' group.

Minor allele frequencies (MAFs) and odds ratios (ORs) are expressed as a range for the study of Chasman (performed in different population groups).

Minor allele in (+) strand.

Table 3. Case-controls association study performed in our sample of 512 MA patients and 535 control individuals.

SNP	Position ^a	Gene	Ca-Co	Genotypes												Alleles						
				Co-dominant						Recessive			Dominant			Overdominant			Additive		Allele 2 vs. 1	
				Cases (%)						22 vs. 21 + 11			22 + 21 vs. 11			11 + 22 vs. 12			p-value		OR (95% CI)	
				11	12	22	11	12	22	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)			
rs2651899	chr1:3083712	PRDM16	0.516-0.455	124 (24.22)	248 (48.44)	140 (27.34)	158 (29.53)	267 (49.91)	110 (20.56)	0.0198	0.0113	1.45 (1.09-1.93)	0.0474	1.32 (1.00-1.74)	0.6867	0.95 (0.75-1.21)	0.0059	1.27 (1.07-1.51)	0.0056	1.27 (1.07-1.51)		
rs10166942	chr2:234825093	near TRPM8	0.183-0.181	336 (65.62)	165 (32.23)	11 (2.15)	364 (68.04)	148 (27.66)	23 (4.30)	0.0519	0.0442	0.48 (0.23-1.00)	0.4221	1.11 (0.86-1.44)	0.1105	1.24 (0.95-1.62)	0.9629	1.01 (0.80-1.26)	0.963	1.01 (0.8-1.24)		
rs1172113	chr12:57527283	LRP1	0.336-0.347	235 (45.90)	210 (41.02)	67 (13.09)	227 (42.43)	245 (45.79)	63 (11.78)	0.3254	0.5437	1.12 (0.78-1.62)	0.2773	0.87 (0.68-1.12)	0.1353	0.83 (0.65-1.06)	0.6191	0.96 (0.80-1.14)	0.6132	0.96 (0.87-1.26)		
rs12134493	chr1:15677946	near TSPAN2	0.127-0.110	389 (75.98)	116 (22.66)	7 (1.37)	422 (78.88)	108 (20.19)	5 (0.93)	0.4926	0.5073	1.47 (0.46-4.68)	0.2712	1.18 (0.88-1.57)	0.3424	1.15 (0.86-1.55)	0.2400	1.18 (0.90-1.54)	0.2459	1.18 (0.66-1.11)		
rs7577262	chr2:234818869	TRPM8	0.098-0.097	415 (81.05)	94 (18.36)	3 (0.59)	438 (81.87)	90 (16.82)	7 (1.31)	0.4182	0.2301	0.45 (0.12-1.75)	0.7675	1.05 (0.77-1.43)	0.5461	1.10 (0.80-1.52)	1.0000	1.00 (0.75-1.34)	1.0000	1.00 (0.75-1.34)		
rs6790925	chr3:30480085	near TGFB2	0.380-0.371	205 (40.04)	225 (43.95)	82 (16.02)	209 (39.07)	255 (47.66)	71 (13.27)	0.3060	0.1753	1.27 (0.90-1.79)	0.8132	0.97 (0.76-1.24)	0.2337	0.86 (0.68-1.10)	0.5998	1.05 (0.88-1.25)	0.5962	1.05 (0.88-1.25)		
rs9349379	chr6:12903957	PHACTR1	0.348-0.368	218 (42.58)	232 (45.31)	62 (12.11)	217 (40.56)	242 (45.23)	76 (14.21)	0.5579	0.3038	0.83 (0.58-1.19)	0.5154	0.92 (0.72-1.18)	0.9567	1.01 (0.79-1.28)	0.3281	0.92 (0.77-1.09)	0.3244	0.91 (0.76-1.09)		
rs13208321	chr6:96860354	FHL5	0.267-0.244	274 (53.52)	203 (39.65)	35 (6.84)	307 (57.38)	195 (36.45)	33 (6.17)	0.4569	0.6222	1.13 (0.69-1.85)	0.2133	1.17 (0.91-1.49)	0.3056	1.14 (0.89-1.46)	0.2299	1.13 (0.93-1.37)	0.2301	1.13 (0.73-1.08)		
rs4379368	chr7:40466200	C7orf10	0.096-0.081	419 (82.00)	86 (16.83)	6 (1.17)	451 (84.30)	81 (15.14)	3 (0.56)	0.3845	0.2633	2.16 (0.54-8.71)	0.3055	1.18 (0.86-1.64)	0.4433	1.14 (0.82-1.59)	0.2284	1.20 (0.89-1.63)	0.2263	1.21 (0.89-1.63)		
rs10504861	chr8:89547932	near MMP16	0.192-0.192	333 (65.04)	161 (31.45)	18 (3.52)	352 (65.79)	161 (30.09)	22 (4.11)	0.8182	0.6189	0.85 (0.45-1.61)	0.8096	1.03 (0.80-1.33)	0.6493	1.06 (0.82-1.38)	0.9727	1.00 (0.81-1.25)	0.9723	1.00 (0.8-1.24)		
rs6478241	chr9:119252629	ASTN2	0.423-0.434	161 (31.45)	269 (52.54)	82 (16.02)	172 (32.15)	262 (48.97)	101 (18.88)	0.4095	0.2362	0.82 (0.60-1.14)	0.8298	1.03 (0.79-1.34)	0.2715	1.15 (0.90-1.46)	0.6113	0.96 (0.80-1.14)	0.6177	0.96 (0.88-1.24)		

MAF: minor allele frequency; Ca: cases; Co: controls; OR: odds ratio; CI: confidence interval.

^aGenome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) assembly.

In bold, nominal *P*-values (*P* < 0.05).

for SNPs rs12134493, located near *TSPAN2* (dominant model, $P=0.0362$) and rs10504861, near *MMP16* (recessive model, $P=0.0288$) (see Table 1 in online Supplementary Material).

We also tested association between the SNPs and the different phenotypes using logistic regression modelling, that rendered significant results for SNPs rs2651899 ('All MA', additive, $P=0.0061$; 'MA only', additive, $P=0.0038$) and rs12134493 ('Both MA and MO', additive, $P=0.0417$), in all cases with the additive model as the most suitable one for predicting the disease status (AIC values of 1446.7, 1123.8 and 804.14, respectively). However, non-significant results were obtained for rs10166942 and rs10504861 (see Table 2 in online Supplementary Material).

In all cases the direction of the effect was consistent with the previous reports (Table 2). Specifically, for rs2651899 and rs12134493 the risk allele is the minor one both in the original report and in our replication study, C and A in the (+) DNA strand, respectively. In contrast, for rs10166942 and rs10504861, the associated risk alleles, T and C, are the most frequent ones in all studies.

Discussion

In summary, four out of 12 tested SNPs revealed a nominal association with MA in our sample, tentatively replicating previous GWAS findings: rs2651899 (*PRDM16*), rs12134493 (near *TSPAN2*), rs10166942 (near *TRPM8*) and rs10504861 (near *MMP16*). The first two associations are the most robust replication signals in our study, as they emerge in the χ^2 testing under different genetic models and in the logistic regression analysis. In contrast, rs10166942 and rs10504861 show association only under the recessive model in the χ^2 comparisons and not in the logistic regressions.

SNP rs2651899 was found to be associated with migraine in the two previous studies that we aimed to replicate (1,4) and more recently in a replication study carried out in a Chinese sample (12) and thus emerges as the most consistent hit across this set of GWAS studies. rs2651899 is located in the first intron of the *PRDM16* gene and its role in the pathophysiology of migraine remains still unclear. However, it has recently been associated with cardiac disease (non-syndromic left ventricular non-compaction cardiomyopathy and dilated cardiomyopathy) (13). Given the known comorbidity between cardiovascular disease and migraine, *PRDM16* may be considered as a candidate gene in future studies. The association with SNP rs10166942 has previously been replicated in a Danish population (2). This variant is located close to *TRPM8*, a gene that has been consistently associated with migraine in several studies, supporting a connection between migraine and neuropathic pain (1). Our study

is the first to replicate the association of rs12134493 and rs10504861 with migraine, with nominal associations found in our 'Both MA and MO' subgroup. rs12134493 lies next to *TSPAN2*, a gene encoding a cell surface protein, which mediates signal transduction. rs10504861 is located near *MMP16*, encoding a matrix metalloproteinase (MT-MMP2/MMP16) responsible for the cleavage of LRP1, a protein known to increase axonal and synaptic plasticity in cortical neurons. A SNP in the *LRP1* gene, rs11172113, also showed association with migraine in a GWAS (1,4) and in a subsequent replication study (2), but displayed negative results in our study.

There are coincidences and discrepancies between our results and the associations reported previously, which may be explained by several methodological issues: (i) the sample size of our cohort (about 500 patients and 500 controls) is smaller than those of the previous GWAS. Thus, the study is underpowered and the likelihood of false negative findings is high. Although we found nominal findings, none of them survived multiple testing corrections; (ii) our patients' group consists of subjects clinically diagnosed with MA, while the previous studies that we are replicating include MA and also MO patients. Although MA and MO share clinical features, their genetic background may differ, at least in part, as shown by previous studies (4). To shed light on the shared and specific genetic risk factors for MA and MO, it would be interesting to systematically cross-test any migraine-associated SNP in the two clinical entities. Moreover, the fact that we are comparing clinic- and population-based studies may be another reason for the discordant results, as diagnosis of aura is usually more reliable in a clinical setting; (iii) in our sample, the proportion of pure MA differs from that reported in previous studies. Likewise to the MO vs. MA paradigm, it is conceivable that subphenotypes of MA (i.e. 'MA-only' vs. 'Both MA and MO') may conceal specific genetic backgrounds; (iv) the small number of positive replications in our study may also be related to the underlying architecture of MA vs. MO. It is conceivable that rare variation plays a more important role than common variation in MA, whereas frequent variants would be more relevant in MO. In favour of this hypothesis is that most association findings from GWA studies have been identified in MO or in 'all migraine' samples.

In conclusion, although our results do not attain statistical significance, the nominal findings obtained here suggest that previously reported loci may be involved in the genetic architecture of MA. However, additional replication studies in larger MO and MA sets are warranted to weigh up the relevance of these susceptibility loci to both common migraine phenotypes.

Article highlights

- Case-control association study of 512 migraine with aura patients and 535 migraine-free controls aimed at replicating previously reported migraine GWAS findings.
- Suggestive association with four out of 12 loci studied: one SNP in the *PRDM16* gene and three SNPs located close to *TRPM8*, *TSPAN2* and *MMP16*.
- These genes have been related to cardiac disease, neuropathic pain, signal transduction or axonal/synaptic plasticity.

Funding

Funding for this study was provided by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2009–13182-C01, SAF2009–13182-C03), AGAUR (2014SGR-0932, 2009SGR-0078), Fondo de Investigaciones Sanitarias (FIS: PI10/00876) and Fundació La Marató de TV3 (072310). These institutions had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication.

Conflict of interest

P.P.R. reports support for conference visits from MSD and Almirall, and consultancy for Allergan. A.M. received honorary fees for lectures and advisory boards from Novartis Europe.

Acknowledgments

We thank all the patients who participated in this study.

References

1. Chasman DI, Schurks M, Anttila V, et al. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nat Genet* 2011; 43: 695–698.
2. Esserlind AL, Christensen AF, Le H, et al. Replication and meta-analysis of common variants identifies a genome-wide significant locus in migraine. *Eur J Neurol* 2013; 20: 765–772.
3. International Headache Society (IHS) HCS. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 2004; 24 Suppl. 19–160.
4. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet* 2013; 45: 912–917.
5. Anttila V, Stefansson H, Kallela M, et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet* 2010; 42: 869–873.
6. Ligthart L, de Vries B, Smith AV, et al. Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *Eur J Hum Genet* 2011; 19: 901–907.
7. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet* 2012; 44: 777–782.
8. Sintas C, Carreno O, Fernandez-Morales J, et al. A replication study of a GWAS finding in migraine does not identify association in a Spanish case-control sample. *Cephalalgia* 2012; 32: 1076–1080.
9. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
10. Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, et al. SNPAssoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 2007; 23: 644–645.
11. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: a tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559–575.
12. An XK, Ma QL, Lin Q, et al. PRDM16 rs2651899 Variant Is a Risk Factor for Chinese Common Migraine Patients. *Headache* 2013; 53: 1595–1601.
13. Arndt AK, Schafer S, Drenckhahn JD, et al. Fine mapping of the 1p36 deletion syndrome identifies mutation of PRDM16 as a cause of cardiomyopathy. *Am J Hum Genet* 2013; 93: 67–77.

Supplementary table 2. Logistic regression analysis for SNPs under different genetic models

SNP	Diagnosis	MODEL FITTING												MODEL COMPARISONS*		
		ADDITIVE			DOMINANT			RECESSIVE			CODOMINANT			DEVIATION FROM		AIC (MODEL)
		z-value	p-value		z-value	p-value		z-value	p-value		z-value	p-value		z-value	p-value	
rs2651899	All MA	2.7430	0.0061	1.9780	0.0480	2.5270	0.0115	2.7610	0.0058	-0.4030	0.6870	1446.7 (ADD)				
	MA only	2.8960	0.0038	2.0120	0.0442	2.7530	0.0059	2.9110	0.0036	-0.5580	0.5771	1123.8 (ADD)				
rs10166942	All MA	0.0460	0.9629	0.8030	0.4221	-1.9500	0.0512	-1.7840	0.0745	1.5950	0.1108	-				
rs12134493	Both MA and MO	2.0370	0.0417	2.1220	0.0339	0.2310	0.8172	0.3510	0.7258	2.1000	0.0358	804.1 (ADD)				
rs10504861	Both MA and MO	-0.5470	0.5846	0.1140	0.9094	-1.8270	0.0677	-1.7690	0.0770	0.8830	0.3773	-				

MA: migraine with aura; MO: migraine without aura; ADD: additive model

* Best result from all comparisons performed

Article 6

Exploració de gens de microRNAs com a candidats per a la susceptibilitat a la migranya: estudi d'associació de variants genètiques comunes.

Resum

La migranya és un trastorn neuronal complex caracteritzat per episodis recurrents de cefalea que afecta el 15% de la població europea. Pot dividir-se en dos subtipus clínics: migranya amb aura (MA) i sense aura (MO), la primera de les quals té una base genètica més gran. Amb l'objectiu d'identificar variants comunes de risc s'han realitzat estudis d'associació a gran escala i en gens candidats, aquests últims centrats sobretot en sistemes de neurotransmissió, hormonals i vasculars. El glutamat és un dels neurotransmissors que més s'ha relacionat amb la migranya i la seva fisiopatologia, tot i que fins ara els estudis d'associació hi han trobat poques variants genètiques associades amb la malaltia. Recentment, elements reguladors de l'expressió gènica com els miRNAs i variants en els gens que els codifiquen han estat objecte d'estudi en diversos trastorns neuropsiquiàtrics, amb resultats força rellevants. S'han seleccionat 40 SNPs localitzats en gens o prop de gens que codifiquen miRNAs que regulen, potencialment, l'expressió de gens relacionats amb el glutamat. S'han genotipat 512 pacients MA i 535 controls per dur a terme un estudi d'associació. S'ha detectat associació nominal amb la MA per a set dels SNPs. Posteriorment s'ha dut a terme un estudi de rèplica *in silico* en una mostra de 23.285 pacients migranyosos i 95.425 controls del Consorci Internacional de Genètica de les Cefalees (*International Headache Genetics Consortium*, IHGC) dels quals es disposa de genotips a escala genòmica. Aquest estudi ha confirmat una associació significativa entre la MA i l'SNP rs12610046, situat a 3' del gen miR-7-3. Els nostres resultats suggereixen la possible implicació de variants de miRNAs en la susceptibilitat a la migranya, ampliant així l'espectre de gens candidats per a aquest trastorn complex.

Referència

Sintas C, Anttila V, Toma C, Fernández-Morales J, Vila-Pueyo M, Narberhaus B, Arenas C, Aarno Palotie, International Headache Genetics Consortium (IHGC), Pozo-Rosich P, Macaya A, Cormand B. Exploration of microRNA genes as candidates for susceptibility to migraine: association study with common genetic variants. Manuscrit en preparació per sotmetre a la revista *European Journal of Human Genetics*.

EXPLORING MICRORNA GENES AS CANDIDATES FOR SUSCEPTIBILITY TO MIGRAINE: ASSOCIATION STUDIES WITH COMMON GENETIC VARIANTS

Cèlia Sintas^{1,2,3}, Claudio Toma¹, Jèssica Fernández-Morales^{4,5}, Marta Vila-Pueyo⁶, Bernat Narberhaus⁷, Verner Anttila^{8,9,10,11}, Aarno Palotie^{8,9,11}, International Headache Genetics Consortium (IHGC), Patricia Pozo-Rosich^{4,5}, Alfons Macaya⁶, Bru Cormand^{1,2,3}

¹Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

²Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain

³Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER)-Institute of Health Carlos III, Spain

⁴Headache and Neurological Pain Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain.

⁵Headache Unit, Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain.

⁶Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

⁷Neurology Service, Hospital Sant Joan de Déu (Fundació Althaia), Manresa, Barcelona, Spain

⁸Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, Cambridge, UK.

⁹Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM), University of Helsinki, Helsinki, Finland.

¹⁰Analytical and Translational Genetics Unit, Department of Medicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA. ¹¹Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, Massachusetts, USA.

Corresponding author:

Bru Cormand, PhD

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Av. Diagonal 643, 08028 Barcelona, Spain

Telephone: +34 934021013

Fax: +34 934034420

Email address: bcormand@ub.edu

ABSTRACT

Migraine is a common complex neuronal disorder characterized by recurrent episodes of headache that affects 15% of the European population. It can be classified into two clinical subtypes, migraine with aura (MA) and migraine without aura (MO), the first one thought to present a stronger genetic component. Both genome-wide and candidate-gene association studies have been performed to identify common risk variants, the latter focusing mostly on neurotransmitter, hormonal and vascular systems. Glutamate is one of the neurotransmitters that has been most extensively involved in migraine and its pathophysiology, yet only a few risk gene variants have been associated with the disorder. More recently, regulatory elements such as miRNAs and variants in their coding genes have been studied in several neuropsychiatric disorders and their involvement is becoming increasingly relevant. We selected a set of 40 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located within or close to genes encoding miRNAs that are predicted to target glutamate-related genes and we genotyped them in 512 MA patients and 535 controls to perform an association study. Seven SNPs were found nominally associated with MA. Subsequently, a follow-up study was performed in a sample of 23,285 migraine patients and 95,425 controls from the International Headache Genetics Consortium. This study confirmed a significant association with SNP rs12610046, located downstream from the miR-7-3 gene. Our findings suggest a potential involvement of microRNA variants in the susceptibility to migraine, broadening the spectrum of candidate genes for this complex disorder.

KEY WORDS

migraine, miRNA, case-control association study, glutamate, miR-7-3

INTRODUCTION

Migraine is a neurological disorder that manifests with episodes of headache lasting up to 72 hours, and features other clinical signs such as photophobia, nausea, phonophobia and aggravation with physical activity. The prevalence of migraine may vary among geographic regions, but stands around 15% in the European population, showing a higher prevalence in women than in men (3:1 ratio)^{1,2}. Common forms of migraine can be divided into two main types, with and without aura (MA and MO, respectively), following the criteria of the International Classification of Headache Disorders 2nd Edition (IHS 2004)³. Aura appears in about one third of migraine patients and in these cases a stronger genetic burden seems to be present⁴. The aura usually precedes and accompanies the headache, and causes a development of neurological symptoms, which often consist of visual disturbances and can last from minutes to days⁴.

As a complex disorder, common forms of migraine are thought to be influenced by both genetic and environmental factors. The interaction between them may widen the phenotypic spectrum of the disorder, complicating both the diagnosis and the genetic studies¹.

The search for common genetic factors influencing migraine has been approached mainly through case-control association studies, either by analyzing candidate genes (candidate gene association studies, CGAS) or at genome-wide scale (genome-wide association studies, GWAS). CGAS have allowed identification of a number of susceptibility variants in genes related to neurotransmission (dopamine, serotonin and glutamate), hormones and the vascular system¹, since the pathophysiology of migraine involves both neuronal and vascular functions⁵. On another hand, GWAS have allowed the identification of susceptibility variants other than the usual GCAS suspects^{2,4,6-9}.

Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the brain, has been closely related to migraine and its pathogenesis¹⁰, with evidence for its involvement at different levels. Physiologically, it has been proposed that an increased release of glutamate may lead to increased susceptibility to cortical spreading depression (CSD), that is thought to trigger the aura¹¹. In severe forms of MA, such as hemiplegic migraine, mutations in the causative genes have been suggested to result in an increase of glutamate efflux to the synapse¹². Furthermore, a few cases of hemiplegic migraine and episodic ataxia patients with mutations

in *SLC1A3*^{12,13}, encoding the Excitatory Amino Acid Transporter 1 (EAAT1), a glial glutamate transporter, have been reported. These mutations would result in a decreased glutamate uptake¹². Also, several association studies involving variants within or near glutamate genes, have identified risk SNPs: rs2195450 and rs3761555 from CGAS, associated with MA and located in the regulatory regions of glutamate receptors *GRIN1A* and *GRIN3A*, respectively¹⁴, and the first risk variant identified in a GWAS, rs1835740, located between *MTDH* and *PGCP*, the first of the two genes encoding a downregulator of *SLC1A2*, which in turn codes for the glutamate transporter EAAT2⁶.

Overall, despite the numerous association hits reported for migraine, replication studies have rendered diverse and sometimes controversial results^{1,15-20}. Also, as identifying the actual causal variants is not an easy task, the genetic background of migraine is still far from complete. In recent years, attention has turned to regulatory elements and their variants, as there is evidence for their contribution to the phenotype²¹. This is the case of microRNAs (miRNAs) in psychiatric disorders. Both association studies with miRNA genes and the analysis of miRNA expression patterns have shown the connection of these molecules with human disease, including schizophrenia and neuropathic pain disorders, among others^{22,23}.

MiRNAs are a class of small noncoding RNAs of 19-25 nucleotides that act as posttranscriptional regulators of gene expression either by repressing protein synthesis or by degrading their mRNA targets, and are predicted to regulate almost two thirds of human genes²⁴. MiRNA genes are transcribed into pri-miRNA (500-3000 base pairs) and further processed to a pre-miRNA form of 60-70 nucleotides. The pre-miRNA is cleaved to its mature form, consisting of a small miRNA containing the seed region (around 7 bases) that can interact with its target²⁵. Therefore, polymorphisms in miRNA target regions and their coding genes may contribute to phenotypic variation^{26,27}.

In this study we report the first attempt to identify associations between migraine and common variants located in miRNA genes that regulate the expression of glutamate-related genes.

MATERIALS AND METHODS

Clinical sample and DNA isolation

Discovery sample: The clinic-based sample consisted of 517 Caucasian Spanish unrelated patients (78.13% women) and 535 ethnically-matched migraine-free controls (73.83% women), recruited at Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona, Spain) and Hospital Sant Joan de Déu (Manresa, Barcelona, Spain) between 2002 and 2010. Patients had been classified as MA according to the International Criteria for Headache Disorders 2nd edition. Clinical details of our sample are provided in Table 1. Control individuals were selected based on a personal interview and were unrelated blood donors with no personal or family history of severe headaches. The study was approved by the relevant local Ethics Committees and informed consent was obtained from all the participants or their legal representatives according to the Helsinki Declaration. DNA was extracted from peripheral blood lymphocytes by a standard salting-out procedure.

Replication sample: The sample used for replication purposes was previously described by Anttila et al. ⁴. It consisted of 23,285 migraine cases from 29 clinic- and population-based studies. The samples included 5,175 cases from 5 clinic-based collections of affected individuals matched to 13,972 population-based controls, as well as 18,110 cases from 14 population-based studies and 81,453 migraine-free or control individuals from the same studies.

Selection of miRNA genes

We selected miRNA molecules that regulate the expression of glutamate-related genes. These include genes encoding glutamate receptors (ionotropic AMPA (*GRIA1-4*), kainate (*GRIK1-5*), NMDA (*GRIN 1*, *GRIN2A-D*, *GRIN3A-B*) and metabotropic (*GRM1-8*)), glutamate transporters (excitatory amino-acid transporters (EAATs: *SLC1A1-3*, *SLC1A6-7*) and vesicular glutamate transporters (VGLUTs: *SLC17A5-8*)) and several glutamate receptors-related proteins (*GRINA* (NMDA receptor glutamate-binding subunit) and *GRIP1-2* (glutamate receptor interacting proteins)). For the selection of miRNAs we used the miRecords (<http://mirecords.biolead.org>) and TarBase6.0

(<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase>) databases and we browsed relevant literature on glutamate regulation by miRNAs. A total of 9 mature miRNAs, encoded by a total of 14 miRNA genes, were selected for further investigation in our study (Supplementary Table 1). The coding region of the miRNA genes and their organization in the genome (isolated, in clusters, within protein-coding genes, etc.) was determined using miRbase. Eight out of 14 genes were isolated miRNAs and six were located in miRNA clusters. In this case, we considered all the miRNAs in the cluster as targets for our study.

To define the region of interest for the SNP selection, we considered a flanking region of 5 to 10kb upstream from the miRNA gene and 5kb downstream, considering the described regions involved in miRNA gene regulation by Wang et al.²⁸. Also, when the miRNA was located in an intronic region of a protein-coding gene, we included 5kb from the promoter region of the host gene (Supplementary Table 1).

Selection of SNPs

Haploview v4.1²⁹ and HapMap project data (hapmap.ncbi.nlm.nih.gov/index.html.en, HapMap Genome Browser release #28 phase II+III) corresponding to CEU individuals were used for the selection of tagSNPs. A total of 47 tagSNPs were selected with a minor allele frequency (MAF) > 0.10 and, with r^2 values between any pair of selected SNPs < 0.8.

Genotyping

Genotyping in our MA sample was performed using the Sequenom technology by the National Genotyping Center (CeGen, www.cegen.org, Santiago de Compostela, Spain). Three CEPH samples were included in every plate and a 100% concordance was observed with HapMap data except for one of the SNPs (rs2064611), which was excluded from the study. In addition, no differences were found in the genotypes of two replicate samples that were included as intra-plate and inter-plate controls.

Association analysis

Discovery sample: The analysis of minimal statistical power for the χ^2 test under a dominant model using the Genetic Power Calculator software (pnu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc) with

$\alpha=0.05$, a lifetime risk of 1.25, a disease prevalence of 0.15 and the lowest minor allele frequency (MAF) found in controls (0.104), rendered a value of 41.9%.

Statistical analysis for the association study was carried out using the SNPAssoc R library for a total of 41 SNPs. First, Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) was tested in our control sample, and only one SNP (rs3742406) rendered a p-value below 0.05 and it was not considered in the analysis. We compared allele and genotype frequencies of 40 SNPs considering all the MA sample under the codominant, dominant, recessive and log-additive genetic models, and adjusting by sex. Subsequently, we also considered two MA subcategories for further analysis: 'MA only' (patients developing aura in at least 2/3 of the migraine episodes, n = 318) and 'Both MA and MO' (patients with less than 2/3 of the crises with aura, n = 180).

Replication sample: Statistical analysis was performed with data from a previous GWAS⁴ by using a frequentist additive model based on an expected allelic dosage model for SNP markers, adjusting for sex (using either SNPTTEST or ProbABEL). Three subgroups were also analyzed: "Clinics only", consisting of patients from clinic-based studies, and "MA" and "MO", both groups from population-based studies. Three of the SNPs selected for replication were directly present in the GWAS dataset (rs12610046, rs13245645 and rs8015713), whereas a fourth one mapped well to a proxy (rs921968, $r^2=0.95$). Three additional replication SNPs were evaluated although linkage disequilibrium values with their proxies in the GWAS data set were low (rs941714, rs8023048, rs11160619, $0.174 < r^2 < 0.295$). The FDR method of Benjamini and Hochberg was used for multiple testing correction³⁰.

RESULTS

We genotyped 47 SNP variants located in 14 miRNA gene regions in a Spanish sample of 517 MA patients and 535 gender- and ethnically-matched controls. From these, a total of seven SNPs were not considered in the analysis: genotyping of five SNPs failed, the genotypes of another SNP in CEPH individuals did not match with the available data in the databases, and another SNP was not in HWE. Additionally, we checked the genotyping rate for all the individuals, and five patients that showed values under 50% were removed from the

study. The minimum genotyping rate reached for the rest of the individuals was 90,48% and the average for the whole sample was 99.89%. Excluding the five SNPs that failed, the average number of successfully genotyped individuals per SNP was 99.71%. Thus, for our association analysis we assessed 40 SNPs in a sample of 512 patients and 535 controls, and considered both genotype and allele comparisons.

The association analysis showed nominal associations (p-value < 0.05) for seven out of 40 SNPs (Table 2): rs12610046 (miR-7-3 gene, P=0.0063) rs13245645 (miR-335, P=0.006), rs4672891 (miR-26b, P=0.0028) and rs10151229 (P=0.0176), rs7161194 (P=0.0252), rs8015713 (P=0.038) and rs8016185 (P=0.001), the last four being located in the miRNA cluster including miR-485. However, none of them reached significant values after applying the Bonferroni correction for multiple testing.

Subsequently, we subdivided our clinical sample in two groups in order to increase homogeneity within the MA phenotype: We considered the subgroups 'MA only' (more than 2/3 of the migraine episodes present with aura) and 'both MA and MO'. This subdivision has also been reported in previous studies using clinical samples of migraine patients^{6,15}. For the 'MA only' subgroup, four SNPs showed a nominal association (Supplementary Table 2): rs12610046 (P=0.0012), rs4672891 (P=0.007), rs8015713 (P=0.038) and rs8016185 (P=0.0334). Three SNPs achieved nominal associations in the 'both MA and MO' group: rs13245645 (P=0.0079), rs4672891 (P=0.0396) and rs8016185 (P=0.0002). Again, none of these associations survived the Bonferroni correction.

Overall, only SNPs rs4672891 and rs8016185 showed nominal associations in the three analyzed groups, whereas rs12610046 and rs8015713 remained significant for 'MA only', and rs13245645 for 'both MA and MO'. After the sample division, no new associations emerged with any of the remaining SNPs.

We explored the performance of the seven SNPs showing nominal association signals in the discovery sample in a large GWAS dataset performed on 29 population sets and including 23,285 cases and 95,425 controls. After applying corrections for multiple testing, only SNP rs12610046 reached significant results for all the clinical groups tested (Table 3). The lowest p-value was obtained in the 'Clinics only' group, consisting of both MA and MO patients diagnosed by clinicians in a hospital setting (P=3.16x10⁻⁴).

DISCUSSION

In recent years, interest in the study of the contribution of common genetic variants located in regulatory elements such as miRNAs to complex neuronal disorders has grown rapidly^{21,23}. However, no genetic association studies have systematically explored these type of elements in migraine so far. In this case-control association study we aimed at testing the possible involvement of SNPs in miRNA genes that regulate the expression of glutamate-related genes.

Glutamate, the main excitatory neurotransmitter in the brain, stands as a good candidate for the pathogenesis of migraine and for being involved in the development of the aura³¹, with several reports showing that hemiplegic migraine mutations result in an increase of glutamate levels at the synapse³².

Also, significant associations between MA and SNPs at glutamate genes, like *GRIA1* and *GRIA3*, have been found¹⁴. However, subsequent association studies considering other glutamate receptors and transporters rendered controversial or negative results^{16,20,33}. The first associated variant identified in a migraine GWAS was located near *MTHD*, a down-regulator of the glutamate transporter encoded by *SLC1A2*. This SNP, rs1835740, was replicated in a migraine population from India³⁴ and a trend for association was found in a Swedish migraine sample¹⁹.

We performed a two-stage clinic-based association study of SNP variants located in miRNA gene regions. In the discovery sample, consisting of Spanish MA patients, seven out of 40 SNPs showed nominal association. A follow-up study of the associated SNPs pointed at a single variant, rs12610046, as a risk factor for migraine in the *Clinics* group (clinic-based migraine population), surviving the permutation analysis. The nominally associated SNPs identified in the discovery sample are located in regions flanking miR-7-3, miR-335, miR-26b and in a miRNA cluster that includes miR-485. The protein-coding genes that are targeted by these miRNAs are *GRIA1*, *GRIA2*, *GRINA*, *GRIK2*, *GRIK4*, *GRIN2D*, *GRM3*, *GRM5*, *GRM8*, *GRIP2*, *SLC1A1*, *SLC1A6*, *SLC17A6* and *SLC17A7* (Table 2) according to data from TarBase v6.0 and miRecords. From those, only *GRIA1* had previously been associated with MA¹⁴, and failed to be associated with MO in a follow-up study¹⁶. Although the statistical power of the discovery sample in our study is limited due to sample size constrains, the fact that one of

the nominal hits is replicated in an independent migraine sample reinforces the consistency of our results. The two samples, discovery and replication, showing positive association results for rs12610046 are clinic-based, and include MA individuals, although in the latter, a positive association is also obtained in the analysis of an MO subset. Rs12610046 is located in the 3' flanking region of the miR-7-3 gene, encoding a miRNA that is predicted to target *GRINA* (glutamate receptor, ionotropic, N-methyl D-aspartate-associated protein 1 (glutamate binding)), located at 8q24.3. This gene encodes the protein Lifeguard 1 (LFG1), also known as glutamate [NMDA] receptor-associated protein 1 (NMDARA1), NMDA receptor glutamate-binding subunit and Transmembrane BAX inhibitor motif-containing protein 3 (TMBIM3). Remarkably, the TMBIM3 gene maps close to a locus genetically linked to epilepsy³⁵, a well-known comorbid condition with migraine. This gene is expressed in brain and it has been related to control of apoptotic processes through the modulation of ER calcium homeostasis³⁶, but very little is known about its function with regard to glutamate ionotropic receptors. Its relation with calcium is relevant, as this is a key molecule in the regulation of the release of neurotransmitters like glutamate by the SNARE system³⁷.

In summary, we present the first association study that explores the possible role of variants located in miRNA genes in the susceptibility to migraine. Further studies in larger samples inspecting a wider range of miRNA genes are warranted to get more insights. Also, functional studies addressing the influence of the associated variants in the expression of miRNAs or in its binding to the target mRNAs are needed.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the patients and the controls for their participation and the clinicians involved for their contribution to the study. The funding for this study was provided by the Spanish Ministerio de Economía y Competitividad (SAF2009-13182-C01, SAF2009-13182-C03) and AGAUR (2014SGR-0932, 2009SGR-0078). These institutions had no further role in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the paper for publication. CS was supported by Ministerio de Economía y Competitividad (BES-2007-16450) and MV-P by a predoctoral grant from VHIR, Barcelona (Spain). CT was supported by the European Union (Marie Curie, PIEF-GA-2009-254930).

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest

ETHICS STATEMENT

This study was approved by the local Ethics Committee and informed consent was obtained from all adult subjects, children, and their parents according to the Helsinki declaration.

REFERENCES

1. Maher BH, Griffiths LR: Identification of molecular genetic factors that influence migraine. *Mol Genet Genomics* 2011.
2. Chasman DI, Schurks M, Anttila V *et al*: Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nature genetics* 2011; **43**: 695-698.
3. International Headache Society (IHS) HCS: The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia : an international journal of headache* 2004; **24 Suppl 1**: 9-160.
4. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P *et al*: Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nature genetics* 2013; **45**: 912-917.
5. Gasparini CF, Sutherland HG, Griffiths LR: Studies on the pathophysiology and genetic basis of migraine. *Current genomics* 2013; **14**: 300-315.
6. Anttila V, Stefansson H, Kallela M *et al*: Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nature genetics* 2010; **42**: 869-873.
7. Ligthart L, de Vries B, Smith AV *et al*: Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *European journal of human genetics : EJHG* 2011.
8. Cox HC, Lea RA, Bellis C *et al*: A genome-wide analysis of 'Bounty' descendants implicates several novel variants in migraine susceptibility. *Neurogenetics* 2012.
9. Freilinger T, Anttila V, de Vries B *et al*: Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nature genetics* 2012; **44**: 777-782.
10. Gasparini CF, Griffiths LR: The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *International journal of biomedical science : IJBS* 2013; **9**: 1-8.
11. Cui Y, Kataoka Y, Watanabe Y: Role of cortical spreading depression in the pathophysiology of migraine. *Neuroscience bulletin* 2014; **30**: 812-822.

12. Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD, Baloh RW: Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology* 2005; **65**: 529-534.
13. de Vries B, Mamsa H, Stam AH *et al*: Episodic ataxia associated with EAAT1 mutation C186S affecting glutamate reuptake. *Arch Neurol* 2009; **66**: 97-101.
14. Formicola D, Aloia A, Sampaolo S *et al*: Common variants in the regulative regions of GRIA1 and GRIA3 receptor genes are associated with migraine susceptibility. *BMC medical genetics* 2010; **11**: 103.
15. Sintas C, Carreno O, Fernandez-Morales J *et al*: A replication study of a GWAS finding in migraine does not identify association in a Spanish case-control sample. *Cephalalgia : an international journal of headache* 2012; **32**: 1076-1080.
16. Maher BH, Lea RA, Follett J *et al*: Association of a GRIA3 gene polymorphism with migraine in an Australian case-control cohort. *Headache* 2013; **53**: 1245-1249.
17. Esserlind AL, Christensen AF, Le H *et al*: Replication and meta-analysis of common variants identifies a genome-wide significant locus in migraine. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 2013; **20**: 765-772.
18. Fan X, Wang J, Fan W *et al*: Replication of migraine GWAS susceptibility loci in Chinese Han population. *Headache* 2014; **54**: 709-715.
19. Ran C, Graae L, Magnusson PK, Pedersen NL, Olson L, Belin AC: A replication study of GWAS findings in migraine identifies association in a Swedish case-control sample. *BMC medical genetics* 2014; **15**: 38.
20. Cargnin S, Viana M, Mittino D *et al*: Lack of association between GRIA1 polymorphisms and haplotypes with migraine without aura or response to triptans. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 2014; **35**: 421-427.
21. Muinos-Gimeno M, Espinosa-Parrilla Y, Guidi M *et al*: Human microRNAs miR-22, miR-138-2, miR-148a, and miR-488 are associated with panic disorder and regulate several anxiety candidate genes and related pathways. *Biological psychiatry* 2011; **69**: 526-533.

22. Lett TA, Chakravarty MM, Felsky D *et al*: The genome-wide supported microRNA-137 variant predicts phenotypic heterogeneity within schizophrenia. *Molecular psychiatry* 2013; **18**: 443-450.
23. Kress M, Huttenhofer A, Landry M *et al*: microRNAs in nociceptive circuits as predictors of future clinical applications. *Frontiers in molecular neuroscience* 2013; **6**: 33.
24. Friedman JM, Jones PA, Liang G: The tumor suppressor microRNA-101 becomes an epigenetic player by targeting the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Cell cycle* 2009; **8**: 2313-2314.
25. Mishra PJ: MicroRNA polymorphisms: a giant leap towards personalized medicine. *Personalized medicine* 2009; **6**: 119-125.
26. Borel C, Antonarakis SE: Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 2008; **19**: 503-509.
27. Muinos-Gimeno M, Montfort M, Bayes M, Estivill X, Espinosa-Parrilla Y: Design and evaluation of a panel of single-nucleotide polymorphisms in microRNA genomic regions for association studies in human disease. *European journal of human genetics : EJHG* 2010; **18**: 218-226.
28. Wang G, Wang Y, Shen C *et al*: RNA polymerase II binding patterns reveal genomic regions involved in microRNA gene regulation. *PloS one* 2010; **5**: e13798.
29. Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ: Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 2005; **21**: 263-265.
30. Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I: Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behavioural brain research* 2001; **125**: 279-284.
31. Pietrobon D: Calcium channels and migraine. *Biochimica et biophysica acta* 2013; **1828**: 1655-1665.
32. Ferrari MD, Klever RR, Terwindt GM, Ayata C, van den Maagdenberg AM: Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *The Lancet Neurology* 2015; **14**: 65-80.

33. Garcia-Martin E, Martinez C, Serrador M *et al*: SLC1A2 rs3794087 variant and risk for migraine. *Journal of the neurological sciences* 2014; **338**: 92-95.
34. Ghosh J, Pradhan S, Mittal B: Genome-wide-associated variants in migraine susceptibility: a replication study from North India. *Headache* 2013; **53**: 1583-1594.
35. Bonaglia MC, Giorda R, Tenconi R *et al*: A 2.3 Mb duplication of chromosome 8q24.3 associated with severe mental retardation and epilepsy detected by standard karyotype. *European journal of human genetics : EJHG* 2005; **13**: 586-591.
36. Rojas-Rivera D, Armisen R, Colombo A *et al*: TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis. *Cell death and differentiation* 2012; **19**: 1013-1026.
37. Malsam J, Kreye S, Sollner TH: Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2008; **65**: 2814-2832.

Table 1. Clinical profile of the Spanish migraine with aura sample.

FEATURE	% OF MA PATIENTS*
Family history with migraine	77.17%
Age of onset	13.5 (STDEV=12)
MAIN FEATURES	
Pulsatile pain	69.90%
Unilateral pain	73.43%
Moderate-severe intensity	94.34%
Aggravation by physical activity	93.94%
OTHER FEATURES	
Photophobia	89.29%
Occasional photophobia	5.05%
Phonophobia	81.61%
Occasional phonophobia	5.45%
Nauseas	85.85%
Vomits	61.81%

*Minimum percentage of data was 88.28% in the 'Family history' field, and maximum of 99.19% for 'Other features'.

Table 2. Nominal associations for selected SNPs in our Spanish sample of 512 MA patients and 535 control individuals.

SNP	miRNA gene	Target gene*	Genotypes										Alleles					
			Codominant					Recessive					Dominant		Additive			
			Cases		Controls		22 vs. 21+11		22		22 vs. 21+11		22+21 vs. 11		22 vs. 21+11		Allele 2 vs. 1	
			MAF	Ca-Co	11	12	11	12	22	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	p-value	OR (95% CI)	
rs10151229	hsa-mir-485	GRIA2	0.501-0.456	122 (23.83)	267 (52.15)	123 (24.02)	162 (30.28)	258 (48.22)	115 (21.50)	0.0586	0.3299	1.15 (0.86-1.54)	0.0176	1.39 (1.06-1.83)	0.0379	1.20 (1.01-1.43)	0.0385	0.83 (0.7-0.99)
rs12610046	hsa-mir-7-3	GRINA	0.469-0.447	129 (25.20)	286 (55.86)	97 (18.95)	172 (32.15)	248 (46.36)	115 (21.50)	0.0063	0.2952	0.85 (0.63-1.15)	0.0120	1.41 (1.08-1.85)	0.3035	1.10 (0.92-1.31)	0.3103	0.91 (0.77-1.09)
rs13245645	hsa-mir-335	GRM5, SLCT7A7, SLCT1A1, GRIP2	0.342-0.378	212 (41.41)	250 (48.83)	50 (9.77)	213 (39.81)	240 (44.86)	82 (15.33)	0.0222	0.0060	0.59 (0.41-0.87)	0.5499	0.93 (0.72-1.19)	0.0743	0.85 (0.71-1.02)	0.0768	1.18 (0.98-1.41)
rs4672891	hsa-mir-26b	GRK2, GRM8, SLCT7A6, SLCTA6	0.414-0.466	181 (35.35)	238 (46.48)	93 (18.16)	145 (27.10)	281 (52.52)	109 (20.37)	0.0114	0.3515	0.86 (0.63-1.18)	0.0028	0.67 (0.51-0.87)	0.0123	0.80 (0.67-0.95)	0.0127	1.25 (1.05-1.48)
rs7161194	hsa-mir-485	GRIA2	0.338-0.377	227 (44.34)	224 (43.75)	61 (11.91)	200 (37.45)	265 (49.63)	69 (12.92)	0.0789	0.6501	0.92 (0.64-1.33)	0.0252	0.75 (0.59-0.97)	0.0628	0.84 (0.70-1.01)	0.0652	1.18 (0.99-1.42)
rs8015713	hsa-mir-485	GRIA2	0.233-0.266	303 (59.30)	178 (34.83)	30 (5.87)	285 (53.27)	215 (40.19)	35 (6.54)	0.1151	0.6347	0.89 (0.53-1.47)	0.0380	0.77 (0.60-0.99)	0.0614	0.83 (0.68-1.01)	0.0620	1.21 (0.99-1.47)
rs8016185	hsa-mir-485	GRIA2	0.188-0.152	347 (67.77)	138 (26.95)	27 (5.27)	381 (71.21)	145 (27.10)	9 (1.68)	0.0044	0.0010	3.30 (1.53-7.09)	0.2565	1.17 (0.89-1.52)	0.0403	1.27 (1.01-1.59)	0.0967	1.28 (1.01-1.61)

*Only target genes related to glutamate receptors and transporters are indicated.

**Reference minor allele taken from controls in our sample.

N=number of individuals, Ca=Cases, Co=Controls, MAF=Minor Allele Frequency

Table 3. Replication study for the seven top SNPs

SNP	reference_allele	MAF	Clinics only						MA		MO	
			All		Clinics only		MA		MO			
			p-value*	OR	p-value*	OR	p-value*	OR	p-value*	OR		
rs941714 (proxy for rs10151229, r2=0.174)	A	0.354432	0.507387	0.991495	0.406049	0.977515	0.916879	0.997269	0.451208	0.982924		
rs12610046	A	0.45678	0.026608	0.975424	3.16E-04	0.916368	0.018434	0.947659	0.008062	0.947776		
rs13245645	C	0.396817	0.411607	0.990527	0.156395	0.965226	0.917343	0.997557	0.175339	1.028791		
rs921968 (proxy for rs4672891, r2=0.95)	G	0.409288	0.250491	1.013195	0.934837	0.997983	0.136295	1.035292	0.681569	1.008504		
rs8023048 (0.193 proxy for rs7161194)	A	0.277264	0.342563	0.988123	0.108833	0.957542	0.514456	0.983467	0.015188	0.946375		
rs8015713	A	0.259928	0.453227	0.99045	0.746338	0.991348	0.381444	1.022438	0.183446	0.969714		
rs11160619 (proxy for rs8016185, r2=0.27)	A	0.190843	0.608379	0.992544	0.123316	0.950166	0.74932	0.990263	0.087782	0.956162		

*Corrected p-values

MAF: Minor allele frequency; MA: migraine with aura; MO: migraine without aura

Supplementary Table 1. Details of the tagSNPs selected for the study, including the mature miRNA to which they belong and the target protein-coding gene

Mature miRNA	Target gene	Source	miRNA precursor	miRNA cluster	Host gene/Intergenic	Chr position*	Region selected* (base pairs)	Tag SNPs
hsa-miR-124	<i>GRM1</i>	TarBase	miR-124-1		intergenic	chr8:9798308-9798392	chr8:9798308-9808392 (15084)	rs491364
	<i>SCL1A3</i>	TarBase	miR-124a-2		intergenic	chr8:65454260-65454368	chr8:65449260-65459368 (10108)	rs12541159 rs298212
			miR-124a-3		intergenic	chr20:61,280,297-61,280,383	chr20:61275297-61285383 (10086)	rs2064611
hsa-miR-132	<i>GRIN2A</i>	Kawashima H., et al, 2010	miR-132	hsa-mir-212, hsa-mir-132	intergenic	chr17:1899952-1900052	chr17:1894952-1905424 (10472)	rs11870150
	<i>GRIN2B</i>	Kawashima H., et al, 2010						rs8065878
hsa-miR-181b	<i>GRI1</i>	Kawashima H., et al, 2010	miR-181b-1	hsa-mir-181a-1, hsa-mir-181b-1	intergenic	chr1:197094625-197094734	chr1:197089625-19709905 (10280)	rs4455005 rs10919595
	<i>GRI2</i>	TarBase, miRecords						
hsa-miR-182	<i>SLC1A1</i>	Krol J., et al, 2010	miR-182	hsa-mir-181a-2, hsa-mir-181b-2	intergenic	chr9:126495810-126495898	chr9:126489542-126500898 (11356)	rs10760371
			miR-182	hsa-mir-183, hsa-mir-96, hsa-mir-182	intergenic	chr7:129197459-129197568	chr7:129192459-129212090 (19631)	rs2402961 rs2402960 rs2402959 rs6467264 rs6965643 rs4626538
hsa-miR-223	<i>GRI2</i>	Harriz MM., et al, 2012	miR-223		intergenic	chrX:65,155,437-65,155,546	chrX:65,145,437-65,160,546 (15109)	rs5964485
	<i>GRIN2B</i>	Harriz MM., et al, 2012						rs1044165
hsa-miR-26b	<i>GRI2</i>	TarBase	miR-26b		overlapping <i>CTDSP1</i>	chr2:218975613-218975689	chr2:218965613-218980689 (15076)	rs1059823
	<i>GRM8</i>	TarBase						rs13062
	<i>SLC17A6</i>	TarBase						rs2739049
	<i>SLC1A6</i>	TarBase						rs4672891
hsa-miR-335	<i>GRI1</i>	TarBase	miR-335		overlapping <i>MEST</i>	chr7:129923188-129923281	chr7:129908188-129928281 (20093)	rs13245645
	<i>GRI4</i>	TarBase						rs2072574
	<i>GRIN2D</i>	TarBase						
	<i>GRM3</i>	TarBase						
	<i>GRM5</i>	TarBase						
	<i>SLC17A7</i>	TarBase						
	<i>SLC1A1</i>	TarBase						
	<i>GRIP2</i>	TarBase						

Supplementary Table 1 (continued)

Mature miRNA	Target gene	Source	miRNA precursor	miRNA cluster	Host gene/intergenic	Chr position*	Region selected* (base pairs)	Tag SNPs
hsa-mir-485	GRIA2	Cohen JE., et al, 2011	mir-485	hsa-mir-381, hsa-mir-487b, hsa-mir-539, hsa-mir-889, hsa-mir-544a, hsa-mir-655, hsa-mir-487a, hsa-mir-382, hsa-mir-134, hsa-mir-668, hsa-mir-485, hsa-mir-323b, hsa-mir-154, hsa-mir-496, hsa-mir-377, hsa-mir-541, others	intergenic	chr14:100591509-100591581	chr14:100,553,156-100,607,891 (547)	rs12892719 rs7141987 rs12590815 rs10132916 rs4906032 rs6575812 rs7161194 rs8023048 rs8015875 rs8016185 rs10151229 rs2007291 rs941714 rs3742406
hsa-miR-7	GRINA	TarBase	miR-7-1		overlapping HNRNPK	chr9:85774483-85774592	chr9:85769483-85790389 (20906)	rs192705 rs296888 rs296891
			miR-7-2	hsa-mir-1179, hsa-mir-7-2, hsa-mir-3529	intergenic	chr15:86956060-86956169	chr15:86947342-86961159 (13817)	rs8023916
			miR-7-3		intergenic	chr19:4,721,682-4,721,791	chr19:4716682-4726791 (10109)	rs1470108 rs11668223 rs879564 rs3760954 rs2885717 rs12610046

*Data from UCSC Genome Browser on Human Mar. 2006 (NCBI36/hg18) Assembly

DISCUSSIÓ

DISCUSSIÓ

CAPÍTOL 1. Estudi genètic de pacients amb formes rares de migranya i fenotips relacionats.

1. Anàlisi mutacional del gens *CACNA1A* i *ATP1A2* en pacients HM

Aquest estudi en 18 pacients no emparentats ha permès identificar 6 mutacions de canvi de sentit en heterozigosi (quatre en el gen *CACNA1A* i dues en *ATP1A2*), que cobreixen el 33,3% de la mostra estudiada (27,7% per a la migranya hemiplègica familiar (FHM) i 5,5% en el cas de la migranya hemiplègica esporàdica (SHM)). Els resultats segueixen la línia d'altres estudis previs amb sèries de pacients HM, on la cobertura està al voltant del 40% per a FHM i entre el 7-16% en SHM (de Vries et al. 2007, Riant et al. 2005, Terwindt et al. 2002). Només s'ha donat un cas d'alta cobertura en SHM, en què els pacients presentaven la malaltia a edats molt primerenques (Riant et al. 2010a). Aquests resultats donarien suport a la idea que els gens *CACNA1A* i *ATP1A2* són els responsables majoritaris del fenotip en el casos familiars però no en els esporàdics, en què l'heterogeneïtat genètica podria ser molt més gran.

Hi ha evidències, tant en estudis previs com en el nostre, que donen suport a la patogenicitat dels canvis identificats (Kraus et al. 2000, Tavraz et al. 2008, Tottene et al. 2002, Tottene et al. 2005). Tots ells cosegreguen amb la malaltia a les famílies (tot i que cal dir que les estructures familiars són en general petites), no s'han trobat en individus sans i estan situats en regions conservades de la proteïna. En aquest cribratge s'han cobert les regions codificants, els llocs d'*splicing*, el promotor i la regió 3'UTR del gen *CACNA1A*. En el cas del gen *ATP1A2*, les regions codificants i els llocs d'*splicing*. D'altra banda, a més de l'anàlisi mutacional per seqüenciació Sanger, s'ha dut a terme un estudi de CNVs per al gen *CACNA1A*, per al qual s'havia descrit prèviament una deleció dels exons 39-47 en un pacient SHM (Labrum et al. 2009).

1.1. Cribratge mutacional del gen *CACNA1A*

En l'article presentat s'han identificat quatre mutacions en el gen, totes elles descrites amb anterioritat. Es tracta de mutacions de canvi de sentit, com la majoria dels canvis responsables de HM. Tres de les mutacions s'havien estudiat prèviament a nivell funcional, mentre que la quarta s'ha analitzat en aquest treball.

1.1.1. Mutacions puntuals identificades en la mostra de 18 pacients HM

La mutació **p.Ser218Leu** s'ha identificat com a canvi *de novo* en un dels pacients de la nostra sèrie. S'ha descrit en d'altres ocasions (Kors et al. 2001; Curtain et al. 2006; Chan et al. 2008; Debais et al. 2009; Stam et al. 2009; Zangaladze et al. 2010) tant en casos familiars com esporàdics. En dos casos esporàdics descrits prèviament (Stam 2009), el canvi apareix també *de novo* en el pacient. Això fa pensar que la posició genòmica implicada seria un *hot spot* mutacional o punt calent de mutació. De fet, el canvi és una transició C>T que té lloc en un dinucleòtid CpG. La incorporació d'un grup metil a la citosina (que passa a 5-metilcitosina) és una de les modificacions epigenètiques més freqüents en el genoma humà. Els residus 5-metilcitosina són més susceptibles a la desaminació que les citosines no metilades, procés que dona lloc a una timina (Antonarakis et al. 2000). D'altra banda, es creu que l'augment observat en les posicions CG>TG es deu en part a una reparació més ineficient dels aparellament erronis que es formen entre T i G (Gates 2009, Lutsenko & Bhagwat 1999). Tots dos fenòmens explicarien la hipermutabilitat de les citosines en dinucleòtids CpG, els punts calents de mutació d'una base més freqüents (Maki 2002).

La mutació **p.Ser218Leu** afecta el llaç citoplasmàtic de la proteïna (Figura 10), entre els segments S4 i S5 del primer domini del canal. Els estudis funcionals que s'han dut a terme en models cel·lulars mostren un lliandar d'activació (i també d'inactivació) del canal disminuït, a més d'una recuperació més ràpida del canal després de la inactivació (Tottene et al. 2005, Weiss et al. 2008). Es tracta d'un guany de funció dels més acusats que s'han descrit per aquest canal. És per això que aquesta mutació es relaciona amb fenotips molt severos dels pacients.

La mutació **p.Thr501Met** s'ha descrit en aquest treball en un pacient amb HM i EA2. El canvi està situat en el segment 1 del segon domini (Figura 10), associat al sensor de voltatge de la proteïna (Campos et al. 2007). Altres estudis l'havien relacionat amb EA2 associat amb migranya, i també amb HM amb atàxia progressiva (Ducros et al. 1999, Mantuano et al. 2010). L'estudi funcional l'ha dut a terme el grup dels Drs. Valverde i Fernández-Fernández (Universitat Pompeu Fabra, UPF) mitjançant un assaig de *patch clamp* en cèl·lules de ronyó embrionari humà HEK293, i ha mostrat alteracions tant en l'activació com en la inactivació del canal. La mutació promou l'activitat del canal a voltatges inferiors i un augment de la densitat de corrent de Ca^{2+} , així com una inactivació a voltatges menys despolaritzats. Aquest guany de funció del canal promouria la neurotransmissió excitadora a través de l'escorça cerebral i afavoriria així l'inici de la CSD. Els resultats obtinguts en aquest estudi són consistents amb les conseqüències funcionals que sovint causen el fenotip HM.

La **p.Arg583Gln** és una mutació també descrita en nombroses ocasions (Battistini et al. 1999), (Ducros et al. 2001), (Terwindt et al. 2002), (Alonso et al. 2003), (Thomsen et al. 2007), (Riant et al. 2010a) en casos FHM i SHM. En el nostre cas, únicament el proband presenta el fenotip HM, tot i que la mutació cosegrega a la família amb EA2, atròfia cerebel·lar i/o MA (Figura 1A de l'article). S'ha descrit també un portador d'aquest canvi en

una família amb atàxia (Cleves et al. 2009). La mutació està situada en un segment de la proteïna que conté el sensor de voltatge, el quart del domini 2 (Figura 10), i els estudis funcionals previs descriuen canvis en l'activació i inactivació dependent de voltatge, que responen a potencials més negatius (Kraus et al. 2000) i desemboquen en un guany de funció, característic del fenotip HM.

El canvi **p.Thr666Met** és el canvi més prevalent en HM, descrit en més de vint casos entre pacients FHM i SHM (Ducros et al. 1999, Freilinger et al. 2008, Friend et al. 1999, Kors et al. 2003, Ophoff et al. 1996, Riant et al. 2010a, Terwindt et al. 2002, Thomsen et al. 2007, Wada et al. 2002, Yabe et al. 2008), i està situat al llaç extracel·lular entre els segments 4 i 5 del segons domini (Figura 10). Els estudis funcionals que s'han realitzat mostren que hi ha un guany de funció del canal mediat per canvis en el flux de Ca^{2+} , tot rebaixant el llindar d'activació i de recuperació del canal després de la inactivació (Kraus et al. 1998, Tao et al. 2012, Tottene et al. 2002).

Dues de les mutacions que s'han identificat en aquest estudi són les més prevalents en HM. En el cas del canvi p.Thr666M, també situat en un dinucleòtid CpG, un estudi previ va adreçar la qüestió de la seva recurrència, i va estudiar nou famílies franceses (Ducros et al. 1999). L'anàlisi de marcadors polimòrfics intrònics suggerí que el canvi es donava per esdeveniments mutacionals recurrents, i que la seva elevada freqüència no seria deguda a un efecte fundador. D'altra banda, aquest canvi també s'ha identificat *de novo* en un pacient (Riant et al. 2010a). La mutació p.Arg583Gln, pel contrari, no està situada en un dinucleòtid CpG. Això fa pensar que aquest canvi podria tenir un origen únic i que posteriorment s'hauria extès a les diverses poblacions. Aquesta hipòtesi es podria comprovar mitjançant un estudi d'haplotips al voltant de les mutacions en individus no emparentats portadors dels canvis, però això encara no s'ha fet.

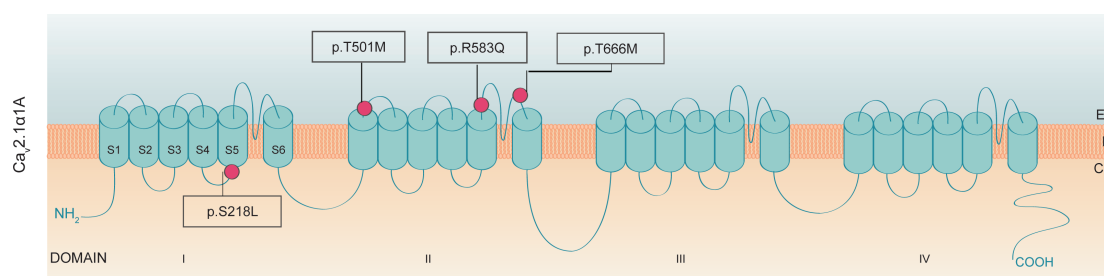


Figura 10. Subunitat $\alpha 1A$ del $Ca_v2.1$ codificada pel gen $CACNA1A$ i localització de les mutacions identificades en els pacients HM. Representació de la proteïna amb els dominis (DOMAIN I-IV) i els segments de cadascun (S1-6). Les mutacions s'indiquen amb cercles vermells.

Domain: domini; S: segment; ES: espai extracel·lular; M: membrana citoplasmàtica; Cyt: citoplasma

1.1.2. Ampliació del cribatge mutacional del gen $CACNA1A$

Durant anys, els treballs d'anàlisi mutacional del gen $CACNA1A$ s'han centrat en els exons del gen (48 en total) i els llocs de *splicing*. L'any 2009 s'analitzen per primer cop les regions 3'UTR i promotora del gen (Veneziano et al. 2009). En aquest estudi es descriu una mutació

a la regió promotora en un pacient amb HM, g.-757_-753delCTTTC, que determina un augment en l'activitat transcripcional del gen, tot suggerint que hi hauria un augment del nombre de canals a la membrana, i per tant un guany de funció. D'altra banda es descriu un nou exó (anomenat exó 48) en identificar dues isoformes expressades al cervell en què falta l'exó 47. En un pacient amb atàxia episòdica i en el seu pare detecten una inserció de 5 nucleòtids, g.38429_38430insCTTTT, en una regió altament conservada de l'exó 48. Aquesta mutació provoca l'aparició d'un codó de parada prematur a la isoforma curta. Tot i que es desconeix el nivell d'expressió d'aquestes isoformes i l'efecte de la proteïna truncada, els autors van suggerir que la inserció podria afectar d'altres isoformes altament expressades en cervell mitjançant canvis en l'estructura secundària de la regió 3'UTR. Aquesta extensió del cribratge mutacional es va aplicar a tots els pacients d'estudis anteriors del grup (Cuenca-Leon et al. 2008), amb resultats negatius.

1.1.3. Estudi de CNVs en el gen *CACNA1A*

L'ús de tècniques quantitatives, com MLPA i QMPSF, permet identificar reordenaments, delecions i duplicacions gèniques (vegeu l'apartat 2.2 de la Discussió per a més detalls). En el nostre treball vam estudiar tots aquells pacients que havien donat resultats negatius en el cribratge mutacional per seqüenciació Sanger, així com els pacients de la nostra sèrie anterior (Cuenca-Leon et al. 2008). En el nostre estudi no hem detectat reordenaments en cap dels pacients.

Aquest resultat és lògic, tenint en compte que en general els reordenaments donen lloc a proteïnes truncades i per tant no condueixen a un guany de funció del canal, típic de les mutacions dels pacients HM. Fins ara només s'ha descrit una deleción (dels exons 39-47) en un pacient SHM (Labrum et al. 2009), que desafiaria l'assumpció generalitzada que el fenotip HM va sempre associat amb un guany de funció, ja que es tracta d'un canvi disruptiu.

D'altra banda, un estudi de CNVs al gen *ATP1A2* sí que podria, potencialment, revelar delecions o duplicacions amb pèrdua de funció. Actualment s'està planificant un cribratge per detectar reordenaments en aquest gen en la sèrie de pacients HM.

1.2. Cribratge mutacional del gen *ATP1A2*

S'han identificat dues mutacions de canvi de sentit en el gen *ATP1A2* en una mostra de 18 pacients HM. Contràriament a les mutacions descrites en el gen *CACNA1A* en casos HM, en què generalment l'efecte funcional consisteix en un guany de funció, en el cas de les mutacions a *ATP1A2* el canvi acostuma a produir una pèrdua de funció del canal. Així doncs, el mecanisme responsable de la patologia seria l'haploinsuficiència. Tot i que les conseqüències funcionals de les mutacions HM sobre les proteïnes codificades per ambdós gens són contràries, l'efecte a nivell cel·lular és el mateix, ja que en els dos casos la disfunció porta a un augment del glutamat en l'espai sinàptic (Figura 8 de la Introducció) (Ferrari et al. 2015).

La mutació **p.Ala606Thr** ja s'havia descrit en tres casos anteriors amb HM (Jen et al. 2007, Riant et al. 2005). Està situada al llaç intracel·lular entre els dominis M4 i M5 de la bomba (Figura 11), on s'han identificat moltes de les mutacions. Diversos autors han dut a terme estudis funcionals en què s'observa una pèrdua de funció de la bomba de Na^+/K^+ , que perd afinitat pel potassi. D'altra banda, estudis amb ouabaïna (toxina inhibidora de la bomba de Na^+/K^+) també suggerien una pèrdua de funció (Jen et al. 2007, Tavraz et al. 2008).

El canvi **p.Glu825Lys** s'ha identificat per primera vegada en el nostre estudi. El canvi està situat al llaç entre els dominis M6 i M7 (Figura 11), on s'han identificat altres mutacions ja estudiades a nivell funcional (de Vries et al. 2007, Tavraz et al. 2008). En aquest cas vam realitzar un estudi funcional indirecte de supervivència cel·lular en cèl·lules epitelials de carcinoma cervical HeLa per assajar la patogenicitat de la mutació, dut a terme per la Dra. Corominas. Aquest assaig consisteix en l'avaluació de la viabilitat cel·lular en presència d'ouabaïna, un agent tòxic produïda per la liana *Strophanthus gratus*. Es transfecten cèl·lules en cultiu amb una construcció que conté un al·lel del gen *ATP1A2* portador dues variants (p.Gln116Arg i p.Asn127Asp) que confereix resistència a l'ouabaïna (pA2Oua-wt) (De Fusco et al. 2003) i, en paral·lel, es transfecten les cèl·lules amb la mateixa construcció però incorporant-hi la mutació detectada en el pacient HM (pA2Oua-wt + Glu825Lys). Els resultats mostren una viabilitat del 10% de les cèl·lules transfectades amb la construcció portadora de la mutació p.Glu825Lys, tot donant suport a la hipòtesi que la mutació provoca una pèrdua de funció. D'altra banda, les anàlisis amb *Western blot* mostren una banda feble per a la mutació, tot suggerint així que la proteïna resultant podria ser inestable (Figura 5 de l'article 1) i per tant recolzant l'haploinsuficiència com a mecanisme patogènic.

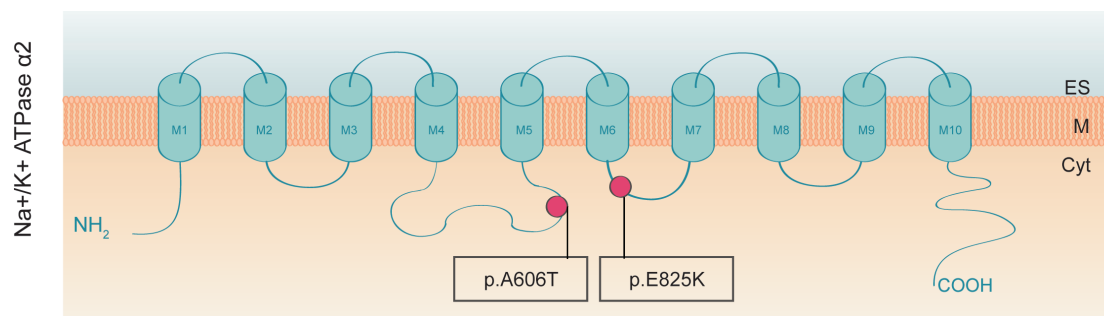


Figura 11. Subunitat $\alpha 2$ de la Na^+/K^+ ATPasa codificada pel gen *ATP1A2* i localització de les mutacions identificades en els pacients HM, indicades amb cercles vermells.

ES: espai extracel·lular; M: membrana citoplasmàtica; Cyt: citoplasma

1.3. El cribratge genètic en HM: altres gens candidats i regions no cobertes

Els gens *CACNA1A* i *ATP1A2* són els responsables de la majoria de casos HM en què s'han identificat mutacions. Per al primer gen s'han descrit més de 30 mutacions relacionades amb aquest fenotip, mentre que pel segon el nombre supera les 60 (de Vries et al. 2009a, Freilinger et al. 2011, Riant et al. 2010a). Malgrat això, l'anàlisi d'aquests dos gens no permet cobrir el diagnòstic genètic de tots els pacients HM. A més de *CACNA1A* i *ATP1A2* s'han

identificat mutacions HM en d'altres gens, que explicarien molt pocs casos. A més, aquests gens minoritaris s'han relacionat típicament amb altres fenotips neurològics diferents de la HM, i el casos d'individus HM amb mutacions presenten fenotips complexes amb quadres clínics amb més d'una malaltia.

Les mutacions en el gen **SCN1A** donen lloc a un total de 25 fenotips amb característiques epilèptiques (Claes et al. 2009, Gambardella & Marini 2009). Fins ara s'han descrit únicament cinc casos de pacients HM amb mutacions en aquest gen, alguns d'ells amb algun tipus d'epilèpsia (Castro et al. 2009, Dichgans et al. 2005, Gargus & Tournay 2007, Vahedi et al. 2009, Vanmolkot et al. 2007), mentre que hi ha més de 700 variants associades amb d'altres fenotips (Claes et al. 2009).

El gen **PRRT2** s'ha relacionat recentment amb HM. Tot i que s'ha analitzat en més de 240 pacients HM, només s'hi han descrit vuit mutacions (Cloarec et al. 2012, Dale et al. 2012, Gardiner et al. 2012, Marini et al. 2012, Riant et al. 2012). Les variants descrites en aquest gen estan relacionades amb casos de discinèsia paroxística cinesigènica i altres trastorns episòdics (Wood 2012).

Així doncs, **SCN1A** i **PRRT2** serien gens candidats només en aquells casos en què la migranya hemiplègica forma part d'un quadre clínic complex en què es combina amb altres trastorns neurològics. Un estudi previ del grup, en què es van analitzar les dues mutacions més prevalents descrites al gen **SCN1A** en una sèrie de 21 pacients HM (Cuenca-Leon et al. 2008) no va donar resultats positius. En general, els casos HM descrits amb mutacions en aquests gens són poc representatius com per ésser incorporats a la rutina de diagnòstic genètic. No obstant, cal tenir present la seva possible implicació en el fenotip HM en aquells pacients en què el cribratge dels gens **CACNA1A** i **ATP1A2** és negatiu.

Els dos gens restants responsables d'alguns casos HM són **SLC4A4** i **SLC1A3**. S'han descrit dues mutacions en homozigosi en el primer gen en dues famílies amb acidosi renal tubular, anomalies oculars i migranya hemiplègica (Demirci et al. 2006, Suzuki et al. 2010), i un únic cas HM en què **SLC1A3** (Jen et al. 2005) apareix mutat en un pacient que presenta hemiplegia, atàxia episòdica i convulsions. A causa de l'escassa representativitat d'aquests dos gens en HM, no s'han considerat en els nostres estudis.

Tant en les sèries descrites a la literatura com en les nostres, el percentatge de casos HM amb mutacions identificades continua essent baix, tot indicant que l'heterogeneïtat genètica d'aquesta malaltia és encara més extensa. Actualment els estudis de seqüenciació massiva d'exomes, ràpids i barats, podrien estar més indicats que la seqüenciació de gens candidats, ja que permeten identificar variants a escala genòmica sense la limitació i el cost comparativament més elevat que suposa l'elecció i seqüenciació de gens concrets. El nostre grup està col·laborant en l'actualitat en un projecte del Consorci Internacional de Genètica de les Cefalees (IHGC, *International Headache Genetics Consortium*), que es proposa seqüenciar l'exoma de desenes de pacients HM de tot el món. L'estudi inclou 11 pacients FHM i 20 SHM de la nostra sèrie que han donat resultats negatius en el cribratge genètic de **CACNA1A** i **ATP1A2**.

A part de la probable existència de gens HM encara no coneguts, podria ser que en alguns casos no resolts de la nostra sèrie les mutacions estiguin realment a *CACNA1A* o a *ATP1A2* però que no les haguem identificat. A nivell de regions codificants la cobertura és completa, amb tots els exons seqüenciats. S'han seqüenciat també les regions intròniques flanquejants, que inclouen els llocs d'*splicing*, i en el cas del gen *CACNA1A*, també les regions promotora i 3'UTR. Les regions reguladores, però, no s'han cobert en el cribratge d'*ATP1A2*, ni tampoc s'han analitzat les regions internes dels introns a cap dels dos gens.

D'altra banda, en el marc d'aquesta Tesi s'ha dut a terme un estudi de CNVs al gen *CACNA1A* (no en *ATP1A2*), tot i que era probable que no s'identifiqués cap alteració d'aquest tipus, ja que la pèrdua de funció que solen ocasionar els CNVs (especialment les delecions) no es correspondria amb el guany de funció característic de les mutacions HM al gen *CACNA1A* (les limitacions tècniques d'aquest estudi es detallen a l'apartat 2.2.1).

2. Anàlisi mutacional del gen *CACNA1A* en 49 pacients amb EA2

S'ha realitzat un estudi genètic exhaustiu del gen *CACNA1A* en una mostra de 49 pacients EA2 no emparentats. Dos dels pacients portadors de mutacions que s'han inclòs en aquest treball apareixien ja en altres publicacions del grup (Carreno et al. 2013, Cuenca-Leon et al. 2009a), i s'han inclòs en aquest estudi per tal de donar una visió completa de la sèrie de pacients EA2 analitzats per nosaltres. L'estudi genètic s'ha dut a terme mitjançant la seqüenciació dels exons, regions d'*splicing*, regió promotora i 3'UTR (veure apartat 1.1.2 de la discussió), que s'ha completat amb un estudi de CNVs per buscar reordenaments en el gen mitjançant les tècniques quantitatives MLPA i QMPSF. Es descriuen un total de 9 variants identificades en 10 dels pacients, cinc de les quals són noves, que cobreixen el 20,4% de la mostra, un percentatge similar a d'altres descrits en estudis previs (Mantuano et al. 2010, Rajakulendran et al. 2010). Cap de les variants apareix a les bases de dades de variants genòmiques (*Exome Variant Server database*, on s'han seqüenciat massivament 6503 individus). S'han descrit fins ara més de 80 mutacions en el gen *CACNA1A* en casos EA2, la gran majoria d'elles puntuals (Rajakulendran et al. 2012). No obstant, en els últims anys s'han publicat algunes deleccions que inclouen un o més exons del gen (Labrum et al. 2009, Riant et al. 2010b, Riant et al. 2008, Wan et al. 2011). Els efectes funcionals de les mutacions EA2 són habitualment de pèrdua de funció de la proteïna, al contrari que l'efecte típic de les mutacions responsables de HM, el guany de funció. Hi ha estudis que avalen aquest mecanisme, en què s'utilitzen models cel·lulars, tant cèl·lules de mamífer com de *Xenopus*, per a expressar el canal Ca_v2.1 portador de la mutació i assajar la seva patogenicitat (Jeng et al. 2008, Page et al. 2010, Wappl et al. 2002).

2.1. Anàlisi mutacional del gen *CACNA1A* per seqüenciació

Vuit de les variants s'han detectat per seqüenciació Sanger. D'aquestes, cinc prediuen la disrupció de la proteïna, ja sigui per un canvi sense sentit (p.Trp320Ter, p.Tyr1849Ter i p.Arg1857Ter, aquesta última present en dos dels pacients de la sèrie) o per deleccions d'un o dos nucleòtids que provoquen un canvi en la pauta de lectura donant lloc a un codó de parada prematur (p.Gly250GlufsTer60 i p.Gln681ArgfsTer100). Les altres tres són de canvi de sentit (p.Thr501Met i p.Gly638Asp, descrites amb anterioritat pel nostre grup, i p.Pro2222Leu).

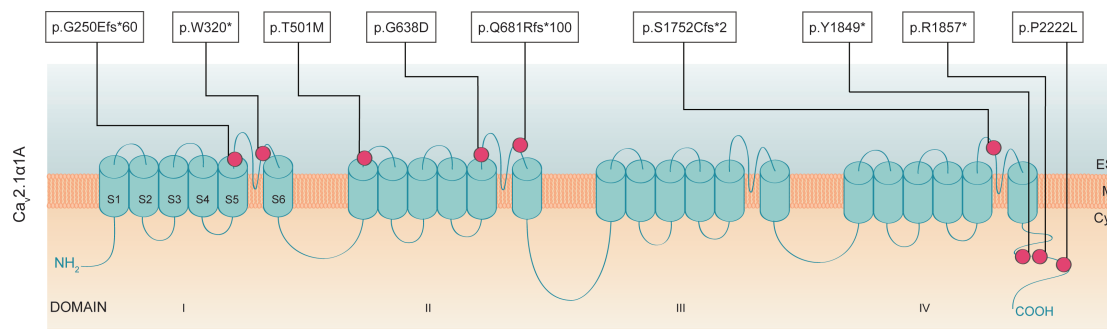


Figura 12. Subunitat $\alpha 1A$ del $Ca_v2.1$ codificada pel gen *CACNA1A* i localització de les mutacions identificades en els pacients EA2. Representació de la proteïna amb els dominis (DOMAIN I-IV) i els segments de cadascun (S1-6). Les mutacions s'indiquen amb cercles vermells.

Domain: domini; S: segment; ES: espai extracel·lular; M: membrana citoplasmàtica; Cyt: citoplasma

2.1.1. Mutacions sense sentit

En EA2 la majoria de les variants descrites prediuen la disrupció de la proteïna, i consegüentment la pèrdua de la seva funció. Tres dels cinc canvis es descriuen per primer cop en aquest treball: p.Gly250GlufsTer60, p.Trp320Ter i p.Tyr1849Ter.

La mutació **p.Gly250GlufsTer60** té l'origen en una deleció d'un nucleòtid (c.749delG) a l'exó 5 del gen. El canvi **p.Trp320Ter** és una mutació sense sentit a l'exó 6. A nivell de proteïna, ambdues estan situades al llaç extracel·lular entre els segments 5 i 6 del primer domini (Figura 12). Això donaria lloc a una proteïna que retindria únicament la regió N-terminal de polipèptid i gran part del primer domini. S'han descrit moltes mutacions, tant sense sentit com de canvi de sentit, en EA2 que se situen en els llaços extracel·lulars d'aquests dos segments de la proteïna, més freqüentment en els dominis 1, 2 i 4 (Mantuano et al. 2004). Això podria indicar que el llaç d'unió seria una regió clau que influeix en el funcionament adequat de la subunitat.

La mutació **p.Gln681ArgfsTer100**, a l'exó 16, s'ha descrit en tres ocasions (Denier et al. 1999, Kim et al. 2006, Mantuano et al. 2010, van den Maagdenberg et al. 2002) i està causada per la deleció de dos nucleòtids (c.2042-43delAG) que canvien la pauta de lectura. També està situada al llaç extracel·lular entre els segments 5 i 6, en aquest cas del domini 2 (Figura 12).

Les altres dues mutacions sense sentit, **p.Tyr1849Ter** i **p.Arg1857Ter** (l'última descrita per (Graves et al. 2008)), estan situades a l'exó 37 i donen lloc a una disrupció de la proteïna a la regió de la cua citoplasmàtica (Figura 12). L'exó 37 és la regió que codifica el domini d'unió a calci, de manera que a més d'aquest, a la proteïna li faltarien les regions IQ (domini d'interacció amb calmodulina *IQ-like*) i CBD (domini d'unió a calmodulina) (Soong et al. 2002).

2.1.2. Mutacions de canvi de sentit

S'han identificat tres mutacions de canvi de sentit a la mostra de 49 pacients amb EA2, una d'elles descrita en aquest treball per primer cop. En el cas d'aquest tipus de mutacions, la predicció dels efectes funcionals és més complex.

La mutació **p.Thr501Met** es descriu en aquest treball i en una publicació anterior del grup amb pacients HM (Carreno et al. 2013), ja que el pacient presenta a la vegada HM i EA2. Els estudis funcionals revelen un guany de funció del canal portador de la mutació, un efecte que sol atribuir-se el fenotip HM, oposat al que normalment va associat amb les mutacions responsables d'EA2. No és el primer cas en què un pacient presenta aquest dos fenotips. Així, a la secció 1.1.1 de la Discussió es descriu un pacient amb HM i EA2 que és portador de la mutació de guany de funció p.Arg583Gln. Curiosament, aquest pacient és l'únic membre de la família que té els dos fenotips, i la resta de familiars portadors del canvi tenen EA2. A més, s'han descrit pacients amb mutacions a *CACNA1A* i un fenotip que combina EA2 o HM i característiques neurològiques relacionades (p.ex. HM i atàxia progressiva (Ducros et al. 1999) o EA2 i migranya (Mantuano et al. 2010)). D'altra banda, la mutació p.Thr501Met s'ha descrit amb anterioritat en pacients EA2 (Mantuano et al. 2010). Aquesta controvèrsia és extensible a estudis funcionals realitzats en mutacions relacionades amb EA2 en què no s'observa disminució de la funció del canal (Rajakulendran et al. 2010). La causa genètica d'aquesta comorbiditat i els mecanismes patogènics que hi ha al darrere són de moment desconeguts.

La mutació **p.Gly638Asp** es va descriure i caracteritzar en un estudi previ del grup (Cuenca-Leon et al. 2009a). A nivell d'ADN, el canvi està situat a l'exó 14, i a nivell de proteïna cau en el llaç extracel·lular entre els segment 5 i 6 del domini 2 (Figura 12). L'anàlisi funcional de la mutació, que es va expressar en cèl·lules HEK293, va mostrar una reducció de les densitats de corrent de calci, un alentiment de la cinètica d'inactivació i un augment de la taxa de recuperació del corrent després de la inactivació. Els resultats concorden amb una disminució de la permeabilitat del canal pel calci i consegüentment amb una pèrdua de funció, cosa que és consistent amb els efectes d'altres mutacions descrites en pacients EA2.

La mutació **p.Pro2222Leu** es descriu en aquest article per primer cop. Malgrat l'interès potencial que té la seva caracterització funcional, no ha estat possible dur a terme els estudis pertinents de moment. En aquest cas només s'ha pogut avaluar el seu efecte *in silico* a través de programes de predicció, com SIFT (Kumar et al. 2009) o PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2013). En ambdós casos la mutació és predita com a benigna. Malgrat això, no està descrita com a variant polimòrfica a les bases de dades, cosa que fa pensar que no és un canvi freqüent. D'altra banda, cal tenir en compte que la mutació cosegrega a la família amb la malaltia, dada que jugaria a favor d'una relació causal amb la malaltia. No obstant, les dimensions petites de l'estructura familiar no donen força estadística a aquesta afirmació. El canvi està situat a l'exó 46, que codifica un segment de poli-prolines de la proteïna, que correspon a la cua citoplasmàtica (Figura 12). A diferència de les dues mutacions descrites a l'exó 37, aquesta mutació conserva els dominis d'interacció amb el calci. Tot i això, podria

afectar la conformació de la cua C-terminal, tot interferint així amb les interaccions entre la subunitat α 1 del canal i altres elements que s'hi uneixen, com ara les subunitats β auxiliars. La conseqüència final seria una pèrdua de funció del canal (Soong et al. 2002, Walker et al. 1998).

2.2. Anàlisi quantitativa del gen CACNA1A

En els darrers anys l'anàlisi mutacional del gen *CACNA1A* ha començat a incloure assajos de tipus quantitatiu, com la *Multiplex Ligation dependent Probe Amplification* (MLPA) (Labrum et al. 2009, Wan et al. 2011) o la *Quantitative Multiplex PCR of Short fluorescent Fragments* (QMPSF) (Riant et al. 2010b, Riant et al. 2008), que permeten identificar reordenaments genètics que donen lloc a delecions i duplicacions. L'ús d'aquestes tècniques resulta especialment interessant en el cas d'EA2, trastorn en què les conseqüències funcionals de les mutacions puntuals solen donar lloc a una pèrdua de funció. En general, és lògic imaginar que els reordenaments tindran aquest efecte. Les reorganitzacions genòmiques predominantss en EA2 són les delecions d'un o més exons, i no s'han descrit per ara casos de duplicacions, excepte en un individu amb diploia episòdica (Labrum et al. 2009). Cal recordar que hi ha un únic cas de SHM que presenta una delecio al gen *CACNA1A* que inclou diversos exons (Labrum et al. 2009). Considerant els casos EA2 en què ja s'han descrit delecions (fins ara 14 casos), sembla clar que cal incorporar a la rutina diagnòstica d'aquesta patologia l'anàlisi de CNVs, tot complementant l'anàlisi mutacional basat en la seqüenciació. Cal tenir en compte, però, que les rutines actuals encara deixen segments del gen sense analitzat, com les regions intròniques internes, i per tant pot haver-hi un cert nivell d'heterogeneïtat al.lèlica encara no ben caracteritzada.

2.2.1. MLPA vs. QMPSF

Totes dues tècniques tenen el mateix objectiu, però el seu funcionament és diferent. D'entrada, l'MLPA sol estar basada en l'ús de col.leccions de sondes pre-fabricades en forma de kits comercials que analitzen un número determinat d'exons d'un o més gens. En el nostre cas vam emprar el kit comercial SALSA-P279-A2 (MRC Holland, Amsterdam), que cobreix 24 exons del gen utilitzant 25 sondes (l'exó 1 compta amb dues sondes independents). Utilitza, a més, nou sondes control corresponents a diferents punts del genoma. Aquest primer punt, per tant, representa una limitació de l'anàlisi, ja que delecions o duplicacions en els exons no analitzats queden sense identificar. La gran avantatge que presenta aquesta tècnica és l'anàlisi dels 24 exons en una sola reacció, ja que es guanya molta eficiència en els estudis. D'altra banda, vam constatar una limitació en l'anàlisi dels resultats: el *software* recomanat pel fabricant, Coffalyzer v8, no permet l'exclusió de sondes particulars de l'anàlisi i algunes presentaven molta variabilitat, tant en casos de sondes del *CACNA1A* com en sondes control. Això va donar lloc a resultats ambigus per a alguns dels exons en alguns pacients (p.ex. l'exó 46).

L'altra tècnica que vam utilitzar va ser QMPSF, que es plantejà de forma complementària a l'MLPA. Aquests assajos es preparen en el propi laboratori i permeten fer un disseny experimental a mida. El nombre d'exons analitzats en cada assaig multiplex, però, està més limitat. En el nostre cas, cadascun dels quatre assajos consistia en l'anàlisi de quatre exons del gen CACNA1A i un fragment control corresponent al gen RNF20, situat al cromosoma 9. D'aquesta manera, entre les dues tècniques cobrim un mínim de 40 exons, 24 per MLPA i 16 per QMPSF, més del 80% del total. A l'hora de seleccionar els exons per a cada multiplex vam tenir en compte la distància d'aquests a l'exó immediatament anterior o posterior, i en aquells casos en què es trobaven a <1kb i l'intró intermedi no presentava elements repetitius (p.ex. seqüències Alu) vam considerar els exons adjacents coberts, ja que la probabilitat de recombinació entre aquests era molt baixa. De totes les sondes per a QMPSF que vam dissenyar, dues tenien una qualitat d'amplificació insuficient i es van descartar. Resumint, entre els exons analitzats per MLPA/QMPSF i els que consideràvem coberts de forma secundària totalitzaven 45 dels 48 exons del gen (vegeu la figura suplementària 1 de l'article 2). A l'hora de dur a terme els assajos de QMPSF vam topiar amb algunes limitacions tècniques: l'amplificació de diversos exons en una mateixa reacció afavoria l'amplificació dels de mida més petita (els fragments havien de tenir una diferència mínima de deu nucleòtids per assegurar una discriminació fiable), complicant així la interpretació dels resultats. Per tal de controlar la qualitat dels resultats obtinguts amb les dues metodologies, MLPA i QMPSF, vam incloure en tots els assajos dos controls EA2 positius per a delecions, cedits pel laboratori de la Dra. Riant. En resum, tot i que la cobertura gènica en conjunt és elevada, no podem descartar que haguem tingut algun fals negatiu.

2.2.2. Deleció de l'exó 35 en un pacient

Utilitzant la metodologia MLPA es va identificar una deleció a l'exó 35 del gen CACNA1A en un dels pacients (p.Ser1752Cysfs*2, Figura 12). Els exons anterior i posterior coberts per les sondes eren el 33 i el 38. L'exó immediatament distal (34), no cobert per cap sonda, era un dels que es van donar per coberts, ja que està situat molt a prop del 33. L'exó immediatament proximal (36) estava cobert en l'assaig QMPSF. Tot i això, vam dissenyar un nou grup de sondes per a confirmar la deleció mitjançant QMPSF, i hi vam incloure els exons 34, 35 i 36. Els resultats varen corroborar la deleció únicament de l'exó 35 en el pacient.

A continuació vam definir a nivell molecular els límits de la deleció. Els introns 34 i 35 contenen un gran nombre de repeticions de tipus SINE (*Short interspersed nuclear elements*, que inclouen seqüències Alu), LINE (*Long interspersed nuclear elements*) i d'altres. Vam dissenyar diferents parelles d'encebadors localitzats en diferents punts dels exons flanquejants i introns per tal d'amplificar per PCR les regions d'interès a partir de DNA genòmic del pacient i d'un control sa. La seqüenciació dels fragments va revelar que la deleció tenia l'origen en una recombinació entre dues seqüències Alu que compartien un regió idèntica de 36 nucleòtids (Figura 3 de l'Article 2). En estudis d'altres autors en què

també es caracteritzen deleccions identificades en pacients EA2 (Labrum et al. 2009, Riant et al. 2010b, Riant et al. 2008, Wan et al. 2011), s'han pogut acotar els límits d'algunes deleccions, que en alguns casos també eren el producte de recombinacions entre seqüències Alu. En d'altres, però, la delecció no implicava seqüències repetides (Riant et al. 2010b).

La majoria de punts de trencament descrits estan situats dins d'elements Alu, que afavoreixen els fenòmens de recombinació. En el gen CACNA1A les seqüències Alu es troben proporcionalment més representades que a la resta del genoma, tot ocupant fins a un 29,2% de la seqüència del gen (327 Alus) (Riant et al. 2010b). En conclusió, les recombinacions en el gen podrien veure's facilitades degut a l'elevat nombre de seqüències Alu presents.

2.3. Efectes a nivell cel·lular: Haploinsuficiència vs. dominància negativa

Els estudis funcionals duts a terme per assajar l'efecte de les mutacions en sistemes d'expressió heteròloga amb la forma mutant de la subunitat del canal solen revelar una pèrdua de funció total o parcial. En el cas de les mutacions que condueixen a la síntesi d'una proteïna truncada, és fàcil predir que la subunitat no serà funcional. Cal tenir en compte, però, que a nivell cel·lular l'efecte d'aquestes alteracions podria seguir dos camins: a) l'haploinsuficiència, on només la proteïna completa exerciria la seva funció a la membrana, i la forma truncada sovint patiria un procés de degradació a nivell d'mRNA (mitjançant *nonsense mediated RNA decay* (NMD)) o a nivell de proteïna; o b) la proteïna truncada se sintetitzaria i aquesta molècula exerciria un efecte dominant negatiu, pel qual probablement competiria per la interacció amb les altres subunitats del canal impeding-ne el funcionament normal, o impediria que la subunitat WT arribés a la membrana. En el cas de les mutacions EA2 de canvi de sentit no es produiria NMD, i per tant caldria fer assajos a nivell de proteïna per determinar el tipus d'efecte (haploinsuficiència o dominància negativa) que té lloc.

En un model animal de ratolí portador d'una mutació sense sentit al gen *Cacna1a* murí publicat per (Veneziano et al. 2011) s'aborda aquesta qüestió mitjançant l'estudi dels nivells d'mRNA produïts per la forma WT i la mutada. Per al model mutant heterozigot, que seguiria teòricament el mateix patró de dominància dels pacients, s'observa una disminució dels nivells d'mRNA acompanyats d'una inhibició del 50% del corrent. No obstant, el model no presentava anormalitats aparents en el fenotip. En el nostre estudi, ja que disposàvem de fibroblasts del pacient 432B portador de la mutació p.Trp320Ter, vam realitzar un assaig de NMD per avaluar la possible degradació de l'mRNA. Vam comparar els nivells de cDNA de les cèl·lules tractades i no tractades amb cicloheximida, un inhibidor del procés, i els resultats van mostrar la presència dels dos transcrits, normal i mutant, a la cèl·lula, indicant que el procés no es produïa o que era parcial. S'ha de tenir en compte, d'una banda, que no totes les mutacions que generen un codó de parada prematur estan subjectes a aquest procés, ja que la parada ha d'estar abans de l'últim exó i a més la distància de la mutació a l'extrem 3' del propi exó ha de ser superior a 50 nucleòtids (Lewis et al. 2003). Així, la mutació

p.Trp320Ter només compleix la primera condició, ja que el canvi està situat a només 20 nucleòtids de l'extrem 3' de l'exó 6. D'altra banda, la tècnica de PCR no és quantitativa i la representació dels dos al·lels no necessàriament reflexa les de la cèl·lula. En aquest cas, tot i que seria interessant l'ús de tècniques qualitatives com la qPCR, la presència de l'al·lel mutant ens permet determinar que, com a mínim, el mecanisme no es dona totalment. L'altra hipòtesi que s'ha plantejat al llarg dels anys i sembla que ha anat agafant més força és la de la dominància negativa com a conseqüència de l'expressió dels al·lels disruptius. S'han fet servir diferents models cel·lulars per avaluar l'efecte de les mutacions sense sentit. En l'estudi de (Wapfl et al. 2002) s'avalua l'expressió de la mutació p.Arg1279Ter en cèl·lules en cultiu tsA-201, procedents de ronyó embrionari humà, en què observen que la forma mutada s'expressa, però que no forma canals funcionals. Més endavant, en els treballs de (Page et al. 2004) i (Mezghrani et al. 2008) s'observa que la subunitat mutada exerceix dominància negativa sobre la forma WT del canal en expressar-les simultàniament. Altres estudis, com el de (Jeng et al. 2008), opten també per la coexpressió de la subunitat WT i la mutada a més de l'estudi de les dues formes per separat. Els al·lels portadors de mutacions s'expressen però no arriben en la seva totalitat a la membrana, i observen que la presència de la proteïna truncada afecta el tràfic cel·lular mitjançant un augment en la retenció a reticle de la forma WT. En un estudi més recent de (Page et al. 2010) es descriu la regió mínima necessària perquè es produeixi l'efecte de dominància negativa, que correspon a l'extrem N-terminal de la proteïna.

En el nostre treball, les mutacions que provoquen la disrupció de la proteïna serien candidates a tenir un efecte de dominància negativa, ja que totes elles mantenen l'extrem N-terminal de la proteïna intacte. Tot i això, no podem descartar que el procés de NMD es doni en algun dels casos, la qual cosa donaria suport a un mecanisme patològic d'haploinsuficiència.

2.4. Heterogeneïtat genètica no al·lèlica en EA2

En els casos d'EA2, a més de l'heterogeneïtat genètica al·lèlica que es fa patent amb les més de 80 mutacions descrites fins ara, el gen *CACNA1A* no aconsegueix explicar la totalitat dels casos, i la cobertura del seu cribratge està al voltant del 25% a les sèries de pacients publicades. A diferència dels casos HM, no es coneixen encara altres gens responsables del fenotip EA2, tot i que l'existència d'heterogeneïtat genètica no al·lèlica és evident. La manca de gens candidats alternatius dificulta molt el diagnòstic genètic en aquells pacients en què l'estudi del gen *CACNA1A* dona resultats negatius. Per aquesta malaltia, doncs, la opció de la seqüenciació massiva d'exomes representaria l'alternativa més adient.

3. Correlacions genotip-fenotip no resoltes

En la majoria de casos en què s'han identificat mutacions al gen *CACNA1A* hi ha una correlació clara entre genotip i fenotip, que té com a base les conseqüències funcionals de les alteracions moleculars: els casos HM presenten mutacions que provoquen un guany de funció, i els casos EA2 van associats amb una pèrdua de funció. Hi ha, però, casos com els de la mutació p.Thr501Met i p.Arg583Gln en què un pacient amb una mutació concreta presenta ambdós fenotips, HM i EA2. No hi ha encara una explicació clara per a aquest fenomen, que és un tema de debat obert.

En un treball de (Ducros et al. 2001) s'incideix sobre aquesta qüestió, i es planteja que el fenomen podria tenir relació amb el grau de penetrància de les mutacions a les diferents patologies. D'altra banda, qüestionen les diferències de les propietats del canal in vivo, que podrien ser diferents a l'escorça (estructura relacionada amb la HM) i al cerebel (estructura relacionada amb EA2). Per exemple, el guany de funció en l'activitat del canal en determinats models animals knock-in sembla que afavoreix la sinapsi excitadora però no la inhibidora a l'escorça. Així doncs, una mateixa mutació podria desembocar en diferents efectes funcionals segons el teixit o tipus cel·lular particular on està present, i això complica l'extrapolació dels resultats dels estudis obtinguts en cultius cel·lulars.

CAPÍTOL 2. Estudi genètic de la migranya comuna: estudis d'associació cas-control

1. La migranya comuna

1.1. Consideracions clíniques i genètiques

La migranya comuna és una malaltia d'etiologia complexa, en què factors genètics i ambientals contribueixen a l'aparició dels episodis.

Una de les controvèrsies més debatudes per la comunitat científica en relació a la migranya és si la MO i la MA són o no el mateix trastorn. La diferència principal entre els dos subtipus de migranya és la presència o absència d'aura, mentre que la fase de cefalea pot ser clínicament idèntica. La hipòtesi 'separadora' neix de les diferències observades a diferents nivells en els pacients: els pacients MA experimenten canvis en el flux sanguini durant la fase de l'aura similars als que s'observen en models animals de CSD (Olesen et al. 1990), i el risc relatiu de patir MA o MO en els familiars de primer grau d'un pacient és diferent segons si aquest té MA o MO (Russell et al. 2002).

Però també hi ha evidències que sostenen que MA i MO són diferents expressions clíniques d'un mateix trastorn amb una component genètica comuna (Nyholt et al. 2004). Clínicament, molts pacients MA presenten episodis MO al llarg de la seva vida, ja siguin de manera alterna o en diferents fases. D'altra banda, els dos subtipus de migranya apareixen tot sovint en una mateixa família, i hi ha pacients que presenten majoritàriament un subtipus o l'altre en funció de l'edat. Això fa pensar que hi hauria una activació selectiva dels mecanismes responsables de l'aparició de determinats símptomes, deguda per exemple a fluctuacions hormonals o a factors ambientals (Ferrari et al. 2015). Aquesta hipòtesi es veu reforçada pels estudis genètics que mostren les similituds entre les mostres MO i MA (Anttila et al. 2010). Des del punt de vista del tractament de la migranya, els fàrmacs emprats en tractaments aguts i profilàctics no diferencien entre els dos subtipus, un indicatiu de que MO i MA comparteixen mecanismes fisiològics en el transcurs dels episodis. Així que encara que clínicament no són idèntiques, fisiopatològicament presenten moltes característiques comunes, i referenciar-les com a dues entitats independents és una visió que ha anat perdent força amb el temps.

S'han de considerar, però, les particularitats. Des del punt de vista de la base genètica de la migranya com a malaltia complexa, la MA sembla que té una càrrega més gran que la MO (Anttila et al. 2013), i a l'hora d'estudiar els factors genètics, com ara les variants de susceptibilitat, la divisió de la mostra pot revelar algunes de les diferències entre els dos subtipus. La prevalença de les dues entitats clíniques també presenta diferències. MO és la forma més comuna de migranya, mentre que MA afecta només a un terç dels malalts migranyosos. Això fa pensar que en l'arquitectura genètica de la MA podrien tenir un pes

més gran variants més penetrants de menor freqüència (Figura 9 de la Introducció). No obstant, fins ara l'estudi de la migranya comuna s'ha centrat majoritàriament en les variants comunes de susceptibilitat, i per tant tot queda de moment en el terreny de l'especulació.

1.2. El diagnòstic oficial de l'IHS-ICHD

La classificació oficial de l'ICHD-II, que ha estat l'emprada en els nostres estudis, contempla els dos subtipus de migranya dins del primer grup de cefalees primàries (Taula 1 de la Introducció). El conjunt de cefalees primàries inclou també la cefalea tensional, la cefalea en acúmul i altres cefalees trigeminals autonòmiques i un últim grup d'altres cefalees primàries (International Headache Society (IHS) 2004). Entre els pacients migranyosos és relativament freqüent l'aparició d'alguns altres tipus de cefalea primària a més de la migranya. Dins la migranya, tal com ja hem comentat, el diagnòstic contempla que un individu amb MO pugui experimentar episodis d'MA, i viceversa. Així doncs, alguns dels tipus de cefalees tenen de fet un caràcter continu i solapat. Per exemple, per a considerar que un individu té MA, aquest ha d'haver patit un mínim de dos episodis d'aura amb cefalea migranyosa, però pot presentar també episodis MO, que no l'exclouen d'ésser classificat dins el grup de les MA. Serà relativament fàcil, doncs, que un individu pateixi els dos subtipus migranyosos, però seguirà classificat en un únic subgrup.

La divisió entre els tipus i els subtipus ofereix una possibilitat de diagnòstic de caràcter més acurat i universal. D'aquesta manera, les poblacions de pacients són més fàcilment comparables.

1.3. Homogeneïtat i heterogeneïtat fenotípica en la malaltia complexa

La homogeneïtat clínica de la població a estudiar és un punt clau en l'estudi de les causes de les malalties complexes, que en el cas de la migranya se centren de moment en la identificació de variants genètiques comunes de susceptibilitat. La inclusió de diferents fenotips incrementa notablement l'heterogeneïtat de la mostra, i això pot conduir a l'obtenció de falsos negatius.

En el cas de la migranya cal tenir en compte que els criteris diagnòstics de l'ICHD (International Headache Society (IHS) 2004) estan basats en supòsits clínics i no fisiopatològics, cosa que pot complicar la identificació dels factors genètics de risc subjacents. És evident que les subdivisions clíniques són fins a un cert punt arbitràries, perquè no estan basades en el coneixement de l'etiologia del trastorn, i per tant és molt probable que a mesura que avanci el coneixement sobre les causes de la migranya comuna, s'estableixin nous llindars en les classificacions. Malgrat tot, la subdivisió MA versus MO és un punt de partida interessant que cal considerar en els estudis genètics, tot i que en paral·lel cal estudiar també els grups de pacients de forma conjunta.

L'aparició de l'episodi migranyós també està condicionada per factors ambientals, tal i com indiquen els estudis d'heretabilitat, que poden alterar l'expressió del fenotip i conseqüentment, el diagnòstic. A més, determinats factors ambientals podrien actuar sobre el genoma tot modulant l'expressió de gens de risc a través d'intermediaris epigenètics. Fins ara els estudis d'associació amb gens candidats o a escala genòmica no han tingut en compte els factors ambientals i la seva interacció amb el genoma (GxE), i això podria haver 'tapat' alguns gens de susceptibilitat.

És interessant, arribats a aquest punt, diferenciar entre els dos tipus de poblacions de migranyosos que es presenten als estudis: les de tipus clínic, reclutades en l'àmbit hospitalari, i les de tipus poblacional, recollides a partir de cribratges de població general. En les primeres tots els pacients han estat inclosos/exclusos de l'estudi a través d'entrevistes diagnòstiques directes amb personal clínic especialitzat; a les mostres poblacionals, en canvi, els individus són diagnosticats generalment amb qüestionaris més curts i no solen passar una entrevista detallada amb personal clínic (Ligthart et al. 2011), tot reduïnt la precisió del diagnòstic i, de retruc, l'homogeneïtat de la mostra i potser les probabilitats de detectar associacions. En els estudis de tipus clínic, en què el diagnòstic dels pacients és exhaustiu i dut a terme per metges especialitzats, alguns autors van un pas més enllà i també subclassifiquen el grup MA en dos (Anttila et al. 2010): pacients que únicament pateixen episodis amb aura (o són molt representatius, d'ara endavant anomenats "*MA only*") i pacients que presenten episodis amb i sense aura en una proporció més equilibrada (en endavant "*Both MA and MO*"). Cal tenir en compte que les divisions permeten homogeneïtzar molt més la mostra, però d'altra banda les subpoblacions resultants seran més petites, limitant així el poder estadístic de l'estudi.

2. Els estudis d'associació cas-control

2.1. Objectiu dels estudis d'associació

Els estudis d'associació cas-control tenen com a objectiu identificar factors genètics comuns de susceptibilitat mitjançant la comparació de la freqüència d'al·lels, genotips o haplotips entre un grup de pacients i un grup de controls.

En la migranya, entesa com una malaltia comuna en què els factors genètics jugarien un paper etiològic important, s'han considerat especialment les variants comunes del genoma, de les quals s'espera una contribució individualment petita (però globalment important) al fenotip. Les diferències estadísticament significatives en la distribució de les variants a les dues poblacions que s'estudien són indicatives de la participació de la variant en el fenotip. És per això important partir d'un bon disseny que permeti cobrir les variants candidates clau i que estudiï una població ben definida i suficientment dimensionada per tal de maximitzar la probabilitat d'identificació de les variants de risc.

2.2. Consideracions generals sobre els estudis d'associació

El disseny dels estudis d'associació de tipus cas-control tenen diverses limitacions que són inherents a la metodologia. D'entrada, hi ha els errors de tipus I (falsos positius) i de tipus II (falsos negatius), consistents en rebutjar la hipòtesi nul·la quan és certa o acceptar la hipòtesi nul·la quan aquesta és falsa, respectivament. Detectem per tant associacions no reals o no detectem les que ho són.

Un factor clau a considerar a l'hora de dissenyar l'estudi és el poder estadístic (el complementari de l'error de tipus II), que és la probabilitat de detectar una associació en el cas que aquesta existeixi realment. Aquí juga un paper molt important la grandària de la mostra, de la qual depèn directament el poder estadístic (Zondervan & Cardon 2004): una mida mostral petita pot, fins i tot, impedir la detecció de resultats en teoria robustos, i una mida mostral molt gran pot a vegades ser insuficient per detectar variants de susceptibilitat amb una contribució molt subtil al fenotip. És a dir, la mida de l'efecte (l'impacte fenotípic d'una variant), generalment desconeguda *a priori*, és el factor principal que determina si una determinada grandària mostral és suficient o no per detectar associacions.

No només la mida de l'efecte és important a l'hora de definir quina és la probabilitat d'obtenir resultats fiables en un estudi d'associació. Els estudis d'associació, gràcies als avenços tecnològics en la genotipació, tendeixen a analitzar un nombre cada cop més gran de variants. Això fa que augmenti el nombre de comparacions que es fan i, per tant, la probabilitat de cometre errors de tipus I. Quan els estudis analitzen més d'una variant, o utilitzen més d'un model genètic o grup d'anàlisi, cal augmentar l'astringència del llindar de significació (α) mitjançant les correccions per comparacions múltiples. En els articles 4, 5 i 6 d'aquesta Tesi s'ha utilitzat el mètode de correcció de Bonferroni, que assumeix

independència entre tests. El problema és que en alguns casos els tests no són del tot independents (p.ex. quan alguns dels SNPs estan en desequilibri de lligament entre ells o quan els diferents subgrups clínics considerat presenten solapaments). Això fa que aquesta correcció acabi resultant excessivament rigorosa. La correcció de Bonferroni consisteix a establir un nou llindar de significació (α') que té en compte el nombre total de tests realitzats (variants, models genètics o grups clínics, n), de tal manera que $\alpha' = \alpha/n$, on $\alpha = 0,05$. El mètode assegura una probabilitat d'error de tipus I inferior al 5%, tot i que la seva elevada astringència pot condicionar l'augment dels falsos negatius o errors de tipus II. Un altre mètode corrector fa servir les permutacions. A diferència de l'anterior, aquest ajusta el P-valor realitzant simulacions amb les dades genotípiques, a les quals s'assigna el fenotip de manera aleatòria tot generant dades que compleixen la hipòtesi nul·la de no associació. L'avantatge d'aquest mètode és que pot aplicar-se tant quan els tests són independents com quan estan relacionats. En el cas de l'article 5 s'ha emprat aquest mètode. Un tercer mètode és la taxa de falsos descobriments (*False Discovery Rate*, FDR), que calcula la proporció de resultats falsos positius entre tots els resultats positius obtinguts, considerant la distribució dels nivells de significació assolits com un tot i discriminant entre la hipòtesi nul·la i aquells valors que se'n desvien, ajustant així el nivell de significació. A l'Apèndix 1 s'ha emprat aquest mètode. (Abou-Sleiman et al. 2006, Colhoun et al. 2003, Curran-Everett 2000, Gordon & Finch 2005).

3. Estudis d'associació en migranya

Fins ara l'estudi de les malalties complexes s'ha recolzat principalment en els estudis d'associació i, per tant, en la identificació de variants genètiques de risc freqüents a les poblacions. Fins fa pocs anys tots els estudis d'associació se centraven en l'anàlisi de gens candidats, procurant maximitzar una bona cobertura gènica a partir dels patrons de desequilibri interns.

El paradigma que s'ha utilitzat fins ara en els estudis sobre la base genètica de la migranya ha estat el de malaltia comuna-variant comuna (*Common Disease - Common Variant*, CDCV, Figura 9 de la Introducció), que implica que moltes variants genètiques freqüents a les poblacions serien les implicades en el fenotip, cadascuna d'elles amb una contribució individual petita. Darrerament, però, ha anat creixent l'interès en l'estudi de la possible contribució de les variants rares a les malalties comunes (*Common Disease - Rare Variant*, CDRV), que tindrien una contribució individual més important en el fenotip. Aquesta nova onada de pensament, però, no ha arribat encara a l'estudi de la migranya comuna, trastorn en què els estudis d'associació, i per tant les variants comunes, encara tenen molt camí per recórrer. Gairebé tot el que s'ha fet està relacionat amb variacions de tipus SNP, amb múltiples *loci* associats, però també amb força resultats controvertits i rèpliques no sempre positives (vegeu l'apartat 3.2 de la introducció).

Són dos els tipus d'estudis d'associació cas-control que s'han dut a terme en migranya fins ara: amb gens candidats (*Candidate Gene Association Studies*, CGAS) i a escala genòmica (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS). Els primers parteixen de la hipòtesi que les variants de susceptibilitat estan situades en *loci* gènics implicats en la fisiopatologia de la migranya. D'aquí han sorgit estudis centrats en els diferents sistemes de neurotransmissió o en gens que codifiquen canals neuronals. En contraposició, els GWAS permeten analitzar variants de tipus SNP distribuïdes per tot el genoma, sense presuposar la implicació de gens particulars, i permetent així la identificació de molècules o sistemes funcionals que *a priori* no entrarien en les apostes. El principal problema que plantegen aquests estudis, però, és que la mostra ha de ser suficientment gran per compensar l'elevat nombre de tests que es realitzen (solen analitzar-se de l'ordre d'un milió de SNPs), que fan necessari superar valors de significació inferiors a 5×10^{-8} .

3.1. Estudis d'associació a gran escala: GWAS

3.1.1. Primer GWAS en migranya i estudi de rèplica

L'any 2010 l'*International Headache Genetics Consortium* (IHGC) va publicar el primer GWAS realitzat en pacients amb migranya. La població clínica original incloïa 2731 pacients MA i 10747 controls (Anttila et al. 2010). La variant associada, l'SNP rs1835740G>A, va assolir un P-valor = $5,38 \times 10^{-9}$. Es va dur a terme un estudi de rèplica en quatre poblacions europees independents, amb un total de 3202 casos i 40062 controls, que incloïa pacients

MA i MO. Aquesta anàlisi va donar associacions nominals en diversos subgrups en tres de les poblacions, i la meta-anàlisi posterior mostrava associacions positives per a tots els grups analitzats, essent el grup "*all migraine*" (que incloïa tots els pacients) el que presentava un P-valor amb significació a escala genòmica. L'efecte és consistentment més fort en el grup de "*MA only*" que en la resta de subgrups a la meta-anàlisi.

Aquest SNP està situat al cromosoma 8q22.1, entre dos punts calents de recombinació, i no presenta desequilibri de lligament amb cap variant en un rang de 5Mb, tot suggerint que es tracta de la variant causal. La variant és intergènica i està situada entre dos gens: *MTDH* (que codifica la metadherina) i *PGCP* (codifica la carbopeptidasa Q). Els autors van dur a terme estudis d'eQTL (expression Quantitative Trait Locus, una anàlisi in silico de loci del genoma que regulen l'expressió d'altres gens) que van suggerir que aquesta variant tenia un efecte en cis sobre l'expressió del gen *MTDH*, essent l'al·lel de risc A l'associat amb nivells d'expressió més grans. L'*MTDH* codifica una proteïna reguladora que inhibeix l'expressió del gen *SLC1A2*, un gen que codifica un transportador de glutamat (Lee et al. 2011). Un possible efecte seria l'acumulació del glutamat, neurotransmissor excitador per excel·lència, a l'espai sinàptic, afavorint així el fenomen de la CSD, altament relacionat amb l'aura migranyosa (Anttila et al. 2011).

És per això que des del nostre grup vam dur a terme un estudi de rèplica amb l'objectiu de validar els resultats de l'estudi original en una població independent (Article 3 d'aquesta tesi). La nostra mostra clínica de migranya consistia en més de 1500 pacients (que configuraven el grup *All migraine*) i prop de 1400 controls. Dels pacients, un 62% eren MO i un 38% MA. Dins del grup MA disposàvem d'informació clínica detallada de la majoria dels pacients per fer la mateixa subdivisió que en l'estudi GWAS original, donant lloc a dues subpoblacions d'uns 300 (*MA only*) i uns 150 (*Both MA and MO*) pacients. En l'estudi no vam identificar associació entre l'SNP i cap dels grups clínics analitzats. Cal tenir en compte que la nostra mostra és molt més petita que la de l'estudi original (2731 pacients MA), tot i que el poder estadístic superava el 87%. Una possible causa de la no replicació dels resultats podria tenir l'origen en les proporcions de sexe a les mostres: en el GWAS la relació homes:dones era diferent en casos i en controls (1:4 i 1:1, respectivament), mentre que en el nostre estudi era de 1:4 a les dues poblacions. Considerant les diferències en la prevalença de la migranya, que afecta més a les dones (relació aproximada de 1:3), i suposant que la variant de risc fos més freqüent en dones que en homes, aquesta podria estar infrarepresentada en els controls de l'estudi original, afavorint així diferències en la distribució. D'altra banda, hem observat diferències en la MAF dels nostres controls respecte als de l'estudi original, essent aquesta més gran al nostre estudi. Un últim factor a tenir en compte que podria explicar les diferències és la pròpia població objecte d'estudi, i aquí caldria considerar el possible efecte de factors ambientals específics de les poblacions i el nivell d'exposició. No és estrany que les poblacions separades divergeixin entre elles en la freqüència al·lèlica o genotípica per deriva genètica o flux genètic. Fins i tot algunes posicions que són polimòrfiques en

determinades poblacions no ho són en d'altres, on poden ser monomòrfiques.. Així doncs, per diferents motius, el paisatge genètic de la malaltia no té perquè ser constant a les diferents poblacions. És més plausible pensar que hi ha una combinació de factors genètics de risc que poden ser compartits, i alguns altres específics, determinats per particularitats històriques, fenòmens d'endogàmia, efecte fundador i deriva genètica o interaccions amb l'ambient, entre d'altres factors. Així, malgrat que molts estudis de rèplica no mostren resultats positius en altres poblacions, això no descarta necessàriament la seva validesa a la població original.

Des que es publicà aquest primer treball GWAS en migranya, d'altres grups a més del nostre han intentat replicar l'associació amb l'SNP rs1835740 (Anttila et al. 2013, Chasman et al. 2011, Esserlind et al. 2012, Freilinger et al. 2012), i només un l'ha pogut replicar en una mostra índia (Ghosh et al. 2013), mentre que un altre s'ha obtingut un resultat nominalment significatiu en una mostra sueca (Ran et al. 2014).

3.1.2. Altres GWAS en migranya

Des del primer GWAS en migranya publicat l'any 2010, s'han dut a terme més de 20 estudis a escala genòmica en altres poblacions, alguns d'ells en forma de meta-anàlisi tot combinant algunes de les poblacions estudiades prèviament (Anttila et al. 2013). D'aquests, només tres han aportat resultats estadísticament significatius, els detalls dels quals es presenten a l'apartat 3.2.2 de la Introducció. A continuació es presenta un resum dels SNPs associats i els gens que s'hi relacionen.

3.1.2.1. El segon GWAS

Aquest estudi de (Chasman et al. 2011) va consistir en l'anàlisi d'una població de descoberta de més de 5000 pacients i uns 18000 controls del *Women's Genome Health Study*, i tres poblacions de rèplica la *Dutch Genetic Epidemiology of Migraine study* (GEM; amb 774 migranyosos i 942 controls), la procedent del *German Study of Health in Pomerania* (SHIP; 306 pacients i 2260 controls), i també la població clínica de l'IHGC (2748 pacients i 10747 controls).

Es van detectar associacions significatives a la meta-anàlisi amb els SNPs rs2651899 (al primer intró del gen *PRDM16*), rs11172113 (al primer intró del gen *LRP1*) i rs10166942 (a 950bp a 5' del lloc d'inici de transcripció del gen *TRPM8*).

El gen ***PRDM16*** (*PR Domain Containing 16*) no sembla que tingui *a priori* una clara connexió amb la migranya, tot i que l'associació s'ha replicat ja en diversos estudis (An et al. 2013, Fan et al. 2014, Ghosh et al. 2013, Ghosh et al. 2014, Ran et al. 2014, Sintas et al. 2014). Sí que s'ha relacionat amb malalties cardíques (*Nonsyndromic Left Ventricular Noncompaction Cardiomyopathy*, LVNC, i *Dilated Cardiomyopathy*, DCM) (Arndt et al. 2013), en què s'ha descrit la translocació recíproca (t(1;3)(p36;q21)) que té un punt de trencament al

cromosoma 1, prop del gen *PRDM16*. Considerant la comorbiditat existent entre la migranya i les cardiopaties, aquest gen seria un bon candidat per als futurs estudis de migranya.

El gen ***LRP1*** (*Low density Lipoprotein Receptor-related Protein 1*), expressat en molts teixits que inclouen el cervell i el sistema vascular, és un dels encarregats de modular la transmissió sinàptica (Lillis et al. 2008). La proteïna està present a les neurones i interactua amb els receptors NMDA de glutamat. En aquest cas, s'estableix una relació directa entre el gen candidat i el glutamat, un neurotransmissor que té molta relació amb la fisiopatologia de la migranya.

L'última de les variants associades està situada prop del gen ***TRPM8*** (*Transient Receptor Potential cation channel, subfamily M, member 8*), anteriorment relacionat amb la migranya (Huang et al. 2012). S'expressa en neurones sensorials i ganglionars i és un dels gens que s'utilitza com a diana en estudis amb models animals de dolor neuropàtic (Cortright et al. 2007). Les associacions amb aquest gen reforcen la connexió entre la migranya i les vies de dolor neuronals.

3.1.2.2. GWAS del consorci IHGC en pacients MO

Es va publicar un tercer GWAS l'any 2012 (Freilinger et al. 2012) que permeté detectar diverses variants genètiques de risc. El nostre grup hi va participar en la fase de rèplica amb una mostra de pacients i controls espanyols. Aquesta mostra incloïa 837 pacients MO, recollits entre els anys 2002 i 2010 a l'Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH) i 971 controls adults no migranyosos també recollits a l'Hospital Vall d'Hebron (donants de sang, acompanyants de pacients migranyosos no emparentats amb ells o pacients de Serveis no relacionats amb Neurologia) entre el 2006 i el 2010. Casos i controls estaven aparellats per sexe (un 75% de dones) i també ètnicament. Mitjançant entrevistes personals vam excloure aquells controls que presentaven història familiar de migranya o d'episodis severos de cefalea en parents de primer grau. A més, els controls havien de ser espanyols i pertànyer a famílies d'ètnia caucàsica d'un mínim de tres generacions.

L'estudi amb la mostra de descoberta (una població clínica de 2326 i 4580 controls) només va donar resultats d'associació amb significació a escala genòmica al gen *MEF2D*, tot i que 11 *loci* més contenien SNPs que presentaven nivells d'associació nominals amb P -valors $< 10^{-5}$. Es van seleccionar els 18 SNPs continguts en aquests 12 *loci* per a la fase de rèplica. A més d'aquests, també es van analitzar les variants identificades als dos primers GWAS. A l'estudi de rèplica, 8 SNPs mostraven valors d'associació nominal i la meta-anàlisi de l'estudi de descoberta i el de rèplica va mostrar valors d'associació significatius a nivell genòmic per a 5 de les 8 variants: rs1050316 i rs3790455 (a la regió 3'UTR de *MEF2D*), rs7640543 (200bp a 5' de *TGFBR2*), rs9349379 (*PHACTR1*) i rs6478241 (*ASTN2*). En l'estudi addicional de rèplica de positius anteriors es van detectar associacions amb els gens *LRP1* i *TRPM8* tant en la fase de rèplica com en la meta-anàlisi.

El gen **MEF2D** (*Myocyte Enhancer Factor 2D*) codifica un factor de transcripció molt expressat en cervell. Regula la diferenciació neuronal tot reforçant la supervivència de les neurones de nova formació (Lin et al. 1996). L'activació neuronal dependent de l'activitat de **MEF2D** restringeix el nombre de sinapsis excitadores. Així, es podria especular que en el cas de la migranya la desregulació del procés podria afectar la neurotransmissió excitadora dels pacients, rebaixant d'alguna forma el llindar d'hiperexcitabilitat. És interessant constatar que diverses malalties neurològiques, com l'epilèpsia, s'han relacionat amb dianes per al factor de transcripció **MEF2D** (Flavell et al. 2008), en què identifiquen mutacions.

TGFBR2 (*Transforming Growth Factor, Beta Receptor II*) codifica una serina-treonina cinasa implicada en la regulació de la proliferació i diferenciació cel·lulars, així com en la producció de matriu extracel·lular (Lin et al. 1992). Resulta un candidat interessant, ja que s'ha descrit una família multigeneracional amb dissecció aòrtica familiar en què 11 dels 14 portadors de la mutació p.Arg460His al gen **TGFBR2**, a la qual s'atribuïa el fenotip, presentaven també atacs migranyosos (Law et al. 2006). Això podria estar potencialment relacionat amb el fet que els pacients amb MO tenen el doble de risc de patir dissecció de l'artèria cervical (Rist et al. 2011).

El gen **PHACTR1** (*PHosphatase and ACTin Regulator 1*) codifica una proteïna que forma part de la família PHACTR/scapinin, encarregada del control de l'activitat i la morfologia sinàptiques. Està implicada en funcions endotelials i s'hi ha descrit associació amb la susceptibilitat a l'infart de miocardi d'aparició primerenca (Myocardial Infarction Genetics et al. 2009). Potencialment, doncs, podria estar relacionat amb la migranya des dels punts de vista neuronal i vascular.

L'últim *locus* associat en l'estudi de meta-anàlisi correspon al gen **ASTN2** (*ASTrotactin 2*), amb funcions relacionades amb la migració neuronal guiada per la glia, important en el desenvolupament de l'arquitectura laminar de les regions corticals al cervell (Wilson et al. 2010). El seu rol en la fisiopatologia de la migranya, però, no queda clar donada la seva relació amb alteracions del desenvolupament.

En el cas particular de la mostra espanyola, es van identificar associacions nominals amb tres *loci*: un SNP a **MEF2D** (rs1050316, també positiu a la meta-anàlisi), quatre a **PHACTR1** (rs1332847, rs93493779 -aquest també positiu a la meta-anàlisi-, rs2327621 i rs7739181) i una variant en un *locus* que no es replicava a la meta-anàlisi, rs11757063, prop del gen **FHL5** (*Four and a Half LIM domains 5*). La possible relació d'aquest gen amb la migranya es comenta al proper apartat de la Discussió. D'altra banda, en la rèplica de les variants de migranya, la mostra espanyola presentava associacions nominals també per als *loci* **TRPM8** i **LRP1**.

3.1.2.3. Meta-anàlisi de 29 GWAS

El GWAS més recent consisteix en una meta-anàlisi que recull les dades de 29 estudis independents (Anttila et al. 2013). La mostra consta d'un total de 23.285 pacients

(procedents tant de mostres clíniques com poblacionals) i 95.425 controls. La població global (*All samples*) inclou diferents poblacions, i s'analitzen tres grans grups de pacients: mostres clíniques (*Clinics only*, que inclou pacients MA i MO) i poblacionals amb MA (*MA only*) i MO (*MO only*).

L'estudi identifica 12 *loci* amb variants de susceptibilitat de tipus SNP (gèniques o properes), set dels quals ja s'havien descrit en GWAS anteriors (*PRDM16*, *LRP1*, *TRPM8*, *MEF2D*, *TGFBR2*, *PHACTR1* i *ASTN2*), i cinc més que no s'havien descrit prèviament (prop dels gens *AJAP1*, *TSPAN2*, *FHL5* i *MMP16*, i a *C7orf10*).

El gen **AJAP1** (*Adherens Junctions Associated Protein 1*) s'expressa a cervell i està associat amb la invasió tumoral i la regulació de l'activitat metal·loproteïnasa (Schreiner et al. 2007).

TSPAN2 és un dels membres de la família de les tetraspanines, i la proteïna de membrana que codifica està implicada en fenòmens de transducció de senyal relacionats amb el control del desenvolupament, creixement i motilitat cel·lulars. Actua també com a regulador de l'activitat metal·loproteïnasa, i s'ha suggerit que podria estar relacionada amb la sinapsi (Lafleur et al. 2009).

El gen **FHL5** codifica un factor de transcripció que regula els elements de resposta a AMP cíclic *CREM* i *CREB*, que estan relacionats amb la plasticitat sinàptica i la memòria (Fimia et al. 2000).

El gen **MMP16** (*Matrix MetalloPeptidase 16 (membrane-inserted)*) codifica una metal·loproteïnasa de la matriu extracel·lular. És interessant destacar que aquesta proteïna s'uneix a LRP1 (Rozanov et al. 2004), un polipèptid codificat per un gen anteriorment associat amb la migranya en el segon GWAS publicat (Chasman et al. 2011).

L'últim dels *loci* amb variants associades correspon a **SUGCT** (SUccinil-CoA:Glutarat-CoA Transferasa) mutacions en el qual s'han relacionat amb l'acidúria glutàrica de tipus 3, una anomalia metabòlica rara (Sherman et al. 2008). La seva relació amb la migranya és, fins ara, desconeguda.

Un dels problemes principals que presenten els estudis d'associació en mostres petites és la manca de poder estadístic. La tendència en els estudis actuals, com aquest, va en el sentit d'augmentar la grandària mostral mitjançant l'agrupament de diverses poblacions via formació de consorcis internacionals. Aquesta meta-anàlisi replica 7 de les 9 associacions descrites amb la migranya en GWAS previs i n'identifica cinc més. El gran avantatge que presenta l'estratègia utilitzada és, sens dubte, el poder estadístic que adquireix l'estudi en ampliar la mostra. El preu que es paga és necessàriament l'augment de l'heterogeneïtat clínica i, de retruc, també genètica. Aquest estudi, com la majoria d'estudis realitzats en el marc de consorcis internacionals, és retrospectiu, i per tant utilitza mostres ja reclutades prèviament que no han estat sotmeses a protocols de selecció clínica consensuats. A part de l'heterogeneïtat deguda als criteris de reclutament diferencials, aquest estudi té altres font de possible heterogeneïtat clínica: d'una banda, una part de la mostra té un origen clínic mentre que l'altra és poblacional; i de l'altra, hi ha pacients MA i pacients MO. El grup '*All samples*', que inclou tots els pacients i és per tant el més dimensionat, és el que presenta més

associacions, un total de 9, seguit del grup *MO only*. L'únic grup que no presenta cap associació significativa és '*MA only*', de tipus poblacional. Una possible explicació és que, essent el subgrup de migranya més sever i que afecta a un percentatge menor de la població, podria tenir una arquitectura genètica diferent, per exemple amb una contribució més gran de les variants rares.

3.1.3. Estudi de rèplica en pacients amb migranya amb aura

La publicació dels GWAS en migranya mencionats a la secció 3.1.2 i els resultats positius que se'n deriven va motivar un segon estudi de rèplica en el nostre laboratori. Anteriorment ja havíem fet un primer estudi de rèplica (secció 3.1.1) (Sintas et al. 2012), amb resultats negatius, centrat en el primer GWAS publicat (Anttila et al. 2010).

El primer pas de l'estudi va ser la selecció de la mostra, que en aquest cas va consistir en pacients amb migranya amb aura (MA). Són dos els motius que van dur-nos a prendre aquest decisió: en primer lloc, la component genètica d'aquest subtipus de migranya és més gran que la de la migranya sense aura; en segon lloc, la nostra mostra de pacients MO ja havia estat emprada en un dels tres GWAS que volíem replicar (ref). Aquesta tria generava el problema que el poder estadístic del nostre estudi disminuïa considerablement, fins a un 47%, perquè la mostra clínica de MA disponible era més petita que la mostra de MO: 517 casos i 535 controls espanyols i caucàsics amb proporcions de sexe equivalents. Tal i com s'havia fet en el primer GWAS (Anttila et al. 2010) i en la nostra primera rèplica, vam fer anàlisis de tota la mostra i també en els subgrups de pacients '*MA only*' (n=318) i '*Both MA and MO*' (n=180).

Quant a la selecció d'SNPs a replicar, vam escollir totes les variants genètiques associades amb la migranya comuna descrites en estudis GWAS que incloïen pacients MA. Per tant, es van incloure les associacions positives procedents de les publicacions de (Chasman et al. 2011) (secció 3.1.2.1 d'aquesta Tesi) i (Anttila et al. 2013) (secció 3.1.2.3), 13 SNPs en total. En l'anàlisi de la mostra completa, dos SNPs (als *loci PRDM16* i *TRPM8*) van assolir nivells de significació nominals, que no superaven les correccions per comparacions múltiples de Bonferroni ni les permutacions. En dividir la mostra de pacients en els diferents subgrups clínics apareixien també associacions nominals (*TSPAN2* i *MMP16* en el grup '*Both MA and MO*').

Els dos *loci* identificats a la mostra completa s'han replicat en d'altres estudis, tot indicant que el seu paper en la genètica de la migranya podria ser rellevant. Dels dos, *PRDM16* és el *locus* associat que més confusió suscita, ja que tot i estar relacionat amb diverses patologies cardíaques (una de les comorbiditats més estudiades amb la migranya), el seu paper en la fisiopatologia del trastorn continua sense estar clar.

El nostre estudi té, sens dubte, un poder estadístic molt limitat, especialment quan s'apliquen les subdivisions clíniques. Un increment de la grandària mostral podria reduir el número de falsos negatius d'aquest estudi de rèplica, o donar més significació estadística a les associacions nominals detectades. Un altre factor a tenir en compte són les poblacions

incloses en els estudis originals que són objecte de les nostres rèpliques. Tot i que hem seleccionat estudis amb pacients MA, les mostres no són totes clíniques, i a més inclouen pacients amb MA però també amb MO. D'altra banda, apareix de nou la qüestió sobre el paisatge genètic de la migranya comuna, ja que la MA és el subtipus clínic en què s'han descrit menys associacions amb variants comunes i també menys rèpliques positives (comparat amb MO). És per això que hi ha qui postula que en MA la contribució de les variants rares podria ser més important que la de les variants comunes, hipòtesi de treball que encara no s'ha explorat experimentalment.

Entre les perspectives de futur plantejarem tres objectius per tal de completar les rèpliques en la nostra mostra de pacients: D'una banda, la rèplica dels SNPs del GWAS de MO (secció 3.1.2.2) (Freilinger et al. 2012) a la nostra mostra de pacients MA. En segon lloc, la rèplica en pacients MO dels SNPs que presenten associació amb la migranya en la meta-anàlisi publicada l'any 2013 (secció 3.1.2.3) (Anttila et al. 2013). Tots dos estudis completarien la sèrie d'estudis de rèplica de les variants comunes identificades en GWAS de migranya, tot oferint un escenari més complet a la nostra població de les associacions prèviament descrites.

3.1.4. Els GWAS com a eina per a la identificació de nous *loci* candidats

Gràcies als GWAS la visió sobre els gens candidats en la migranya s'ha ampliat considerablement, i s'han identificat variants potencialment implicades en aquest trastorn neurològic en *loci* que tradicionalment no s'havien considerat. Els GWAS, a diferència dels CGAS, són estudis que no se sustenten en hipòtesis prèvies, i per tant no pateixen els biaixos de la selecció de gens candidats basada en els coneixements limitats i encara deslligats que tenim sobre la fisiopatologia de la migranya. El procés que s'ha seguit en els estudis d'associació per identificar variants comunes de risc en malalties complexes -primer dirigits a gens candidats, més recentment a escala genòmica- ha seguit una evolució paral·lela a la identificació dels gens responsables de les malalties mendelianes, en què una etapa inicial de seqüenciació de gens candidats va donar lloc a l'anàlisi de lligament a escala genòmica primer i a la seqüenciació d'exomes -o de genomes- després. El resultat ha estat una explosió en el nombre de malalties monogèniques resoltes per unitat de temps. D'alguna manera, aquesta estratègia, que condueix a veritats científiques, contravé el mètode científic tradicional, entès com un procés que parteix d'una sèrie de coneixements previs que permeten formular una hipòtesi, que a continuació és contrastada experimentalment per arribar a unes conclusions.

El Consorci Internacional de Genètica de les Cefalees (IHGC) està invertint actualment molt esforços en dur a terme estudis genètics en mostres de grans dimensions. Així, els últims resultats de què disposem, encara no publicats, corresponen a una nova meta-anàlisi de dades GWAS encara no publicada que reuneix 21 estudis individuals, que recull un total de 59.043 casos i 313.781 controls. Aquest projecte ha replicat 10 de 13 *loci* prèviament associats amb la migranya i n'identifica 29 més en el grup '*all migraine*' (Figura 13).

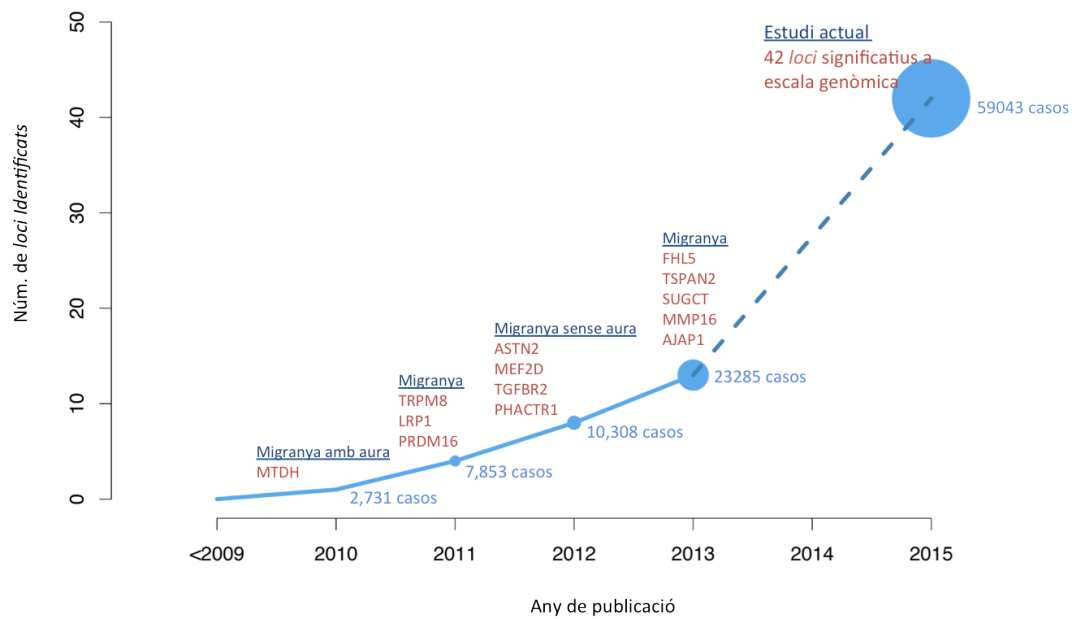
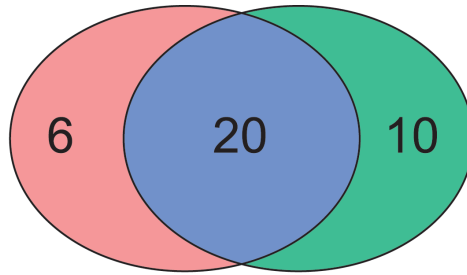


Figura 13. Evolució dels estudis GWAS en migranya amb resultats positius des de l'any 2010.

Les anàlisis fetes en els grups resultants de la divisió dels casos en els dos subtipus principals de migranyosos (MO, 7.368 casos i 135.727 controls, i MA, 6.042 casos i 141.786 controls) mostren resultats dispars. D'una banda, en el grup MO s'identifiquen associacions amb set *loci* diferents, amb nivells de significació a escala genòmica, tots ells presents en l'anàlisi '*all migraine*', sis dels quals ja s'havien descrit anteriorment. D'altra banda, l'anàlisi dels pacients MA no presenta cap resultat d'associació positiva. Aquest estudi, encara preliminar, apunta de nou a la idea que l'arquitectura genètica de la MO i la MA és diferent. Actualment, doncs, el panorama de la genètica de la migranya comuna compta amb un total de 42 *loci* amb variants associades amb la malaltia. En termes generals i cercant una visió integradora dels resultats, hi ha un total de 36 *loci* que poden relacionar-se amb el teixit nerviós i el vascular, 20 dels quals tenen relació amb tots dos (Figura 14). Això donaria suport a la teoria neurovascular de la fisiopatologia de la migranya, ja que es fa evident la implicació dels dos sistemes. A més, en una anàlisi d'enriquiment de vies mitjançant el *Gene Ontology* s'ha observat que hi ha un total de 21 gens relacionats amb el desenvolupament vascular i sis que pertanyen a la categoria d'activitat de canals iònics. Constatem, doncs, que aquests últims són minoria en el conjunt de *loci* potencialment implicats, demostrant la importància d'ampliar la visió dels gens candidats relacionats amb la malaltia.



Vascular	Vascular+Neuronal		Neuronal
prop de <i>TGFBR2</i>	prop de <i>MTDH</i>	<i>CARF</i>	<i>ASTN2</i>
prop de <i>GPR149</i>	<i>PRDM16</i>	prop de <i>REST</i>	prop de <i>LRR1Q3</i>
<i>NRP1</i>	<i>TRPM8</i>	prop de <i>GJA1</i>	prop de <i>DOCK4</i>
<i>NMRAL1</i>	<i>LRP1</i>	<i>HEY2</i>	<i>PLCE1</i>
prop de <i>NLRP1</i>	<i>MEF2D</i>	<i>HPSE2</i>	<i>MRVI1</i>
prop de <i>FECH</i>	<i>PHACTR1</i>	<i>IGSF9B</i>	<i>MPPED2</i>
	prop de <i>AJAP1</i>	prop de <i>FGF6</i>	<i>TSPAN18</i>
	prop de <i>TSPAN2</i>	prop de <i>ITPK1</i>	<i>HS6ST3</i>
	prop de <i>MMP16</i>	prop de <i>JAG1</i>	<i>RNF213</i>
	<i>PRPF3</i>	prop de <i>KCNE2</i>	<i>SLC24A3</i>

Figura 14. Relació dels 36 loci amb variants associades identificats en l'últim estudi GWAS realitzat, encara no publicat (Gormley et al., *American Society of Human Genetics 64th Annual Meeting 2014*) amb els teixits vascular i nerviós.

3.2. Regions reguladores: estudi d'associació amb gens candidats (CGAS)

Els estudis d'associació cas-control han esdevingut al llarg dels anys la metodologia més emprada en l'estudi de malalties complexes com la migranya. Clàssicament ho han estat els estudis basats en l'elecció de gens candidats (*Candidate Gene Association Studies*, CGAS), en què en alguns casos se seleccionen variants que maximitzen la cobertura genètica mentre que en d'altres s'analitzen variants (potencialment) funcionals. En els últims anys, però, els estudis a escala genòmica o GWAS s'han erigit com els protagonistes a l'hora d'abordar l'estudi de variants comunes potencialment associades amb la migranya. Tot i que cada cop tenen una densitat més gran, en general les variants incloses en aquest tipus d'estudis no cobreixen encara la totalitat del genoma. Elements reguladors com els microRNAs (miRNAs) són un exemple d'aquest buit. Aquests han estat objecte d'estudi en els darrers anys, i hi ha un interès creixent en el coneixement de la seva implicació en la regulació de l'expressió gènica i en la seva relació amb la patologia. Els trastorns neurològics no en són una excepció, i s'ha demostrat ja que diversos miRNAs estan implicats en funcions sinàptiques o en el desenvolupament neuronal. També s'han començat a explorar variants genètiques en regions codificants de miRNAs, com a factors de risc en malalties complexes, però de moment ningú ho ha fet en la migranya (Bicker & Schratt 2008, Kress et al. 2013, Lett et al. 2013, Liang et al. 2007, Mishra 2009, Mishra et al. 2008, Muinos-Gimeno et al. 2010).

3.2.1. Disseny de l'estudi

El nostre estudi es va dissenyar a partir d'una selecció de gens que codifiquen proteïnes i que es consideren candidats per a la migranya a partir de diverses evidències, com ara gens relacionats amb formes monogèniques de migranya, gens en què s'havien descrit prèviament associacions (tant en CGAS com en GWAS), o vies funcionals relacionades amb la fisiopatologia del trastorn, com els canals iònics, el sistema vascular o la neurotransmissió, entre d'altres. A continuació es van buscar a les bases de dades Tarbase (Vergoulis et al. 2012) i miRecords (Xiao et al. 2009) els miRNAs que regulen l'expressió dels 748 gens seleccionats. Aquestes bases de dades proporcionen llistats d'interaccions miRNA-mRNA, la gran majoria d'elles validades experimentalment, per exemple mitjançant *microarrays*. Dels 748 gens que hi vam cercar, n'hi constaven 208. Tots els miRNAs pels quals es predeia una diana en algun dels nostres gens van configurar la selecció inicial. Cal recalcar que actualment hi ha noves bases de dades en què es descriuen més interaccions i compten amb validacions experimentals més robustes, com ara TargetScan (www.targetscan.org). Vam afegir al llistat miRNAs amb funcions demostrades en el sistema nerviós, obtinguts a partir de publicacions científiques. La selecció incloïa en aquest punt un total de 137 miRNAs. Les diferències entre el nombre de gens i de miRNAs es deu al fet que un mateix miRNA pot tenir diversos gens diana, i un mateix gen pot tenir diversos miRNAs que el regulin.

A continuació vam obtenir de miRbase (Kozomara & Griffiths-Jones 2014) informació detallada sobre els gens diana de cada un dels miRNA seleccionats, i també sobre les característiques de la seva organització al genoma: la cadena en què estan codificats, *clusters* dels quals formen part o la seva posició relativa a gens que codifiquen proteïnes (intra- o intergènica). Vam recollir així informació per a un total de 166 gens de miRNA, ja que alguns miRNAs estan codificats per més d'un gen que dóna lloc a la mateixa forma de RNA madura.

Quedava definir la regió d'interès per a l'estudi d'associació. En base a estudis previs que descriuen regions implicades en la regulació dels gens de miRNA (Wang et al. 2010), vam considerar com a regions a ser cobertes entre 5 i 10kb a 5' i 5kb a 3' del gen. Mitjançant les dades genotípiques d'individus CEU disponibles a Hapmap (International HapMap et al. 2010), i utilitzant el *software* Haploview (Barrett et al. 2005), vam seleccionar les variants comunes (MAF>0,1) localitzades a les regions escollides, que a més havien de presentar valors de desequilibri de lligament inferiors a $r^2 < 0,8$ amb qualsevol altre SNP seleccionat a la regió, per evitar redundàncies genètiques. D'aquesta captura en va resultar un conjunt de 269 variants de tipus SNP.

Donada la magnitud del projecte, aquest s'ha planificat en diferents fases. La que s'ha executat en el marc d'aquesta Tesi es presenta a continuació.

3.2.2. miRNAs relacionats amb gens de glutamat

El glutamat és el principal neurotransmissor excitador del cervell i s'ha relacionat estretament amb la migranya a diferents nivells (Gasparini & Griffiths 2013). Per a la primera fase del projecte ens hem centrat en gens directament relacionats amb el glutamat: receptors, transportadors i gens que codifiquen proteïnes associades (35 gens, dels quals 18 constaven a les bases de dades Tarbase i Mirecords).

L'estudi de les formes rares d'una malaltia poden ser el primer pas en la comprensió de les formes comunes, i en el cas de la migranya sabem que en les formes monogèniques la conseqüència funcional a nivell neuronal és un augment del glutamat a l'espai sinàptic (Ferrari et al. 2015). S'ha vist també que l'augment de glutamat pot ser un dels desencadenants de la CSD, el fenomen causant de l'aura (Cui et al. 2014). Fins ara, els estudis d'associació han detectat associacions entre la migranya i tres variants en gens relacionats amb el glutamat: rs2195450 (*GRIA1*) i rs3761555 (*GRIA3*) (Formicola et al. 2010), mitjançant estudis CGAS, i rs1835740 (*MTDH*), identificada al primer GWAS de migranya (Anttila et al. 2010).

Així doncs, la primera fase va consistir en un estudi d'associació de 47 variants de tipus SNP localitzades en regions codificants d'un total de 14 gens de miRNAs, amb interaccions miRNA-mRNA predites per a 16 dels gens relacionats amb el glutamat.

3.2.3. Estudi de descoberta i de rèplica.

La mostra emprada en l'estudi de descoberta inclou 517 pacients MA i 535 controls (vegeu l'apartat 3.1.3 de la Discussió). De 40 SNPs que van passar els controls de qualitat per a l'anàlisi, 7 van donar valors d'associació nominals per a un total de tres gens de miRNA (miR-7-3, miR-335 i miR-26b) i el *cluster* que incloïa el miR-485. Aquests quatre miRNAs interactuarien amb un total de 14 gens relacionats amb el glutamat (*GRIA1*, *GRIA2*, *GRINA*, *GRIK2*, *GRIK4*, *GRIN2D*, *GRM3*, *GRM5*, *GRM8*, *GRIP2*, *SLC1A1*, *SLC1A6*, *SLC17A6* i *SLC17A7*). D'aquests, únicament el gen *GRIA1* s'havia associat prèviament amb la migranya, tot i que les diferents rèpliques que s'han fet han donat resultats negatius (Formicola et al. 2010, Maher et al. 2013). Cap de les associacions, però, supera la correcció per comparacions múltiples. Aquests resultats s'han d'interpretar amb prudència, ja que la mostra estudiada té un poder estadístic limitat. No obstant, podrien ser un primer indicador de la possible implicació de variants genètiques relacionades amb miRNAs com a factors de susceptibilitat a la migranya.

Per a la fase de rèplica, en què es van assajar les associacions nominals detectades, vam dur a terme una anàlisi *in silico* utilitzant dades GWAS pre-existents generades pel consorci IHGC i procedents d'una meta-anàlisi publicada l'any 2013, que inclou 23.285 pacients (de mostres clíniques i poblacionals) i 95.425 controls (vegeu l'apartat 3.1.2.3 de la Discussió) (Anttila et al. 2013). Tot i que l'escenari més adient per a un estudi de rèplica implica comptar amb una mostra el més homogènia possible, tenir accés a una mostra d'aquestes dimensions, amb tot el poder estadístic que comporta, suposa un gran avantatge. Un dels

SNPs, rs12610046, va mostrar associació significativa a la mostra de rèplica. Està situat en una regió que codifica el gen miR-7-3, que segons les prediccions bioinformàtiques regularia l'expressió del gen *GRINA*. L'associació detectada correspon al grup clínic de la mostra de rèplica, de la mateixa naturalesa que la nostra, en aquest cas consistent en una població de pacients MA i MO diagnosticats per personal mèdic. En aquest punt torna a entrar el debat sobre el tipus de mostra (clínica o poblacional), i sobre els subgrups de migranya que s'estudien en cada cas (MA i MO a la rèplica, només MA a la de descoberta).

3.2.4. Limitacions del disseny i interpretació dels resultats

Des del moment en què es va dissenyar aquest estudi fins ara, la informació disponible sobre els miRNAs i les seves dianes ha crescut de manera exponencial. Actualment les eines de predicció *in silico* i els estudis funcionals en què s'estudien les interaccions directes miRNA-RNAm ofereixen un panorama molt més ampli d'aquests elements reguladors i les seves dianes. En el nostre cas, les bases de dades a partir de les quals es va dissenyar l'estudi original presentaven prediccions validades, en la majoria dels casos, mitjançant tècniques d'estudi a gran escala (p.ex. *microarrays* d'expressió). Això representa una limitació a l'hora d'interpretar els resultats, ja que la variació de l'expressió gènica que s'observa no implica una interacció directa del mRNA amb el miRNA. Conseqüentment, les nostres conclusions en l'estudi han de ser prudentes, i a falta d'estudis funcionals que demostrin la interacció directa del miR-7 amb el mRNA de *GRINA*, les nostres interpretacions han de limitar-se a la relació de la variant rs12610046 amb la migranya. No obstant, el gen *GRINA* (*Glutamate Receptor, Ionotropic, N-methyl D-aspartate-Associated protein 1 (glutamate binding)*) representa un candidat interessant i poc explorat fins ara. Es va descriure com el gen de la subunitat associada a receptors de glutamat de tipus ionotròpic NMDA, i està situat al cromosoma 8q24.3, un *locus* que s'ha relacionat en diferents estudis amb l'epilèpsia (Bonaglia et al. 2005), una de les comorbiditats més conegudes amb la migranya. El seu paper en relació al glutamat, però, és poc clar. Codifica la proteïna LFG1 (*Lifeguard 1*, també coneguda com TMBIM3 o NMDARA1). Aquesta proteïna està present al cervell i s'ha relacionat amb la modulació de l'homeòstasi del calci al reticle endoplasmàtic i amb l'apoptosi (Rojas-Rivera et al. 2012). Cal destacar la seva relació amb el calci és rellevant, ja que d'aquest catió depèn l'alliberació de neurotransmissors com el glutamat a l'espai sinàptic, mitjançant el complex SNARE (Malsam et al. 2008).

En relació a les variants associades, fóra interessant fer estudis funcionals per determinar l'efecte dels al·lels sobre l'expressió de miR-7-3. La variant associada està situada unes 3,4 Kb a 3' del gen miR-7-3, dins la regió potencialment reguladora del gen de miRNA. Sabem que la forma madura d'aquest miRNA, miR-7, s'expressa a cervell i pot estar implicada en vies de nocicepció (Kress et al. 2013), relacionades amb la migranya. Aquí hem de tenir en consideració, però, el fenomen de redundància en els gens de miRNA. MiR-7 és un dels miRNAs codificats per més d'un gen, i la identificació de la seva forma madura en un teixit no ens revela quin dels tres gens s'està expressant en realitat. Aquest és un fenomen que

hauria d'explorar en paral·lel per a la correcta interpretació dels resultats d'estudis com el nostre, ja que en el cas que la variant arribés a modular d'alguna manera els nivells d'expressió del gen miR-7-3, això no seria garantia que hi hagués un impacte sobre els nivells de la forma madura en el teixit d'interès, en aquest cas el sistema nerviós.

D'altra banda, val la pena valorar l'impacte del moment en què es fixa el disseny experimental de l'estudi. Les constants actualitzacions de les bases de dades proporcionen, sens dubte, informació molt valuosa que resulten de gran ajuda per a la comunitat científica. Aquesta allau de dades, però, pot representar un problema per a projectes a llarg termini, ja que quan alguns treballs veuen els resultats, la base informativa sobre la qual s'han construït probablement ha canviat substancialment. En aquest sentit, les dades genotípiques que vam extreure de Hapmap per a seleccionar els SNPs que havien de cobrir les regions dels gens de miRNAs procedien d'unaversió del *UCSC Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu>) de l'any 2006, que al seu torn utilitzava dades de la versió 130 de dbSNP (base de dades de SNPs, versió del 2009). A dia d'avui el *UCSC Genome Browser* compta amb un actualització del 2013, on les dades dels SNPs provenen en aquests moments de la versió 142 de dbSNP (amb una última actualització del 2015). Òbviament, un disseny del nostre estudi actualitzat presentaria diferències importants en els polimorfismes seleccionats, que donarien una millor cobertura genètica a les diferents regions estudiades.

L'estudi d'associació de variants situades en gens de miRNA, pioner en el cas de la migranya, ofereix, malgrat les limitacions, una nova visió en el panorama dels gens candidats a aquest trastorn, ja que explora el possible paper etiològic d'elements reguladors del genoma. En un futur proper serà interessant dur a terme estudis més dimensionats i amb dissenys més actualitzats, i una visió més àmplia sobre els tipus de variants analitzades (comunes i rares), per aprofundir en el coneixement del paisatge genètic de la migranya.

CONCLUSIONS

CONCLUSIONS

Anàlisi mutacional i funcional dels gens *CACNA1A* i *ATP1A2* en migranya hemiplègica:

- S'ha dut a terme el cribratge mutacional dels gen *CACNA1A* i *ATP1A2* en una mostra de 18 pacients no emparentats amb migranya hemiplègica. S'han identificat quatre mutacions a *CACNA1A* ja descrites en estudis previs: p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln i p.Thr666Met, la primera d'elles *de novo*. S'han identificat dues mutacions a *ATP1A2*: p.Ala606Thr, prèviament descrita, i p.Glu825Lys, descrita per primera vegada en aquest estudi
- La mutació p.Thr501Met en el gen *CACNA1A* ha estat objecte d'un estudi funcional de tipus *patch-clamp*. Els resultats indiquen que es produeix una reducció del llindar del voltatge tant per a l'activació com per a la inactivació del canal. Aquests canvis provoquen un augment de l'activitat del canal Ca_v2.1.
- La mutació p.Glu825Lys en el gen *ATP1A2* ha estat objecte d'un estudi de viabilitat cel·lular per assajar la seva patogenicitat. Aquest estudi ha mostrat una supervivència de les cèl·lules HeLa transfectades amb la construcció *ATP1A2* mutada del 10% respecte les transfectades amb la construcció WT. Aquests resultats suggereixen que la mutació altera la funció de la bomba Na⁺/K⁺.

Anàlisi mutacional del gen *CACNA1A* en atàxia episòdica de tipus 2:

- S'ha dut a terme el cribratge mutacional del gen *CACNA1A* en una mostra de 49 pacients no emparentats amb atàxia episòdica de tipus 2. S'han identificat un total de vuit variants en nou pacients: tres mutacions sense sentit (p.Trp320Ter, p.Tyr1849Ter, p.Arg1857Ter), tres de canvi de sentit (p.Gly638Asp, p.Thr501Met, p.Pro2222Leu) i dues deleccions d'un i dos nucleòtids que produeixen un canvi de la pauta de lectura (p.Gly250GlufsTer60, p.Gln681ArgfsTer100).
- S'ha dut a terme un estudi de CNVs del gen *CACNA1A* en els pacients amb atàxia episòdica de tipus 2 sense mutacions puntuals identificades. L'estudi ha permès identificar una deleció completa de l'exó 35 (p.Ser1752CysfsTer2) en un dels pacients, com a resultat d'una recombinació entre dos fragments idèntics de seqüències Alu flanquejants situades als introns 34 i 35 del gen.

- La majoria de les mutacions identificades (sis de nou) provoquen una disrupció de la proteïna. Malgrat l'absència d'estudis funcionals, es prediu una reducció de l'activitat del canal a la cèl·lula.
- Dues de les tres mutacions que provoquen canvis d'aminoàcid havien estat objecte d'estudis funcionals previs que demostraven una disminució de l'activitat del canal, un efecte comú en les mutacions responsables d'atàxia episòdica de tipus 2 (p.Gly638Asp), o un augment de l'activitat del canal (p.Thr501Met). La mutació p.Pro2222Leu no s'ha assajat funcionalment. Tot i que les prediccions bioinformàtiques indiquen que es podria tractar d'un canvi benigne, la mutació cosegrega amb la malaltia a la família.
- S'ha realitzat un estudi de NMD en fibroblasts del pacient 432B, portador de la mutació p.Trp320Ter, per assajar la possible existència de degradació del RNAm, que seria compatible amb un mecanisme patogènic del tipus haploinsuficiència. Els resultats indiquen que no hi ha NMD, o que aquest és escàs. En conseqüència, el transcrit mutant està present a les cèl·lules, tot suggerint que l'efecte patogènic de la mutació podria estar vehiculat per un efecte dominant negatiu.

Estudis d'associació de tipus cas-control per identificar variants comunes de risc en migranya comuna:

- S'ha avaluat la participació en la susceptibilitat a la migranya de la variant de tipus SNP rs1835740 en un estudi d'associació cas-control per replicar el resultat d'un GWAS previ. No s'ha trobat associació entre la variant i els grups clínics assajats (migranya, MO, MA, subgrups de MA) en una mostra clínica de 1521 pacients i 1379 controls espanyols.
- S'ha dut a terme un estudi d'associació a escala genòmica amb rèplica per avaluar la participació de variants de tipus SNP en una població de 2326 pacients amb MO i 4580 controls. En la fase de descoberta s'ha trobat una associació significativa amb un *locus* situat a 1q22 (gen *MEF2D*), i associacions nominals en 11 *loci* més. En l'estudi de rèplica s'han avaluat 18 SNPs de 12 *loci* en quatre mostres clíniques independents de MO, una d'elles espanyola de 827 pacients i 971 controls. Dues de les associacions, amb els gens *MEF2D* i *TGFBR2*, es repliquen convincentment. En combinar les mostres de descoberta i de rèplica es confirmen les associacions amb *MEF2D* i *TGFBR2* i n'apareixen dues de noves amb significació genòmica, a *PHACTR1* i *ASTN2*, a més de replicar-se dues associacions obtingudes en un GWAS previ (*TRPM8* i *LRP1*).

- S'ha avaluat la possible participació en la susceptibilitat a la MA de 12 variants de tipus SNP en un estudi d'associació cas-control en què es pretén replicar els resultats de diversos GWAS previs en una mostra clínica de 521 pacients amb MA i 535 controls espanyols. En l'estudi s'han identificat associacions nominals amb els SNPs rs2651899, (al gen *PRDM16*) i rs10166942 (prop del gen *TRPM8*) amb MA, i de rs12134493 (prop de *TSPAN2*) i rs10504861 (prop de *MMP16*) en el subgrup de pacients MA que tenen a més episodis de MO amb freqüència.
- S'ha avaluat la possible participació en la susceptibilitat a la MA de 40 variants de tipus SNP situades en gens de microRNAs en un estudi cas-control amb una mostra clínica de 521 pacients amb MA i 535 controls. L'estudi ha permès identificar associacions nominals entre MA i els SNPs rs12610046 (gen miR-7-3), rs13245645 (miR-335), rs4672891 (miR-26b) i rs10151229, rs7161194, rs8015713 i rs8016185 (*cluster* que inclou miR-485). L'estudi de rèplica, consistent en un mostra de 23.285 pacients amb migranya i 95.425 controls, ha confirmat l'associació amb l'SNP rs12610046 (miR-7-3).

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

- Abou-Sleiman PM, Hanna MG, Wood NW. 2006. Genetic association studies of complex neurological diseases. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 77: 1302-4
- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. 2013. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Current protocols in human genetics / editorial board, Jonathan L. Haines ... [et al.] Chapter 7: Unit7* 20
- Akerman S, Goadsby PJ. 2007. Dopamine and migraine: biology and clinical implications. *Cephalalgia : an international journal of headache* 27: 1308-14
- Alonso I, Barros J, Tuna A, Coelho J, Sequeiros J, et al. 2003. Phenotypes of spinocerebellar ataxia type 6 and familial hemiplegic migraine caused by a unique CACNA1A missense mutation in patients from a large family. *Arch Neurol* 60: 610-4
- Amin FM, Asghar MS, Hougaard A, Hansen AE, Larsen VA, et al. 2013. Magnetic resonance angiography of intracranial and extracranial arteries in patients with spontaneous migraine without aura: a cross-sectional study. *The Lancet. Neurology* 12: 454-61
- An XK, Ma QL, Lin Q, Zhang XR, Lu CX, Qu HL. 2013. PRDM16 rs2651899 Variant Is a Risk Factor for Chinese Common Migraine Patients. *Headache*
- Antonarakis SE, Krawczak M, Cooper DN. 2000. Disease-causing mutations in the human genome. *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3: S173-8
- Anttila V, Stefansson H, Kallela M, Todt U, Terwindt GM, et al. 2010. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nature genetics* 42: 869-73
- Anttila V, Wessman M, Kallela M, Palotie A. 2011. Towards an understanding of genetic predisposition to migraine. *Genome Med* 3: 17
- Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, Kurth T, Bettella F, et al. 2013. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nature genetics* 45: 912-7
- Arndt AK, Schafer S, Drenckhahn JD, Sabeh MK, Plovie ER, et al. 2013. Fine mapping of the 1p36 deletion syndrome identifies mutation of PRDM16 as a cause of cardiomyopathy. *American journal of human genetics* 93: 67-77
- Arulmani U, Maassenvandenbrink A, Villalon CM, Saxena PR. 2004. Calcitonin gene-related peptide and its role in migraine pathophysiology. *European journal of pharmacology* 500: 315-30
- Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T, Moskowitz MA. 2006. Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis. *Annals of neurology* 59: 652-61
- Baron EP, Tepper SJ. 2010. Revisiting the role of ergots in the treatment of migraine and headache. *Headache* 50: 1353-61
- Barrett JC, Fry B, Maller J, Daly MJ. 2005. Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21: 263-5

- Battistini S, Stenirri S, Piatti M, Gelfi C, Righetti PG, et al. 1999. A new CACNA1A gene mutation in acetazolamide-responsive familial hemiplegic migraine and ataxia. *Neurology* 53: 38-43
- Bicker S, Schrott G. 2008. microRNAs: tiny regulators of synapse function in development and disease. *Journal of cellular and molecular medicine* 12: 1466-76
- Bloudek LM, Stokes M, Buse DC, Wilcox TK, Lipton RB, et al. 2012. Cost of healthcare for patients with migraine in five European countries: results from the International Burden of Migraine Study (IBMS). *The journal of headache and pain* 13: 361-78
- Bogdanov VB, Multon S, Chauvel V, Bogdanova OV, Prodanov D, et al. 2011. Migraine preventive drugs differentially affect cortical spreading depression in rat. *Neurobiology of disease* 41: 430-5
- Bonaglia MC, Giorda R, Tenconi R, Pessina M, Pramparo T, et al. 2005. A 2.3 Mb duplication of chromosome 8q24.3 associated with severe mental retardation and epilepsy detected by standard karyotype. *European journal of human genetics : EJHG* 13: 586-91
- Borel C, Antonarakis SE. 2008. Functional genetic variation of human miRNAs and phenotypic consequences. *Mammalian genome : official journal of the International Mammalian Genome Society* 19: 503-9
- Buzzi MG, Tassorelli C. 2010. Experimental models of migraine. *Handbook of clinical neurology* 97: 109-23
- Campos FV, Chanda B, Roux B, Bezanilla F. 2007. Two atomic constraints unambiguously position the S4 segment relative to S1 and S2 segments in the closed state of Shaker K channel. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7904-9
- Carreno O, Corominas R, Serra SA, Sintas C, Fernandez-Castillo N, et al. 2013. Screening of CACNA1A and ATP1A2 genes in hemiplegic migraine: clinical, genetic, and functional studies. *Molecular genetics & genomic medicine* 1: 206-22
- Carreno O, Garcia-Silva MT, Garcia-Campos O, Martinez-de Aragon A, Cormand B, Macaya A. 2011. Acute striatal necrosis in hemiplegic migraine with de novo CACNA1A mutation. *Headache* 51: 1542-6
- Castro MJ, Stam AH, Lemos C, de Vries B, Vanmolkot KR, et al. 2009. First mutation in the voltage-gated Nav1.1 subunit gene SCN1A with co-occurring familial hemiplegic migraine and epilepsy. *Cephalalgia : an international journal of headache* 29: 308-13
- Claes LR, Deprez L, Suls A, Baets J, Smets K, et al. 2009. The SCN1A variant database: a novel research and diagnostic tool. *Human mutation* 30: E904-20
- Cleves C, Parikh S, Rothner AD, Tepper SJ. 2009. Link between confusional migraine, hemiplegic migraine and episodic ataxia type 2: hypothesis, family genealogy, gene typing and classification. *Cephalalgia : an international journal of headache* 30: 740-3
- Cloarec R, Bruneau N, Rudolf G, Massacrier A, Salmi M, et al. 2012. PRRT2 links infantile convulsions and paroxysmal dyskinesia with migraine. *Neurology* 79: 2097-103

- Colhoun HM, McKeigue PM, Davey Smith G. 2003. Problems of reporting genetic associations with complex outcomes. *Lancet* 361: 865-72
- Cortright DN, Krause JE, Broom DC. 2007. TRP channels and pain. *Biochimica et biophysica acta* 1772: 978-88
- Cuenca-Leon E, Banchs I, Serra SA, Latorre P, Fernandez-Castillo N, et al. 2009a. Late-onset episodic ataxia type 2 associated with a novel loss-of-function mutation in the CACNA1A gene. *Journal of the neurological sciences* 280: 10-4
- Cuenca-Leon E, Corominas R, Fernandez-Castillo N, Volpini V, Del Toro M, et al. 2008. Genetic analysis of 27 Spanish patients with hemiplegic migraine, basilar-type migraine and childhood periodic syndromes. *Cephalalgia : an international journal of headache* 28: 1039-47
- Cuenca-Leon E, Corominas R, Montfort M, Artigas J, Roig M, et al. 2009b. Familial hemiplegic migraine: linkage to chromosome 14q32 in a Spanish kindred. *Neurogenetics* 10: 191-8
- Cui Y, Kataoka Y, Watanabe Y. 2014. Role of cortical spreading depression in the pathophysiology of migraine. *Neuroscience bulletin* 30: 812-22
- Curran-Everett D. 2000. Multiple comparisons: philosophies and illustrations. *American journal of physiology. Regulatory, integrative and comparative physiology* 279: R1-8
- Curtain RP, Lea RA, Tajouri L, Haupt LM, Ovcaric M, et al. 2005. Analysis of chromosome 1 microsatellite markers and the FHM2-ATP1A2 gene mutations in migraine pedigrees. *Neurological research* 27: 647-52
- Charles A. 2013. The evolution of a migraine attack - a review of recent evidence. *Headache* 53: 413-9
- Chasman DI, Schurks M, Anttila V, de Vries B, Schminke U, et al. 2011. Genome-wide association study reveals three susceptibility loci for common migraine in the general population. *Nature genetics* 43: 695-98
- Dahlem MA. 2013. Neuromodulation: Model-based control of cortical excitability in early and late aura phase. *Cephalalgia* 33.
- Dale RC, Gardiner A, Antony J, Houlden H. 2012. Familial PRRT2 mutation with heterogeneous paroxysmal disorders including paroxysmal torticollis and hemiplegic migraine. *Dev Med Child Neurol*
- De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, et al. 2003. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na⁺/K⁺ pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nature genetics* 33: 192-6
- de Vries B, Freilinger T, Vanmolkot KR, Koenderink JB, Stam AH, et al. 2007. Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine. *Neurology* 69: 2170-6
- de Vries B, Mamsa H, Stam AH, Wan J, Bakker SL, et al. 2009a. Episodic ataxia associated with EAAT1 mutation C186S affecting glutamate reuptake. *Arch Neurol* 66: 97-101

- de Vries B, Stam AH, Beker F, van den Maagdenberg AMJM, Vanmolkot KRJ, et al. 2008. CACNA1A mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood. *Cephalalgia : an international journal of headache* 28: 887–91
- de Vries B, Stam AH, Kirkpatrick M, Vanmolkot KR, Koenderink JB, et al. 2009b. Familial hemiplegic migraine is associated with febrile seizures in an FHM2 family with a novel de novo ATP1A2 mutation. *Epilepsia* 50: 2503-4
- Demirci FY, Chang MH, Mah TS, Romero MF, Gorin MB. 2006. Proximal renal tubular acidosis and ocular pathology: a novel missense mutation in the gene (SLC4A4) for sodium bicarbonate cotransporter protein (NBCe1). *Mol Vis* 12: 324-30
- Denier C, Ducros A, Vahedi K, Joutel A, Thierry P, et al. 1999. High prevalence of CACNA1A truncations and broader clinical spectrum in episodic ataxia type 2. *Neurology* 52: 1816-21
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, et al. 2005. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366: 371-7
- Ducros A, Denier C, Joutel A, Cecillon M, Lescoat C, et al. 2001. The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel. *N Engl J Med* 345: 17-24
- Ducros A, Denier C, Joutel A, Vahedi K, Michel A, et al. 1999. Recurrence of the T666M calcium channel CACNA1A gene mutation in familial hemiplegic migraine with progressive cerebellar ataxia. *American journal of human genetics* 64: 89-98
- Ducros A, Joutel A, Vahedi K, Cecillon M, Ferreira A, et al. 1997. Mapping of a second locus for familial hemiplegic migraine to 1q21-q23 and evidence of further heterogeneity. *Annals of neurology* 42: 885-90
- Eadie MJ. 2005. The pathogenesis of migraine - 17th to early 20th century understandings. *Journal of clinical neuroscience : official journal of the Neurosurgical Society of Australasia* 12: 383-8
- Esserlind AL, Kirchmann M, Hauge AW, Le H, Olesen J. 2012. A genotype-phenotype analysis of the 8q22.1 variant in migraine with aura. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 19: 603-9
- Fan X, Wang J, Fan W, Chen L, Gui B, et al. 2014. Replication of migraine GWAS susceptibility loci in Chinese Han population. *Headache* 54: 709-15
- Ferrari MD, Klever RR, Terwindt GM, Ayata C, van den Maagdenberg AM. 2015. Migraine pathophysiology: lessons from mouse models and human genetics. *The Lancet. Neurology* 14: 65-80
- Fimia GM, De Cesare D, Sassone-Corsi P. 2000. A family of LIM-only transcriptional coactivators: tissue-specific expression and selective activation of CREB and CREM. *Molecular and cellular biology* 20: 8613-22

- Flavell SW, Kim TK, Gray JM, Harmin DA, Hemberg M, et al. 2008. Genome-wide analysis of MEF2 transcriptional program reveals synaptic target genes and neuronal activity-dependent polyadenylation site selection. *Neuron* 60: 1022-38
- Formicola D, Aloia A, Sampao S, Farina O, Diodato D, et al. 2010. Common variants in the regulative regions of GRIA1 and GRIA3 receptor genes are associated with migraine susceptibility. *BMC medical genetics* 11: 103
- Freilinger T, Ackl N, Ebert A, Schmidt C, Rautenstrauss B, et al. 2011. A novel mutation in CACNA1A associated with hemiplegic migraine, cerebellar dysfunction and late-onset cognitive decline. *Journal of the neurological sciences* 300: 160-3
- Freilinger T, Anttila V, de Vries B, Malik R, Kallela M, et al. 2012. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nature genetics* 44: 777-82
- Freilinger T, Bohe M, Wegener B, Muller-Myhsok B, Dichgans M, Knoblauch H. 2008. Expansion of the phenotypic spectrum of the CACNA1A T666M mutation: a family with familial hemiplegic migraine type 1, cerebellar atrophy and mental retardation. *Cephalalgia : an international journal of headache* 28: 403-7
- Friedman JM, Liang G, Liu CC, Wolff EM, Tsai YC, et al. 2009. The putative tumor suppressor microRNA-101 modulates the cancer epigenome by repressing the polycomb group protein EZH2. *Cancer research* 69: 2623-9
- Friend KL, Crimmins D, Phan TG, Sue CM, Colley A, et al. 1999. Detection of a novel missense mutation and second recurrent mutation in the CACNA1A gene in individuals with EA-2 and FHM. *Hum Genet* 105: 261-5
- Gambardella A, Marini C. 2009. Clinical spectrum of SCN1A mutations. *Epilepsia* 50 Suppl 5: 20-3
- Gardiner AR, Bhatia KP, Stamelou M, Dale RC, Kurian MA, et al. 2012. PRRT2 gene mutations: from paroxysmal dyskinesia to episodic ataxia and hemiplegic migraine. *Neurology* 79: 2115-21
- Gardner K, Barmada MM, Ptacek LJ, Hoffman EP. 1997. A new locus for hemiplegic migraine maps to chromosome 1q31. *Neurology* 49: 1231-8
- Gargus JJ, Tournay A. 2007. Novel mutation confirms seizure locus SCN1A is also familial hemiplegic migraine locus FHM3. *Pediatric neurology* 37: 407-10
- Gasparini CF, Griffiths LR. 2013. The biology of the glutamatergic system and potential role in migraine. *International journal of biomedical science : IJBS* 9: 1-8
- Gasparini CF, Sutherland HG, Griffiths LR. 2013. Studies on the pathophysiology and genetic basis of migraine. *Current genomics* 14: 300-15
- Gates KS. 2009. An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals. *Chem Res Toxicol* 22: 1747-60
- Gervil M, Ulrich V, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. 1999. Migraine without aura: a population-based twin study. *Annals of neurology* 46: 606-11

- Ghosh J, Pradhan S, Mittal B. 2013. Genome-wide-associated variants in migraine susceptibility: a replication study from North India. *Headache* 53: 1583-94
- Ghosh J, Pradhan S, Mittal B. 2014. Multilocus analysis of hormonal, neurotransmitter, inflammatory pathways and genome-wide associated variants in migraine susceptibility. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 21: 1011-20
- Giunti P, Mantuano E, Frontali M, Veneziano L. 2015. Molecular mechanism of Spinocerebellar Ataxia type 6: glutamine repeat disorder, channelopathy and transcriptional dysregulation. The multifaceted aspects of a single mutation. *Frontiers in cellular neuroscience* 9: 36
- Goadsby PJ. 2007. Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics. *Trends in molecular medicine* 13: 39-44
- Goadsby PJ, Charbit AR, Andreou AP, Akerman S, Holland PR. 2009. Neurobiology of migraine. *Neuroscience* 161: 327-41
- Goadsby PJ, Lipton RB, Ferrari MD. 2002. Migraine--current understanding and treatment. *N Engl J Med* 346: 257-70
- Gordon D, Finch SJ. 2005. Factors affecting statistical power in the detection of genetic association. *The Journal of clinical investigation* 115: 1408-18
- Grand W. 1999. The anatomy of the brain, by Thomas Willis. *Neurosurgery* 45: 1234-6; discussion 36-7
- Graves TD, Imbrici P, Kors EE, Terwindt GM, Eunson LH, et al. 2008. Premature stop codons in a facilitating EF-hand splice variant of CaV2.1 cause episodic ataxia type 2. *Neurobiology of disease* 32: 10-5
- Gupta S, Mehrotra S, Villalon CM, Perusquia M, Saxena PR, MaassenVanDenBrink A. 2007. Potential role of female sex hormones in the pathophysiology of migraine. *Pharmacology & therapeutics* 113: 321-40
- Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, et al. 2001. Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 4687-92
- Headache Classification Committee of the International Headache S. 2013. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia : an international journal of headache* 33: 629-808
- Huang D, Li S, Dhaka A, Story GM, Cao YQ. 2012. Expression of the transient receptor potential channels TRPV1, TRPA1 and TRPM8 in mouse trigeminal primary afferent neurons innervating the dura. *Molecular pain* 8: 66
- Humphrey PP. 2008. The discovery and development of the triptans, a major therapeutic breakthrough. *Headache* 48: 685-7
- Iadecola C. 2002. From CSD to headache: a long and winding road. *Nat Med* 8: 110-2

- International HapMap C, Altshuler DM, Gibbs RA, Peltonen L, Altshuler DM, et al. 2010. Integrating common and rare genetic variation in diverse human populations. *Nature* 467: 52-8
- International Headache Society (IHS) HCC. 1988. Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain. *Cephalalgia : an international journal of headache* 8: 1-96
- International Headache Society (IHS) HCS. 2004. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia : an international journal of headache* 24 Suppl 1: 9-160
- Jen JC, Klein A, Boltshauser E, Cartwright MS, Roach ES, et al. 2007. Prolonged hemiplegic episodes in children due to mutations in ATP1A2. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry* 78: 523-6
- Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD, Baloh RW. 2005. Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology* 65: 529-34
- Jeng CJ, Sun MC, Chen YW, Tang CY. 2008. Dominant-negative effects of episodic ataxia type 2 mutations involve disruption of membrane trafficking of human P/Q-type Ca²⁺ channels. *J Cell Physiol* 214: 422-33
- Jensen R, Stovner LJ. 2008. Epidemiology and comorbidity of headache. *The Lancet. Neurology* 7: 354-61
- Jones KW, Ehm MG, Pericak-Vance MA, Haines JL, Boyd PR, Peroutka SJ. 2001. Migraine with aura susceptibility locus on chromosome 19p13 is distinct from the familial hemiplegic migraine locus. *Genomics* 78: 150-4
- Kalra AA, Elliott D. 2007. Acute migraine: Current treatment and emerging therapies. *Therapeutics and clinical risk management* 3: 449-59
- Kara I, Ozkok E, Aydin M, Orhan N, Cetinkaya Y, et al. 2007. Combined effects of ACE and MMP-3 polymorphisms on migraine development. *Cephalalgia : an international journal of headache* 27: 235-43
- Karatas H, Erdener SE, Gursoy-Ozdemir Y, Lule S, Eren-Kocak E, et al. 2013. Spreading depression triggers headache by activating neuronal Panx1 channels. *Science* 339: 1092-5
- Kelman L. 2004. The premonitory symptoms (prodrome): a tertiary care study of 893 migraineurs. *Headache* 44: 865-72
- Kelman L. 2006. The postdrome of the acute migraine attack. *Cephalalgia : an international journal of headache* 26: 214-20
- Kelman L. 2007. The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia : an international journal of headache* 27: 394-402
- Kim JM, Kim JS, Ki CS, Jeon BS. 2006. Episodic Ataxia Type 2 due to a Deletion Mutation in the CACNA1A Gene in a Korean Family. *J Clin Neurol* 2: 268-71

- Kim VN, Han J, Siomi MC. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature reviews. Molecular cell biology* 10: 126-39
- Knierim E, Leisle L, Wagner C, Weschke B, Lucke B, et al. 2011. Recurrent Stroke Due to a Novel Voltage Sensor Mutation in Cav2.1 Responds to Verapamil. *Stroke* 42: e14-e17
- Kors EE, Haan J, Giffin NJ, Pazdera L, Schnittger C, et al. 2003. Expanding the phenotypic spectrum of the CACNA1A gene T666M mutation: a description of 5 families with familial hemiplegic migraine. *Arch Neurol* 60: 684-8
- Kozomara A, Griffiths-Jones S. 2014. miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic acids research* 42: D68-73
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Glossmann H, Hering S, Striessnig J. 1998. Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca²⁺ channel kinetics. *The Journal of biological chemistry* 273: 5586-90
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Koschak A, Glossmann H, Stenirri S, et al. 2000. Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca(2+) channel kinetics. *The Journal of biological chemistry* 275: 9239-43
- Kress M, Huttenhofer A, Landry M, Kuner R, Favereaux A, et al. 2013. microRNAs in nociceptive circuits as predictors of future clinical applications. *Frontiers in molecular neuroscience* 6: 33
- Kumar P, Henikoff S, Ng PC. 2009. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nature protocols* 4: 1073-81
- Labrum RW, Rajakulendran S, Graves TD, Eunson LH, Bevan R, et al. 2009. Large scale calcium channel gene rearrangements in episodic ataxia and hemiplegic migraine: implications for diagnostic testing. *Journal of medical genetics* 46: 786-91
- Lafleur MA, Xu D, Hemler ME. 2009. Tetraspanin proteins regulate membrane type-1 matrix metalloproteinase-dependent pericellular proteolysis. *Molecular biology of the cell* 20: 2030-40
- Lauritzen M. 2001. Cortical spreading depression in migraine. *Cephalalgia : an international journal of headache* 21: 757-60
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R, Strong AJ. 2011. Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 31: 17-35
- Law C, Bunyan D, Castle B, Day L, Simpson I, et al. 2006. Clinical features in a family with an R460H mutation in transforming growth factor beta receptor 2 gene. *Journal of medical genetics* 43: 908-16
- Lea RA, Curtain RP, Hutchins C, Brimage PJ, Griffiths LR. 2001. Investigation of the CACNA1A gene as a candidate for typical migraine susceptibility. *American journal of medical genetics* 105: 707-12

- Lea RA, Shepherd AG, Curtain RP, Nyholt DR, Quinlan S, et al. 2002. A typical migraine susceptibility region localizes to chromosome 1q31. *Neurogenetics* 4: 17-22
- Lee SG, Kim K, Kegelmann TP, Dash R, Das SK, et al. 2011. Oncogene AEG-1 promotes glioma-induced neurodegeneration by increasing glutamate excitotoxicity. *Cancer research* 71: 6514-23
- Leo L, Gherardini L, Barone V, De Fusco M, Pietrobon D, et al. 2011. Increased susceptibility to cortical spreading depression in the mouse model of familial hemiplegic migraine type 2. *PLoS genetics* 7: e1002129
- Lett TA, Chakravarty MM, Felsky D, Brandl EJ, Tiwari AK, et al. 2013. The genome-wide supported microRNA-137 variant predicts phenotypic heterogeneity within schizophrenia. *Molecular psychiatry* 18: 443-50
- Lewis BP, Green RE, Brenner SE. 2003. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100: 189-92
- Li M, Niu F, Zhu X, Wu X, Shen N, et al. 2015. PRRT2 Mutant Leads to Dysfunction of Glutamate Signaling. *International journal of molecular sciences* 16: 9134-51
- Li W, Zhou Y, Tian X, Kim TY, Ito N, et al. 2012. New ataxic tottering-6j mouse allele containing a Cacna1a gene mutation. *PloS one* 7: e44230
- Liang Y, Ridzon D, Wong L, Chen C. 2007. Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC genomics* 8: 166
- Ligthart L, de Vries B, Smith AV, Ikram MA, Amin N, et al. 2011. Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts. *European journal of human genetics : EJHG*
- Lillis AP, Van Duyn LB, Murphy-Ullrich JE, Strickland DK. 2008. LDL receptor-related protein 1: unique tissue-specific functions revealed by selective gene knockout studies. *Physiological reviews* 88: 887-918
- Lin HY, Wang XF, Ng-Eaton E, Weinberg RA, Lodish HF. 1992. Expression cloning of the TGF-beta type II receptor, a functional transmembrane serine/threonine kinase. *Cell* 68: 775-85
- Lin X, Shah S, Bulleit RF. 1996. The expression of MEF2 genes is implicated in CNS neuronal differentiation. *Brain research. Molecular brain research* 42: 307-16
- Linde M, Gustavsson A, Stovner LJ, Steiner TJ, Barre J, et al. 2012. The cost of headache disorders in Europe: the Eurolight project. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 19: 703-11
- Lipton RB, Bigal ME. 2005. Migraine: epidemiology, impact, and risk factors for progression. *Headache* 45 Suppl 1: S3-S13
- Lipton RB, Diamond S, Reed M, Diamond ML, Stewart WF. 2001. Migraine diagnosis and treatment: results from the American Migraine Study II. *Headache* 41: 638-45
- Loder E, Rizzoli P. 2006. Biomarkers in migraine: their promise, problems, and practical applications. *Headache* 46: 1046-58

- Lugli G, Torvik VI, Larson J, Smalheiser NR. 2008. Expression of microRNAs and their precursors in synaptic fractions of adult mouse forebrain. *Journal of neurochemistry* 106: 650-61
- Lutsenko E, Bhagwat AS. 1999. Principal causes of hot spots for cytosine to thymine mutations at sites of cytosine methylation in growing cells. A model, its experimental support and implications. *Mutat Res* 437: 11-20
- MacGregor EA. 2004. Oestrogen and attacks of migraine with and without aura. *The Lancet. Neurology* 3: 354-61
- Maher BH, Griffiths LR. 2011. Identification of molecular genetic factors that influence migraine. *Mol Genet Genomics*
- Maher BH, Lea RA, Follett J, Cox HC, Fernandez F, et al. 2013. Association of a GRIA3 gene polymorphism with migraine in an Australian case-control cohort. *Headache* 53: 1245-9
- Maki H. 2002. Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses. *Annu Rev Genet* 36: 279-303
- Malsam J, Kreye S, Sollner TH. 2008. Membrane fusion: SNAREs and regulation. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 65: 2814-32
- Mantuano E, Romano S, Veneziano L, Gellera C, Castellotti B, et al. 2010. Identification of novel and recurrent CACNA1A gene mutations in fifteen patients with episodic ataxia type 2. *Journal of the neurological sciences* 291: 30-6
- Mantuano E, Veneziano L, Spadaro M, Giunti P, Guida S, et al. 2004. Clusters of non-truncating mutations of P/Q type Ca²⁺ channel subunit Ca(v)2.1 causing episodic ataxia 2. *Journal of medical genetics* 41: e82
- Marini C, Conti V, Mei D, Battaglia D, Lettori D, et al. 2012. PRRT2 mutations in familial infantile seizures, paroxysmal dyskinesia, and hemiplegic migraine. *Neurology* 79: 2109-14
- May A, Goadsby PJ. 1999. The trigeminovascular system in humans: pathophysiologic implications for primary headache syndromes of the neural influences on the cerebral circulation. *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism* 19: 115-27
- McCarthy MI, Abecasis GR, Cardon LR, Goldstein DB, Little J, et al. 2008. Genome-wide association studies for complex traits: consensus, uncertainty and challenges. *Nature reviews. Genetics* 9: 356-69
- McKee SC, Thompson CS, Sabourin LA, Hakim AM. 2006. Regulation of expression of early growth response transcription factors in rat primary cortical neurons by extracellular ATP. *Brain research* 1088: 1-11
- Meneret A, Gaudebout C, Riant F, Vidailhet M, Depienne C, Roze E. 2013. PRRT2 mutations and paroxysmal disorders. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies* 20: 872-8

- Mezghrani A, Monteil A, Watschinger K, Sinnegger-Brauns MJ, Barrere C, et al. 2008. A destructive interaction mechanism accounts for dominant-negative effects of misfolded mutants of voltage-gated calcium channels. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 28: 4501-11
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic acids research* 16: 1215
- Mishra PJ. 2009. MicroRNA polymorphisms: a giant leap towards personalized medicine. *Personalized medicine* 6: 119-25
- Mishra PJ, Mishra PJ, Banerjee D, Bertino JR. 2008. MiRSNPs or MiR-polymorphisms, new players in microRNA mediated regulation of the cell: Introducing microRNA pharmacogenomics. *Cell cycle* 7: 853-8
- Moskowitz MA. 1984. The neurobiology of vascular head pain. *Annals of neurology* 16: 157-68
- Moskowitz MA. 2007. Genes, proteases, cortical spreading depression and migraine: impact on pathophysiology and treatment. *Functional neurology* 22: 133-6
- Moskowitz MA. 2008. Molecular mechanism of migraine. *Rinsho Shinkeigaku* 48: 798
- Muinos-Gimeno M, Espinosa-Parrilla Y, Guidi M, Kagerbauer B, Sipila T, et al. 2011. Human microRNAs miR-22, miR-138-2, miR-148a, and miR-488 are associated with panic disorder and regulate several anxiety candidate genes and related pathways. *Biological psychiatry* 69: 526-33
- Muinos-Gimeno M, Montfort M, Bayes M, Estivill X, Espinosa-Parrilla Y. 2010. Design and evaluation of a panel of single-nucleotide polymorphisms in microRNA genomic regions for association studies in human disease. *European journal of human genetics : EJHG* 18: 218-26
- Mulder EJ, Van Baal C, Gaist D, Kallela M, Kaprio J, et al. 2003. Genetic and environmental influences on migraine: a twin study across six countries. *Twin Res* 6: 422-31
- Myocardial Infarction Genetics C, Kathiresan S, Voight BF, Purcell S, Musunuru K, et al. 2009. Genome-wide association of early-onset myocardial infarction with single nucleotide polymorphisms and copy number variants. *Nature genetics* 41: 334-41
- Nachbauer W, Nocker M, Karner E, Stankovic I, Unterberger I, et al. 2014. Episodic ataxia type 2: phenotype characteristics of a novel CACNA1A mutation and review of the literature. *Journal of neurology* 261: 983-91
- Nosedá R, Burstein R. 2013. Migraine pathophysiology: anatomy of the trigeminovascular pathway and associated neurological symptoms, cortical spreading depression, sensitization, and modulation of pain. *Pain* 154 Suppl 1: S44-53
- Nyholt DR, Gillespie NG, Heath AC, Merikangas KR, Duffy DL, Martin NG. 2004. Latent class and genetic analysis does not support migraine with aura and migraine without aura as separate entities. *Genet Epidemiol* 26: 231-44

- Nyholt DR, LaForge KS, Kallela M, Alakurtti K, Anttila V, et al. 2008. A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet* 17: 3318-31
- Nyholt DR, Lea RA, Goadsby PJ, Brimage PJ, Griffiths LR. 1998. Familial typical migraine: linkage to chromosome 19p13 and evidence for genetic heterogeneity. *Neurology* 50: 1428-32
- O'Connor RM, Dinan TG, Cryan JF. 2012. Little things on which happiness depends: microRNAs as novel therapeutic targets for the treatment of anxiety and depression. *Molecular psychiatry* 17: 359-76
- Olesen J, Friberg L, Olsen TS, Iversen HK, Lassen NA, et al. 1990. Timing and topography of cerebral blood flow, aura, and headache during migraine attacks. *Annals of neurology* 28: 791-8
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, et al. 1996. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca²⁺ channel gene CACNL1A4. *Cell* 87: 543-52
- Page KM, Heblich F, Davies A, Butcher AJ, Leroy J, et al. 2004. Dominant-negative calcium channel suppression by truncated constructs involves a kinase implicated in the unfolded protein response. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 24: 5400-9
- Page KM, Heblich F, Margas W, Pratt WS, Nieto-Rostro M, et al. 2010. N terminus is key to the dominant negative suppression of Ca(V)₂ calcium channels: implications for episodic ataxia type 2. *The Journal of biological chemistry* 285: 835-44
- Panconesi A. 2008. Serotonin and migraine: a reconsideration of the central theory. *The journal of headache and pain* 9: 267-76
- Parsons AA, Strijbos PJ. 2003. The neuronal versus vascular hypothesis of migraine and cortical spreading depression. *Current opinion in pharmacology* 3: 73-7
- Pietrobon D. 2010. CaV_{2.1} channelopathies. *Pflugers Arch* 460: 375-93
- Pietrobon D. 2013. Calcium channels and migraine. *Biochimica et biophysica acta* 1828: 1655-65
- Pietrobon D, Striessnig J. 2003. Neurobiology of migraine. *Nature reviews. Neuroscience* 4: 386-98
- Rajakulendran S, Graves TD, Labrum RW, Kotzadimitriou D, Eunson L, et al. 2010. Genetic and functional characterisation of the P/Q calcium channel in episodic ataxia with epilepsy. *J Physiol* 588: 1905-13
- Rajakulendran S, Kaski D, Hanna MG. 2012. Neuronal P/Q-type calcium channel dysfunction in inherited disorders of the CNS. *Nat Rev Neurol* 8: 86-96
- Ran C, Graae L, Magnusson PK, Pedersen NL, Olson L, Belin AC. 2014. A replication study of GWAS findings in migraine identifies association in a Swedish case-control sample. *BMC medical genetics* 15: 38

- Rapoport AM. 2008. Acute and prophylactic treatments for migraine: present and future. *Neurological sciences : official journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology* 29 Suppl 1: S110-22
- Riant F, De Fusco M, Aridon P, Ducros A, Ploton C, et al. 2005. ATP1A2 mutations in 11 families with familial hemiplegic migraine. *Human mutation* 26: 281
- Riant F, Ducros A, Ploton C, Barbance C, Depienne C, Tournier-Lasserre E. 2010a. De novo mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine. *Neurology* 75: 967-72
- Riant F, Lescoat C, Vahedi K, Kaphan E, Toutain A, et al. 2010b. Identification of CACNA1A large deletions in four patients with episodic ataxia. *Neurogenetics* 11: 101-6
- Riant F, Mourtada R, Saugier-veber P, Tournier-Lasserre E. 2008. Large CACNA1A deletion in a family with episodic ataxia type 2. *Arch Neurol* 65: 817-20
- Riant F, Roze E, Barbance C, Meneret A, Guyant-Marechal L, et al. 2012. PRRT2 mutations cause hemiplegic migraine. *Neurology* 79: 2122-4
- Rist PM, Diener HC, Kurth T, Schurks M. 2011. Migraine, migraine aura, and cervical artery dissection: a systematic review and meta-analysis. *Cephalalgia : an international journal of headache* 31: 886-96
- Rojas-Rivera D, Armisen R, Colombo A, Martinez G, Eguiguren AL, et al. 2012. TMBIM3/GRINA is a novel unfolded protein response (UPR) target gene that controls apoptosis through the modulation of ER calcium homeostasis. *Cell death and differentiation* 19: 1013-26
- Rozanov DV, Hahn-Dantona E, Strickland DK, Strongin AY. 2004. The low density lipoprotein receptor-related protein LRP is regulated by membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) proteolysis in malignant cells. *The Journal of biological chemistry* 279: 4260-8
- Rubino E, Ferrero M, Rainero I, Binello E, Vaula G, Pinessi L. 2009. Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with migraine: a meta-analysis. *Cephalalgia : an international journal of headache* 29: 818-25
- Russell MB. 2005. Tension-type headache in 40-year-olds: a Danish population-based sample of 4000. *The journal of headache and pain* 6: 441-7
- Russell MB. 2007. Genetics in primary headaches. *The journal of headache and pain* 8: 190-5
- Russell MB, Ducros A. 2011. Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management. *The Lancet. Neurology* 10: 457-70
- Russell MB, Olesen J. 1995. Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine. *BMJ* 311: 541-4
- Russell MB, Rasmussen BK, Thorvaldsen P, Olesen J. 1995. Prevalence and sex-ratio of the subtypes of migraine. *Int J Epidemiol* 24: 612-8

- Russell MB, Ulrich V, Gervil M, Olesen J. 2002. Migraine without aura and migraine with aura are distinct disorders. A population-based twin survey. *Headache* 42: 332-6
- Sacco S, Olivieri L, Bastianello S, Carolei A. 2006. Comorbid neuropathologies in migraine. *The journal of headache and pain* 7: 222-30
- Schreiner A, Ruonala M, Jakob V, Suthaus J, Boles E, et al. 2007. Junction protein shrew-1 influences cell invasion and interacts with invasion-promoting protein CD147. *Molecular biology of the cell* 18: 1272-81
- Sherman EA, Strauss KA, Tortorelli S, Bennett MJ, Knerr I, et al. 2008. Genetic mapping of glutaric aciduria, type 3, to chromosome 7 and identification of mutations in c7orf10. *American journal of human genetics* 83: 604-9
- Sintas C, Carreno O, Fernandez-Morales J, Cacheiro P, Sobrido MJ, et al. 2012. A replication study of a GWAS finding in migraine does not identify association in a Spanish case-control sample. *Cephalalgia : an international journal of headache* 32: 1076-80
- Sintas C, Fernandez-Morales J, Vila-Pueyo M, Narberhaus B, Arenas C, et al. 2014. Replication study of previous migraine genome-wide association study findings in a Spanish sample of migraine with aura. *Cephalalgia : an international journal of headache*
- Soong TW, DeMaria CD, Alvania RS, Zweifel LS, Liang MC, et al. 2002. Systematic identification of splice variants in human P/Q-type channel alpha1(2.1) subunits: implications for current density and Ca²⁺-dependent inactivation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 22: 10142-52
- Soreq H, Wolf Y. 2011. NeurimmiRs: microRNAs in the neuroimmune interface. *Trends in molecular medicine* 17: 548-55
- Spacey S. 1993. Episodic Ataxia Type 2 In *GeneReviews(R)*, ed. RA Pagon, MP Adam, HH Ardinger, TD Bird, CR Dolan, et al. Seattle (WA)
- Spacey SD, Hildebrand ME, Materek LA, Bird TD, Snutch TP. 2004. Functional implications of a novel EA2 mutation in the P/Q-type calcium channel. *Annals of neurology* 56: 213-20
- Spacey SD, Materek LA, Szczygielski BI, Bird TD. 2005. Two novel CACNA1A gene mutations associated with episodic ataxia type 2 and interictal dystonia. *Arch Neurol* 62: 314-6
- Spierings EL. 2009. Migraine: migraine headache pathogenesis in historical perspective. *Reviews in neurological diseases* 6: E77-80
- Stam AH, Louter MA, Haan J, de Vries B, van den Maagdenberg AM, et al. 2011. A long-term follow-up study of 18 patients with sporadic hemiplegic migraine. *Cephalalgia : an international journal of headache* 31: 199-205
- Stovner LJ, Andree C. 2010. Prevalence of headache in Europe: a review for the Eurolight project. *The journal of headache and pain* 11: 289-99
- Suzuki M, Van Paesschen W, Stalmans I, Horita S, Yamada H, et al. 2010. Defective membrane expression of the Na⁽⁺⁾-HCO₃⁽⁻⁾ cotransporter NBCe1 is associated

- with familial migraine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 15963-8
- Svensson DA, Larsson B, Waldenlind E, Pedersen NL. 2003. Shared rearing environment in migraine: results from twins reared apart and twins reared together. *Headache* 43: 235-44
- Tao J, Liu P, Xiao Z, Zhao H, Gerber BR, Cao YQ. 2012. Effects of familial hemiplegic migraine type 1 mutation T666M on voltage-gated calcium channel activities in trigeminal ganglion neurons. *J Neurophysiol* 107: 1666-80
- Tavraz NN, Friedrich T, Durr KL, Koenderink JB, Bamberg E, et al. 2008. Diverse functional consequences of mutations in the Na⁺/K⁺-ATPase alpha2-subunit causing familial hemiplegic migraine type 2. *The Journal of biological chemistry* 283: 31097-106
- Terwindt G, Kors E, Haan J, Vermeulen F, Van den Maagdenberg A, et al. 2002. Mutation analysis of the CACNA1A calcium channel subunit gene in 27 patients with sporadic hemiplegic migraine. *Arch Neurol* 59: 1016-8
- Thomsen LL, Kirchmann M, Bjornsson A, Stefansson H, Jensen RM, et al. 2007. The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine. *Brain* 130: 346-56
- Thomsen LL, Oestergaard E, Bjornsson A, Stefansson H, Fasquel AC, et al. 2008. Screen for CACNA1A and ATP1A2 mutations in sporadic hemiplegic migraine patients. *Cephalalgia : an international journal of headache* 28: 914-21
- Tottene A, Fellin T, Pagnutti S, Luvisetto S, Striessnig J, et al. 2002. Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca²⁺ influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 13284-9
- Tottene A, Pivotto F, Fellin T, Cesetti T, van den Maagdenberg AM, Pietrobon D. 2005. Specific kinetic alterations of human CaV2.1 calcium channels produced by mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma. *The Journal of biological chemistry* 280: 17678-86
- Ulrich V, Gervil M, Kyvik KO, Olesen J, Russell MB. 1999. Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study. *Annals of neurology* 45: 242-6
- Urbach A, Bruehl C, Witte OW. 2006. Microarray-based long-term detection of genes differentially expressed after cortical spreading depression. *The European journal of neuroscience* 24: 841-56
- Vahedi K, Depienne C, Le Fort D, Riant F, Chaine P, et al. 2009. Elicited repetitive daily blindness: a new phenotype associated with hemiplegic migraine and SCN1A mutations. *Neurology* 72: 1178-83
- van den Maagdenberg AM, Kors EE, Brunt ER, van Paesschen W, Pascual J, et al. 2002. Episodic ataxia type 2. Three novel truncating mutations and one novel missense mutation in the CACNA1A gene. *Journal of neurology* 249: 1515-9

- van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, et al. 2004. A Cacna1a knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41: 701-10
- van den Maagdenberg AM, Pizzorusso T, Kaja S, Terpolilli N, Shapovalova M, et al. 2010. High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Ca(v)2.1 S218L mice. *Annals of neurology* 67: 85-98
- Vanmolkot KR, Babini E, de Vries B, Stam AH, Freilinger T, et al. 2007. The novel p.L1649Q mutation in the SCN1A epilepsy gene is associated with familial hemiplegic migraine: genetic and functional studies. Mutation in brief #957. Online. *Human mutation* 28: 522
- Veneziano L, Albertosi S, Pesci D, Mantuano E, Frontali M, Jodice C. 2011. Dramatically different levels of Cacna1a gene expression between pre-weaning wild type and leaner mice. *Journal of the neurological sciences* 305: 71-4
- Veneziano L, Guida S, Mantuano E, Bernard P, Tarantino P, et al. 2009. Newly characterised 5' and 3' regions of CACNA1A gene harbour mutations associated with Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia. *Journal of the neurological sciences* 276: 31-7
- Vergoulis T, Vlachos IS, Alexiou P, Georgakilas G, Maragkakis M, et al. 2012. TarBase 6.0: capturing the exponential growth of miRNA targets with experimental support. *Nucleic acids research* 40: D222-9
- Vila-Pueyo M, Pons R, Raspall-Chaure M, Marce-Grau A, Carreno O, et al. 2014. Clinical and genetic analysis in alternating hemiplegia of childhood: Ten new patients from Southern Europe. *Journal of the neurological sciences*
- Vila-Pueyo M, Fernández-Castillo N, Queiros A, Kulis M, et al. 2015. Epigenetic changes in a rat model of migraine with aura. *Epigenetics*. Submitted article.
- Vos T, Flaxman AD, Naghavi M, Lozano R, Michaud C, et al. 2012. Years lived with disability (YLDs) for 1160 sequelae of 289 diseases and injuries 1990-2010: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2010. *Lancet* 380: 2163-96
- Wada T, Kobayashi N, Takahashi Y, Aoki T, Watanabe T, Saitoh S. 2002. Wide clinical variability in a family with a CACNA1A T666m mutation: hemiplegic migraine, coma, and progressive ataxia. *Pediatric neurology* 26: 47-50
- Walker D, Bichet D, Campbell KP, De Waard M. 1998. A beta 4 isoform-specific interaction site in the carboxyl-terminal region of the voltage-dependent Ca²⁺ channel alpha 1A subunit. *The Journal of biological chemistry* 273: 2361-7
- Wan J, Mamsa H, Johnston JL, Spriggs EL, Singer HS, et al. 2011. Large Genomic Deletions in CACNA1A Cause Episodic Ataxia Type 2. *Front Neurol* 2: 51
- Wang G, Wang Y, Shen C, Huang YW, Huang K, et al. 2010. RNA polymerase II binding patterns reveal genomic regions involved in microRNA gene regulation. *PloS one* 5: e13798

- Wappl E, Koschak A, Poteser M, Sinnegger MJ, Walter D, et al. 2002. Functional consequences of P/Q-type Ca²⁺ channel Cav2.1 missense mutations associated with episodic ataxia type 2 and progressive ataxia. *The Journal of biological chemistry* 277: 6960-6
- Weiss N, Sandoval A, Felix R, Van den Maagdenberg A, De Waard M. 2008. The S218L familial hemiplegic migraine mutation promotes deinhibition of Ca(v)2.1 calcium channels during direct G-protein regulation. *Pflugers Arch* 457: 315-26
- Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, Palotie A, Ophoff RA. 2007. Migraine: a complex genetic disorder. *The Lancet. Neurology* 6: 521-32
- Wilson PM, Fryer RH, Fang Y, Hatten ME. 2010. Astn2, a novel member of the astrotactin gene family, regulates the trafficking of ASTN1 during glial-guided neuronal migration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30: 8529-40
- Wood H. 2012. Genetics: expanding the spectrum of neurological disorders associated with PRRT2 mutations. *Nat Rev Neurol* 8: 657
- Xiao F, Zuo Z, Cai G, Kang S, Gao X, Li T. 2009. miRecords: an integrated resource for microRNA-target interactions. *Nucleic acids research* 37: D105-10
- Yabe I, Kitagawa M, Suzuki Y, Fujiwara K, Wada T, et al. 2008. Downbeat positioning nystagmus is a common clinical feature despite variable phenotypes in an FHM1 family. *Journal of neurology* 255: 1541-4
- Yamazaki S, Ikeno K, Abe T, Tohyama J, Adachi Y. 2011. Hemiconvulsion-hemiplegia-epilepsy syndrome associated with CACNA1A S218L mutation. *Pediatric neurology* 45: 193-6
- Zondervan KT, Cardon LR. 2004. The complex interplay among factors that influence allelic association. *Nature reviews. Genetics* 5: 89-100

APÈNDIX 1

APÈNDIX 1. TRANSCRIPTÒMICA EN UN MODEL ANIMAL DE CSD

La depressió cortical propagant (*Cortical Spreading Depression*, CSD) és un fenomen neurofisiològic estretament lligat a l'aura migranyosa. Consisteix en una ona de despolarització neuronal i glial de curta durada que es propaga a través de l'escorça, seguida d'una ona de depressió de l'activitat. En aquesta tesi se'n parla amb més detall a l'apartat 2.3 de la Introducció.

Tot i que els estudis que presentem aquí s'han centrat fonamentalment en la recerca sobre les bases genètiques de la migranya, també hem volgut explorar la seva fisiopatologia (utilitzant eines genètiques), camp on també hi ha encara moltes incògnites. Així, els equips investigadors de l'Institut de Recerca de l'Hospital Vall d'Hebron (VHIR) i de la Universitat de Barcelona (UB) implicats en aquest projecte vam dissenyar un model de CSD en rata per assajar els efectes de la CSD a nivell metilòmic i transcriptòmic. També es pretenia explorar els efectes del tractament profilàctic de la CSD amb dos fàrmacs (topiramate - TPM i àcid valproic - VPA) (Ayata et al. 2006, Bogdanov et al. 2011). L'objectiu era, en primer lloc, determinar si l'administració dels fàrmacs induïa canvis en el número i la freqüència de les ones de despolarització. I, en segon lloc, si es produïen alteracions en els patrons de metilació i d'expressió gènica a curt termini com a conseqüència de la CSD i de l'acció dels fàrmacs. En aquest annex es presenten els resultats preliminars de l'estudi de transcriptòmica, dut a terme al laboratori de genètica de la UB.

1. DISSENY EXPERIMENTAL I METODOLOGIA

1.1. Model animal i obtenció de mostres

Per a l'estudi del model animal es van emprar 36 exemplars de rata mascle Sprague-Dawley, que rebrien el tractament diari amb el fàrmac corresponent via intraperitoneal durant quatre setmanes abans de la inducció de la CSD. El laboratori del VHIR va ser l'encarregat de generar el model animal (Vila-Pueyo et al. 2015). Les rates es van distribuir en quatre grups: 1) *Sham-operated* (SHAM): injecció de salí, cirurgia, no-inducció de CSD; 2) Salí (SER): injecció de salí, cirurgia, inducció de CSD; 3) VPA: injecció d'àcid valproic, cirurgia, inducció de CSD; 4) TPM: injecció de topiramate, cirurgia, inducció de CSD.

La CSD es va induir químicament a l'escorça dreta amb KCl 1M durant una hora (sèrum en cas de no induir-se la CSD), durant la qual es van prendre els registres electrofisiològics (Urbach et al. 2006). Passada l'hora, se'ls practicà l'eutanàsia s'extragueren les estructures d'escorça dreta, escorça esquerra i tronc encefàlic i es van congelar de forma immediata en

nitrogen líquid. Les mostres biològiques de teixit nerviós es van dividir per tal de dur a terme els dos estudis paral·lels d'anàlisi metilòmica (VHIR) i transcriptòmica (UB).

Les mostres de teixit de cada estructura (escorça dreta, escorça esquerra i tronc encefàlic) es van homogeneïtzar utilitzant el sistema TissueRuptor de Qiagen (Düsseldorf, Alemanya) i per a l'obtenció de mostres de RNA es va fer servir el kit comercial RNeasy® Lipid Tissue Mini Kit de QIAGEN (Düsseldorf, Alemanya). La concentració d'RNA es va determinar amb l'espectrofotòmetre NanoDrop ND-1000 (Nanodrop Technologies. Wilmington, DE, USA) i la integritat/qualitat de les mostres per a *microarrays* es va quantificar amb la plataforma Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies. Santa Clara, CA, USA).

1.2. Anàlisi de *microarrays* i bioinformàtica

Per a l'estudi de transcriptòmica vam seleccionar 6 mostres/grup de les estructures de l'escorça dreta i tronc encefàlic (un total de 48 mostres), que es van hibridar amb els xips GeneChip Rat Genome 230 2.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) a la Unitat de Genòmica de l'Hospital Clínic-IDIBAPS. Aquest xip permet interrogar un total de 30.000 transcrits corresponents a uns 28.000 gens de rata.

L'anàlisi de les dades dels xips es va dur a terme amb el *software* Bioconductor per a R (bioconductor.org). Es van fer diverses anàlisis per valorar la qualitat de les hibridacions i excloure possibles problemes experimentals utilitzant la llibreria *affyPLM*: es va verificar la homogeneïtat dels experiments, es van comparar perfils d'expressió mitjançant histogrames, es van comparar les mitjanes i els percentils dels valors d'expressió global amb *boxplots*, es va comprovar la homogeneïtat inter-xip dels patrons de degradació de l'RNA i de la topologia de punts amb el gràfic MA *plot*, entre d'altres controls. Es va procedir posteriorment a la correcció del soroll de fons, normalització i sumarització mitjançant el *background method*, *Robust Multichip Average* (RMA) i el mètode *medianpolish*, respectivament. Es van descartar els gens que no corresponien a gens coneguts. Finalment, es van aplicar els següents filtres: el primer, pel senyal de la sonda, utilitzant un llindar d'expressió de $\log_2(100)$, amb l'objectiu de descartar els gens poc modificats; el segon, per variabilitat, per descartar els gens que presentaven una variació d'expressió inferior al 20% entre xips (*Interquartile range*, $IQR < 20\%$).

Per a les comparacions es va utilitzar la llibreria *Linear Modeling for Microarray Analysis* (LIMMA) de *Bioconductor*, i es van contrastar els patrons d'expressió dels diferents grups: 1) Efecte de la CSD: SER-SHAM, TPM-SHAM, VPA-SHAM, 2) efecte dels fàrmacs: TPM-SER, VPA-SER, i 3) diferències en l'efecte dels fàrmacs: TPM-VPA. Es van aplicar correccions per tests múltiples amb el mètode *False Discovery Rate* (FDR, 5%).

Per a l'anàlisi bioinformàtica dels resultats es van utilitzar diferents eines: 1) Sobrerepresentació de grups funcionals amb DAVID i Gene Ontology (GO), 2) Vies sobrerepresentades (*KEGG pathways*) amb el *software* WebGESTALT, i 3) Construcció de xarxes gèniques amb *Ingenuity Pathway Analysis* (IPA) 8.8.

1.3. Validació

Per confirmar els resultats més rellevants obtinguts en l'estudi de *microarrays*, les mostres de RNA de totes les estructures es van retrotranscriure a cDNA amb el High Capacity cDNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) per dur a terme els experiments de PCR a temps real (qPCR). Els experiments de qPCR es van dur a terme amb el sistema LightCycler 480 II i els resultats s'han analitzat amb el *software* Universal Probe Library Assay Design Center (Roche Applied Science, www.roche-applied-science.com).

Per a la validació vam seleccionar nou gens de l'escorça dreta (*Btg2*, *Egr2*, *Mapk10*, *Ntrk2*, *Crem*, *Gadd45g*, *Homer1*, *Egr4* i *Sgk*) i tres del tronc encefàlic (*Btg2*, *Gadd45g* i *Sgk*), a més de dos controls endògens comuns per a ambdues estructures (*Ywhaz* i *Pgk1*). Els gens validats a l'escorça dreta s'assajaran properament també a l'escorça esquerra amb l'objectiu de determinar si els canvis en els patrons d'expressió passen a l'hemisferi on no s'indueix la CSD.

2. RESULTATS PRELIMINARS

2.1. Escorça dreta

L'escorça dreta és l'estructura cerebral on s'indueix químicament la CSD. Esperem, per tant, trobar patrons d'expressió alterats que ens ajudin a descriure genèticament els canvis que s'hi donen.

L'anàlisi dels experiments de *microarrays* de l'escorça dreta ha revelat canvis significatius en els nivells d'expressió de 665 gens en la comparació SER-SHAM, 851 per TPM-SHAM i 570 per VPA-SHAM, 500 dels quals són comuns per a les tres comparacions, i correspondrien als canvis produïts per la CSD (Figura A1 i Taula A1). En comparar els dos grups tractats amb fàrmacs (TPM-VPA), que senyalarien les diferències derivades de l'ús d'un o altre fàrmac, s'han observat 60 gens alterats. En comparar els grups tractats amb fàrmacs amb el grup SER, per estudiar si hi ha canvis en l'expressió gènica quan s'indueix la CSD sota una condició de tractament profilàctic, només s'ha observat un gen en la comparació TPM-SER i cap en VPA-SER.

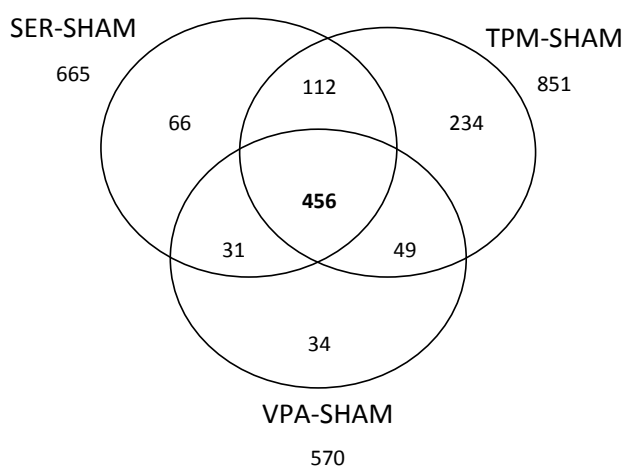


Figura A1. Venn diagram de l'escorça dreta resultant de les comparacions SER-SHAM, TPM-SHAM i VPA-SHAM, amb el nombre de gens que presenten canvis d'expressió significatius per a cada grup. S'indiquen els gens que presenten canvis de forma simultània en dues o en tres comparacions.

En les anàlisis bioinformàtiques posteriors, on s'han utilitzat programes com DAVID, GO o IPA i els llistats de gens obtinguts en cadascuna de les comparacions per separat i els comuns, hem observat sobrerepresentació de gens implicats en la regulació de la transcripció (*Btg2*, *Jun*, *Fos*, *Atf3*, *Egr2*), resposta a substàncies orgàniques (*Ccl2*, *Cdkn1a*, *Nr4a3*), desenvolupament vascular (*Plat*, *Srf*, *Col1a2*) i plasticitat i transmissió sinàptica (*Bdnf*, *Ntrk2*, *Camk2a*) (Figura A2). Aquests resultats coincideixen amb anteriors publicacions de models animals i cel·lulars de CSD (Urbach et al. 2006) (McKee et al. 2006), en què

s'observen canvis en l'expressió de gens que també detectem en el nostre estudi (*Egr1*, *Arc*, *Fosl2*, *Crem*, *Btg2*, *Gadd45g*) (Figura A2).

Taula A1. Gens més sobre- (vermell) o sota-expressats (verd) a les tres comparacions de l'escorça (hi consten els 10 primers gens de cada comparació en els casos en què n'hi havia més). En tots els casos, el valor de fold-change és superior a 1.6.

SER-SHAM			TPM-SHAM			VPA-SHAM		
ID	Gene	Fold-change	ID	Gene	Fold-change	ID	Gene	Fold-change
1381511_at	Slc8a2	-1,69976641	1370155_at	Col1a2	-1,94973209	1374529_at	Thbs1	4,03785835
1367948_a_at	Kdr	-1,65893436	1387854_at	Col1a2	-1,92042484	1387788_at	Junb	4,20452551
1393371_at	Zfp54_predicted	-1,61237721	1381511_at	Slc8a2	-1,69526346	1380063_at	Ch25h	4,29206522
			1383517_at	Mtap7_predicted	-1,65592462	1370832_at	Ccl4	4,45136005
1386995_at	Btg2	4,82372279	1380250_at	Sned1	-1,63160836	1367896_at	Ca3	4,92095833
1368527_at	Ptgs2	5,19990368	1367948_a_at	Kdr	-1,63068034	1368527_at	Ptgs2	5,27197014
1387788_at	Junb	5,3566599	1376917_at	Znf292	-1,62295061	1375043_at	Fos	6,08178662
1380063_at	Ch25h	5,48747857	1370959_at	Col3a1	-1,62126149	1370997_at	Homer1	6,62420445
1368147_at	Dusp1	5,54439368	1395083_at	Nova1	-1,60166741	1388792_at	Gadd45g	7,271186
1370832_at	Ccl4	5,64838411				1387306_a_at	Egr2	8,13926601
1370997_at	Homer1	6,84700326	1367973_at	Ccl2	5,88654859			
1375043_at	Fos	7,03027294	1380063_at	Ch25h	6,06462231			
1387306_a_at	Egr2	9,45081076	1385407_at	Tiparp_predicted	6,26814998			
1388792_at	Gadd45g	10,1311897	1387788_at	Junb	6,31468645			
			1368527_at	Ptgs2	6,60544428			
			1375043_at	Fos	7,59915234			
			1370832_at	Ccl4	7,81719323			
			1370997_at	Homer1	7,91445605			
			1387306_a_at	Egr2	10,4812785			
			1388792_at	Gadd45g	12,3138688			

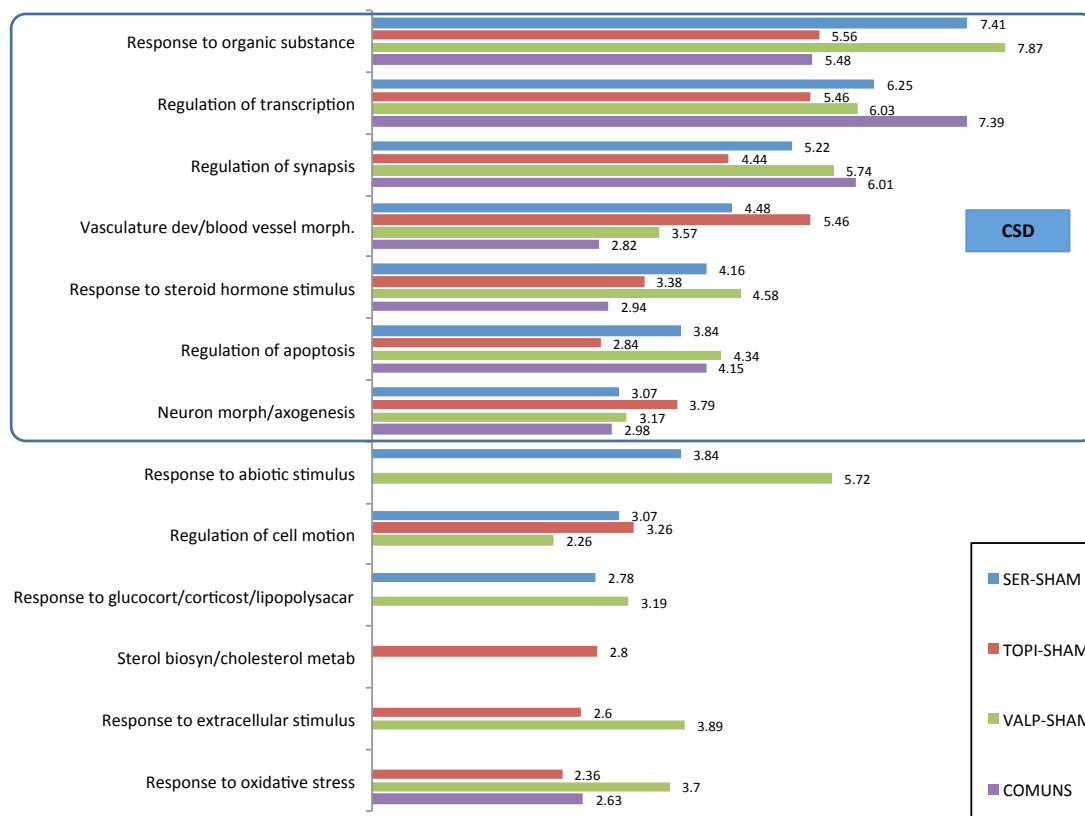


Figura A2. Representació gràfica dels resultats dels grups funcionals més representats en les tres comparacions de l'escorça dreta utilitzant DAVID. En la resta de comparacions els grups estaven poc enriquits i no eren significatius.

2.2. Tronc encefàlic

En el cas de les comparacions en el tronc encefàlic, no són tants els gens que experimenten canvis en la seva expressió. Hem de tenir en compte, en aquest punt, que malgrat la implicació d'aquesta estructura en la CSD, aquesta s'indueix a l'escorça i l'estudi es realitza a curt termini, raó per la qual és possible que els canvis en els patrons d'expressió, si n'hi ha, poden ser més tardans.

S'han observat canvis significatius en 98 gens per a la comparació SER-SHAM, 62 en TPM-SHAM i 68 en VPA-SHAM (Figura A3 i Taula A2). La resta de comparacions no ha mostrat diferències significatives en l'expressió gènica.

Els gens pertanyents a les vies de regulació de l'apoptosi són els més destacats en tots els casos que hem considerat a les anàlisis bioinformàtiques (*Gadd45g*, *Sgk1*, *Ccnd1*) (Figura A4).

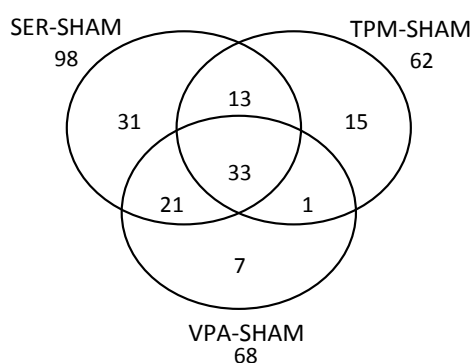


Figura A3. Venndiagram del tronc encefàlic resultant de les comparacions SER-SHAM, TPM-SHAM i VPA-SHAM, amb el nombre de gens que presenten canvis d'expressió significatius per a cada grup. S'indiquen els gens que presenten canvis de forma simultània en dues o en tres comparacions.

Taula A2. Gens més sobre- (vermell) o sota-expressats (verd) a les tres comparacions del tronc encefàlic (hi consten els 10 primers gens de cada comparació en els casos en què n'hi havia més). En tots els casos, el valor de fold-change és superior a 1.6.

SER-SHAM			TPM-SHAM			VPA-SHAM		
ID	Gene	Fold-change	ID	Gene	Fold-change	ID	Gene	Fold-change
1369407_at	Tnfrsf11b	-2,63923442	1369407_at	Tnfrsf11b	-2,14740335	1369407_at	Tnfrsf11b	-2,74966031
1390412_at	Slc40a1	-1,86608435	1390412_at	Slc40a1	-1,89465937	1390412_at	Slc40a1	-1,99916341
1383075_at	Ccnd1	-1,77050952	1391323_at	Tf	-1,81900158	1387130_at	Slc40a1	-1,68680956
1396630_at	LOC500532	-1,67908201	1386995_at	Btg2	-1,75288044			
1393179_at	Flt1	-1,64155331				1396017_at	LOC313672	1,61898498
1386995_at	Btg2	-1,62846273	1393128_at	RGD1311086	1,67886264	1388674_at	Cdkn1a	1,69519836
			1385229_at	Pcdh20_predicted	1,7550968	1393128_at	RGD1311086	1,75844937
1369200_at	Nt5e	1,72406767	1391208_at	Pcdh20_predicted	1,79614746	1367650_at	Lcn7	1,76954028
1385229_at	Pcdh20_predicted	1,75046801	1371363_at	Gpd1	1,9033871	1387028_a_at	ld1	1,7968494
1388674_at	Cdkn1a	1,78203565	1376481_at	Adamts9_predicted	2,08050607	1373093_at	Errf1	1,83934142
1389538_at	Nfkbia	1,84428051	1367802_at	Sgk	2,66227979	1371363_at	Gpd1	1,91786969
1388901_at	Fkbp5	1,92640735				1387260_at	Klf4	2,1214743
1393128_at	RGD1311086	1,99153647				1376481_at	Adamts9_predicted	2,1426693
1373093_at	Errf1	2,040857				1367802_at	Sgk	3,47976891
1376481_at	Adamts9_predicted	2,05935065						
1371363_at	Gpd1	2,19758337						
1367802_at	Sgk	3,84657943						

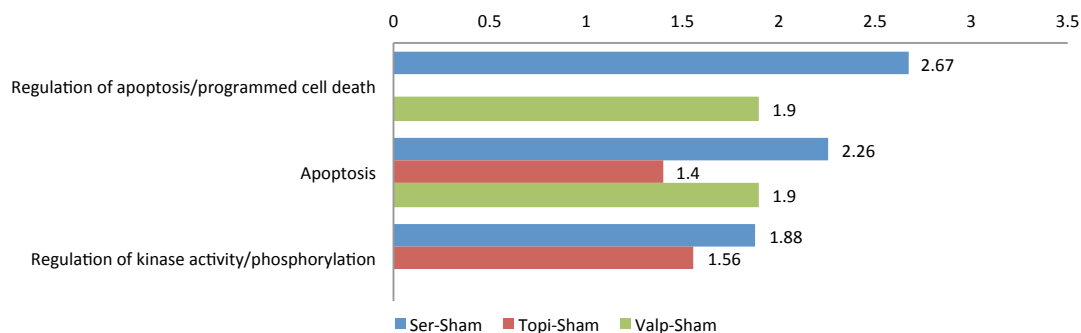


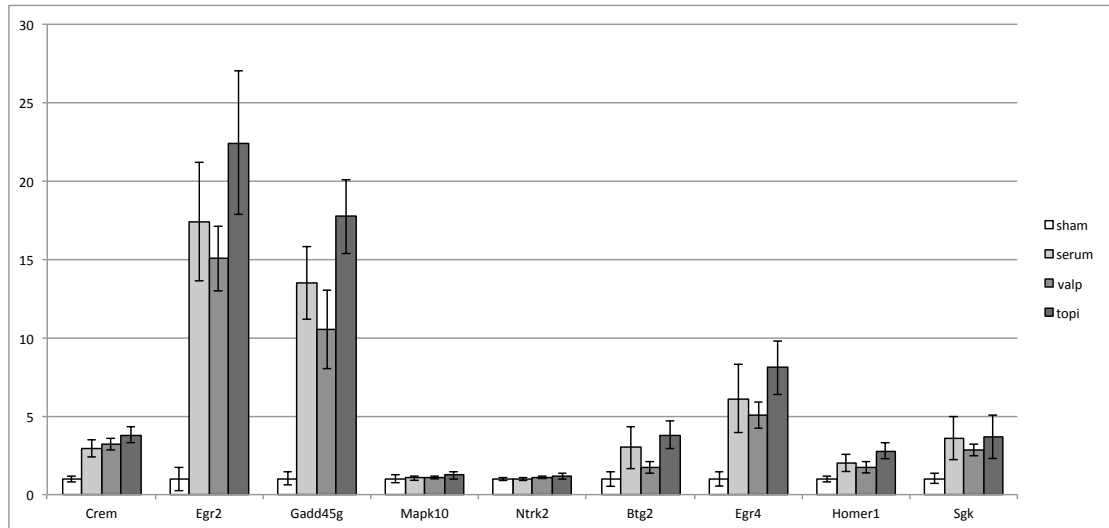
Figura A4. Gràfic de resultats dels grups mïes representats utilitzant DAVID en les tres comparacions del tronç encefàlic. En la resta de comparacions els grups estaven poc enriquits i no eren significatius.

2.3. Validació dels resultats

La validació dels resultats dels experiments de *microarrays* es va fer en un total de 9 mostres de cada grup: les mateixes sis que s'havien utilitzat en els *microarrays* i tres més, per tal de reforçar els resultats. Hi ha, per tant, sis rèpliques tècniques i 3 rèpliques biològiques.

De moment només s'ha dut a terme la validació d'una selecció de gens diferencialment expressats a nivell de l'escorça dreta: *Btg2*, *Egr2*, *Mapk10*, *Ntrk2*, *Crem*, *Gadd45g*, *Homer1*, *Egr4* i *Sgk*. D'aquests, se n'han validat correctament set en tots els grups, tret d'un per a la comparació VPA-SHAM. A la Figura A5 es presenta un resum dels resultats de validació per aquesta estructura. La confirmació, en gairebé tots els gens que hem seleccionat, dels resultats obtinguts amb els *microarrays* dóna validesa a l'estudi a nivell global. És a dir, fem extensiva la validació d'una mostra petita dels resultats a tots els resultats obtinguts.

Queda pendent la validació dels gens diferencialment expressats en el tronç encefàlic, i es procedirà també a l'assaig de l'expressió dels gens validats en escorça dreta en l'estructura esquerra, amb l'objectiu de determinar si els efectes de la CSD que hem induït en un hemisferi es traslladen a l'altre hemisferi.



	Creb	Egr2	Gadd45g	Mapk10	Ntrk2	Btg2	Egr4	Homer1	Sgk	
valors normalitzats	sham	1	1	1	1	1	1	1	1	
	serum	2.96028704	17.4373683	13.4905124	1.04504126	0.98432082	3.00822748	6.11345423	2.02985054	3.60964222
	valp	3.20263039	15.0611414	10.5458805	1.0922044	1.11879366	1.72041416	5.04727321	1.74583314	2.83734793
	topi	3.79679406	22.4400856	17.7339602	1.24032597	1.14596276	3.81359295	8.08270869	2.78247296	3.67345334
desvest norm	sham	0.217	0.755	0.424	0.240	0.131	0.485551	0.45411227	0.20810055	0.32540343
	serum	0.558	3.802	2.340	0.134	0.109	1.35101144	2.17308765	0.55625746	1.37808311
	valp	0.377	2.068	2.529	0.090	0.092	0.35556539	0.82379122	0.36259257	0.36476999
	topi	0.510	4.564	2.355	0.254	0.184	0.91595405	1.69674863	0.52358325	1.37166503
coeficient variació		1.3512187	3.05362025	1.79798324	1.41077646	1.18978502	1.96128926	1.95667591	1.33385362	1.59345394

Figura A5. Resultats preliminars de la validació dels gens seleccionats a escorça dreta. Indicats en verd, valors que superen el coeficient de variació. Indicats en vermell, gens no validats.

APÈNDIX 2

APÈNDIX 2. ALTRES COL·LABORACIONS

En aquest apèndix es presenten alqtres publicacions en què s'ha participat durant els transkurs d'aquesta tesi doctoral.

Article A1

Louter M, Fernandez-Morales J, de Vries B, Winsvold B, Anttila V, Fernandez-Cadenas I, Vila-Pueyo M, Sintas C, van Duijn C, Cormand B, Alvarez-Sabin J, Montaner J, Ferrari M, van den Maagdenberg A, Palotie A, Zwart J, Macaya A, Terwindt G, Pozo-Rosich P. Candidate-gene association study searching for genetic factors involved in migraine chronification. *Cephalalgia* 2014 (en premsa).

Article A2

Vila-Pueyo M, Pons R, Raspall-Chaure M, Marcé-Grau A, Carreño O, Sintas C, Cormand B, Pineda-Marfà M, Macaya A. Clinical and genetic analysis in alternating hemiplegia of childhood: Ten new patients from Southern Europe. *J Neurol Sci* 2014; 344:37-42

Article 3

Vila-Pueyo M, Gené GG, Flotats-Bastardes M, Elorza X, Sintas C, Valverde MA, Cormand B, Fernández-Fernández JM, Macaya A. A loss-of-function CACNA1A mutation causing benign paroxysmal torticollis of infancy. *Eur J Paediatr Neurol* 2014; 18:430-433.

Candidate-gene association study searching for genetic factors involved in migraine chronification

Cephalalgia

0(0) 1–8

© International Headache Society 2014

Reprints and permissions:

sagepub.co.uk/journalsPermissions.nav

DOI: 10.1177/0333102414547141

cep.sagepub.com



MA Louter^{1,2}, J Fernandez-Morales³, B de Vries⁴,
B Winsvold^{5,6,7,8}, V Anttila^{9,10,11}, I Fernandez-Cadenas^{12,13},
M Vila-Pueyo¹⁴, C Sintas^{15,16}, CM van Duijn¹⁷,
B Cormand^{15,16,18}, J Álvarez-Sabin¹⁹, J Montaner^{13,19},
MD Ferrari¹, AMJM van den Maagdenberg^{1,4}, A Palotie^{5,9,10,11},
JA Zwart^{6,7,8}, A Macaya¹⁴, GM Terwindt¹ and P Pozo-Rosich^{3,19}

Abstract

Introduction: Chronic migraine (CM) is at the severe end of the clinical migraine spectrum, but its genetic background is unknown. Our study searched for evidence that genetic factors are involved in the chronification process.

Methods: We initially selected 144 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) from 48 candidate genes, which we tested for association in two stages: The first stage encompassed 262 CM patients, the second investigated 226 patients with high-frequency migraine (HFM). Subsequently, SNPs with p values < 0.05 were forwarded to the replication stage containing 531 patients with CM or HFM.

Results: Eight SNPs were significantly associated with CM and HFM in the two-stage phase. None survived replication in the third stage.

Discussion: We present the first comprehensive genetic association study for migraine chronification. There were no significant findings. Future studies may benefit from larger, genome-wide data sets or should use other genetic approaches to identify genetic factors involved in migraine chronification.

Keywords

Chronic migraine, high-frequency migraine, genetics, association studies

Date received: 12 December 2013; revised: 1 April 2014; 7 July 2014; accepted: 20 July 2014

¹Department of Neurology, Leiden University Medical Center (LUMC), the Netherlands

²Department of Psychiatry, Leiden University Medical Center (LUMC), the Netherlands

³Headache and Neurological Pain Research Group, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona

⁴Department of Human Genetics, Leiden University Medical Center (LUMC), the Netherlands

⁵Department of Human Genetics, Wellcome Trust Sanger Institute, Wellcome Trust Genome Campus, United Kingdom

⁶FORMI, Oslo University Hospital, Norway

⁷Department of Neurology, Oslo University Hospital, Norway

⁸Institute of Clinical Medicine, University of Oslo, Norway

⁹Analytical and Translational Genetics Unit, Department of Medicine, Massachusetts General Hospital and Harvard Medical School, USA

¹⁰Program in Medical and Population Genetics, Broad Institute of MIT and Harvard, USA

¹¹Institute for Molecular Medicine Finland (FIMM), University of Helsinki, Finland

¹²Stroke Genetics and Pharmacogenetics, Fundació per la Docència i Recerca Mutua Terrassa, Spain

¹³Neurovascular Research Laboratory, Vall d'Hebron Institute of Research, Universidad Autònoma de Barcelona, Spain

¹⁴Pediatric Neurology Research Group, Institut de Recerca (VHIR), Universitat Autònoma de Barcelona, Spain

¹⁵Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

¹⁶Centre for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Spain

¹⁷Department of Epidemiology, Erasmus University Medical Center, the Netherlands

¹⁸Institute of Biomedicine of the University of Barcelona (IBUB), Spain

¹⁹Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Spain

M.A.L. and J.F.-M. contributed equally to this work. G.M.T. and P.P.-R. are shared last authors.

Corresponding author:

Patricia Pozo-Rosich, Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron (HUVH), Pg. Vall d'Hebron 119–129, 08035 Barcelona, Spain. Email: ppozo@vhebron.net

Introduction

According to the International Classification of Headache Disorders, third edition beta (ICHD-III beta) classification criteria, a clinical diagnosis of chronic migraine (CM) is made when a patient has 15 or more days with headache per month of which at least eight days have features of migraine headache (or that are described by the patient as migraine and are relieved by migraine-specific medication) (1). CM is at the severe end of the clinical migraine spectrum with a substantially decreased quality of life and increased disability, and is strongly associated with depression, medication overuse, and/or cutaneous allodynia (2,3). The reported prevalence of CM is estimated to be around 0.5% to 2.0% (4,5). Recently, several genome-wide association studies (GWAS) have identified a dozen susceptibility gene variants and loci for episodic migraine (6–8), but until now no studies have focused on identifying genetic risk factors for CM.

It is debatable whether it is meaningful to make a strict distinction between episodic migraine and CM because headache frequency in patients varies from month to month and the thresholds of 15 headache days and eight migraine days, while practical, are arbitrary (9). Genetic studies in rarer complex disease subtypes, such as CM, are particularly challenging as collecting sufficiently large numbers of well-characterized patients is difficult. Therefore, we decided to also include a group of patients with high-frequency migraine (HFM) who suffer from headache 10 to 14 days per month, with half or more days meeting the criteria for migraine.

The aim of this study was to obtain evidence for association of variants in genes, acting in pathways possibly implicated in the chronification process of migraine as well as relevant secondary hits from GWAS, with chronification of migraine. In total, 144 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) selected based on literature and previous studies were tested in a three-stage design.

Methods

Participants and design of the genetic association study

Participants included in our study were patients diagnosed with either CM or HFM, and healthy control individuals. Migraine diagnoses were based on ICHD criteria. A three-stage genetic association study was performed (Figure 1). The discovery stage included 262 CM patients and 2879 control individuals (all patients came from the CHROMIG study (Spain), or the Leiden University Migraine Neuro Analysis

(LUMINA) study (the Netherlands)). In this stage, all 144 SNPs (in 48 genes) were tested. The selected markers fulfilled one or more of the following criteria: i) SNPs had been positively associated with migraine and not replicated in other migraine candidate-gene association studies; ii) the corresponding genes had already been implicated in mechanisms relevant to the chronification of migraine; or iii) SNPs were identified as secondary findings in previous migraine GWAS. In the second stage, all SNPs of the first stage that showed a p value < 0.05 were tested in a further 226 patients diagnosed with HFM vs. the same 2879 controls (patients again came from Spain or the Netherlands). In the third stage, SNPs with p values < 0.05 in the first two stages were tested for replication in 531 patients with CM or HFM (all patients came from the CHROMIG study (Spain), the LUMINA study (the Netherlands), or the Nord-Trøndelag Health Study (HUNT) (Norway)). In this stage, 2491 different control individuals from the three countries were tested.

Gene and SNP selection

We designed a candidate-gene association study focusing on genes that are likely associated with migraine or migraine comorbidities and may act as risk factors for migraine progression. To date, many association studies have been performed to identify genetic factors that confer susceptibility to common migraine (10,11). We selected genetic variants that had been studied in Caucasian populations, especially those that were studied only once. According to these criteria, a total number of 42 SNPs in 26 genes were selected. These genes were related to: i) ion metabolism transport (calcium channel, voltage-dependent, beta 2 subunit (*CACNB2*) and potassium voltage-gated channel, Shab-related subfamily, member 2 (*KCNB2*) (12), syntaxin 1A (*STX1A*) (13), endothelin 1 (*EDN1*), endothelin receptor type A (*EDNRA*) and endothelin receptor type B (*EDNRB*) (14–16); ii) dopamine (*DBH*) (17) and serotonin metabolism (*HTR2B*) (18); iii) hormonal metabolism (*ESR1*) (19–23); iv) vascular disease (interleukin (*IL*)-9, potassium channel, subfamily K, member 17 (*KCNK17*), low-density lipoprotein receptor-related protein 1 (*LRP1*), matrix metalloproteinase 12 (macrophage elastase) (*MMP12*), methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADP)+ dependent) 1, methylenetetrahydrofolate cyclohydrolase, formyltetrahydrofolate synthetase (*MTHFD1*), nitric oxide synthase 3 (endothelial cell) (*NOS3*), sodium channel, non-voltage-gated 1 alpha subunit (*SCNN1A*), transforming growth factor, beta 1 (*TGFBI*) and tumor necrosis factor (*TNF*) (24–26); v) autonomous nervous system dysfunction (GNAS complex locus (*GNAS1*)

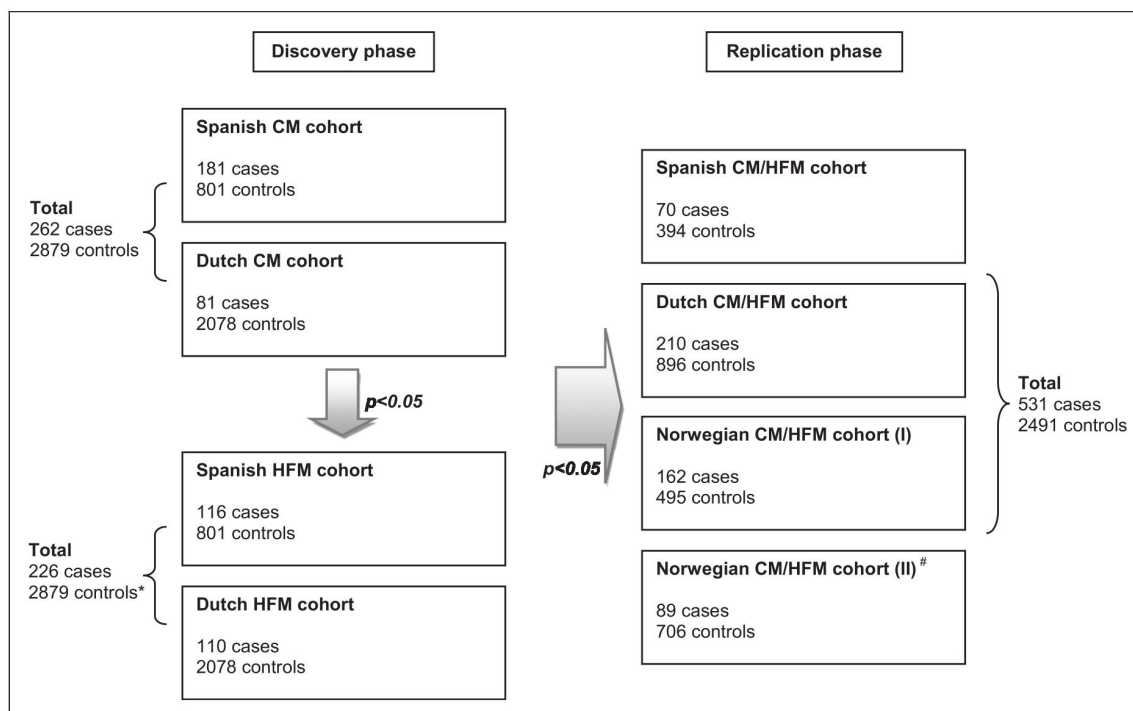


Figure 1. Three-stage gene association cohort study design.

CM: chronic migraine; HFM: high-frequency migraine; GWAS: genome-wide association study.

*In stages 1 and 2, the same group of 2879 controls was used. [#]The second Norwegian cohort was previously genotyped as part of a GWAS (5). This cohort was used for in silico replication in the present study. The other cohorts in stage 3 were genotyped using a TaqMan genotyping assay.

and potassium inwardly-rectifying channel, subfamily J, member 1 (*KCNJ1*) (27,28); vi) stress-response (brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*)) (29); vii) and psychiatric disorder-related genes, specially associated with anxiety and depression syndrome (catechol-O-methyltransferase (*COMT*), cryptochrome circadian clock 1 (*CRY1*), vasoactive intestinal peptide receptor 2 (*VIPR2*), regulator of G-protein signaling 2 (*RGS2*), sodium channel, voltage-gated, type IX, alpha subunit (*SCN9A*) and Wolfram syndrome 1 (wolframin) (*WFS1*)) (30–33). In addition, we selected candidate genes that encode molecules known to play an important role in migraine pathophysiology but that had not been studied before in candidate-gene association studies for migraine. In more detail, 37 TagSNPs were selected from CEU Hapmap data using a tagger pairwise tool with $r^2 > 0.8$ (Haploview tool) that codes for calcitonin-gene related peptide (*CALCA*) and its CGRP-receptor subunits (calcitonin receptor-like (*CALCLR*) and receptor (G protein-coupled) activity modifying protein 1 (*RAMPI*)). The pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (*PACAP*), a neuroexcitatory peptide released to periaqueductal gray matter during neurogenic inflammation, encoded by the

adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) (*ADCYAP1*) gene, and its receptor, encoded by adenylate cyclase activating polypeptide 1 (pituitary) receptor type I (*ADCYAP1R1*), were also investigated with 17 tagSNPs. *ESR1* and *ESR2*, but not G protein-coupled estrogen receptor 1 (*GPR30*) estrogen receptors, have been previously studied in relation to migraine, so we included *GPR30*, which encodes a multi-pass membrane protein that binds estrogen. Fractalkine, a chemokine that has been associated with neuroprotection (chemokine (C-X3-C motif) ligand 1 (*CX3CL1*) gene), and its receptor (*CX3CR1*) were chosen as candidate genes with six tagSNPs (34). We also focused on two molecules that had been previously reported in a microarray study as probable migraine with aura biomarkers, namely alpha-phodrin (*SPTANI*) and hippocalin-like protein (*HPCALI*) (35). The former is a cytoskeletal protein of the spectrins family and the latter is a member of the neuron-specific calcium-binding protein family and is involved in neuronal signaling in the central nervous system. Two tagSNPs in both genes were genotyped. A tagSNP in peripherin (*PRPH*), a cytoskeletal protein localized in neurons of the peripheral nervous system, the expression of which has been

associated with *GPR30*, was also studied (36). Finally, eight tagSNPs in a gene involved in circadian rhythm and metabolism regulation (*CLOCK*) were added to the panel. Overall, 77 non-previously studied gene variants in 12 genes were selected.

Finally, 25 polymorphisms extracted from the list of secondary top hits in the analysis of the first migraine GWAS (6) that was carried out by our International Headache Genetics Consortium (IHGC) were included. The list included 15 intergenic SNPs and 10 variations that were located in gene-coding regions (acyl-CoA synthetase long-chain family member 5 (*ACSL5*), chromosome 4 open reading frame 22 (*C4orf22*), DCC netrin 1 receptor (*DCC*), insulin-induced gene 2 (*INSIG2*), opioid binding protein/cell adhesion molecule-like (*OPCML*), olfactory receptor, family 9, subfamily Q, member 1 (*OR9Q1*), reelin (*RELN*), SET and MYND domain containing 3 (*SMYD3*), STAM binding protein-like 1 (*STAMBPL1*) and transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 8 (*TRPM8*)). In summary, 119 SNPs were genotyped in 38 candidate genes, as well as 25 additional SNPs from GWAS data.

Cohorts

Spanish CM and HFM patients were recruited at the Headache Unit of the Vall d'Hebron University Hospital (Barcelona). Patients with CM were diagnosed by a clinical interview and physical examination by a headache-specializing neurologist, according to the ICHD-III beta classification (1). HFM was diagnosed when patients suffered from headache 10 to 14 days per month, of which half or more days fulfilled the criteria for migraine. Healthy controls were blood donors. Exclusion criteria for this control population were migraine, a positive family history for migraine and any type of severe or recurrent headache in first-degree relatives.

Dutch CM and HFM patients were available from the well-defined, web-based LUMINA population (Leiden University Migraine Neuro Analysis program) (www.lumc.nl/hoofdpijn). Details of this study are described elsewhere (37). Migraine was diagnosed according to the ICHD-III beta criteria (1). CM was diagnosed when patients suffered from migraine and indicated that they experienced severe headache 15 or more days per month. HFM was diagnosed when patients suffered from migraine and indicated that they experienced severe headache 10–14 days per month. Control samples for the discovery phase were part of the population-based Rotterdam Study (38). Control samples for the replication phase were collected via a Dutch blood bank.

The Norwegian patients were recruited from the population-based HUNT-2 (1995–1997) and HUNT-3 (2006–2008) studies, in which all inhabitants (age ≥ 20 years) of the Nord-Trøndelag county of Norway were invited to participate (39,40). Migraine was diagnosed based on a modified version of the most recent ICHD criteria at the time of each study, and this questionnaire-based headache classification has been validated by interview diagnoses (39,40). Migraineurs reporting headache seven or more days per month were classified as HFM, and those reporting headache 15 or more days per month were classified as CM. Controls were recruited from the same two studies, and participants fulfilling criteria for migraine were excluded from the control population.

Genotyping

Spanish cohorts. Venous blood samples of individuals who fulfilled inclusion criteria were collected in ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) tubes and conserved at -80°C until DNA extraction. DNA was extracted from blood lymphocytes at the Centre de Regulació Genòmica (CRG, Barcelona, Spain) with the Chemagen[®] extraction kit (Perkin Elmer, Germany) and at the Departament de Genètica (Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain) by a standard salting-out procedure (41). Quantity and quality of DNA samples were controlled spectrophotometrically with NanoDrop ND1000 (NanoDrop, Wilmington, DE, USA). Genotyping of SNPs in the discovery sample set was performed with VeraCode[®] GoldenGate[®] technology (Illumina, CRG, Barcelona, Spain). For the replication phase, an additional 70 CM and HFM patients and 394 controls were recruited under the same criteria and procedures that were used for the discovery sample. Blood sampling and DNA extraction were performed in the same way. Genotyping was performed with a TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) using the 7900HT Sequence Detection System (SDS, Applied Biosystems) in 384-well plates and following the manufacturer's protocol.

Dutch cohorts. Peripheral blood samples were collected in EDTA tubes. Subsequently, DNA was isolated using a standard salting-out method. Genotyping of the samples had been previously performed as part of two GWAS for common migraine (6,7). Genotyping of the replication cohort was performed with a TaqMan[®] SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A standard polymerase chain reaction (PCR) was carried out using the TaqMan Universal PCR Master Mix. Genotyping clusters were analyzed using the LightCycler LC-480

machine and LightCycler® 480 1.5.0 software, version 1.5.0.39 (Roche Applied Science, Penzberg, Upper Bavaria, Germany) in 384-well plates following the manufacturer's protocol.

Norwegian cohorts. DNA from all Norwegian samples was extracted from blood using two kits: Autopure Kit (Qiagen, Duesseldorf, Germany) and Masterpure Kit (Medinor, Oslo, Norway), both based on a salting-out procedure. Quantity and quality of DNA samples were controlled regularly by monitoring every eighth sample spectrophotometrically with NanoDrop ND1000 and ND8000 (NanoDrop). Genotyping of the replication cohort was performed with a TaqMan® SNP Genotyping Assay (Applied Biosystems). A standard PCR reaction was carried out using the TaqMan Universal PCR Master Mix. Genotyping clusters were analyzed using the LightCycler LC-480 machine and LightCycler® 480 1.5.0 software, version 1.5.0.39 (Roche Applied Science, Penzberg, Germany) in 384-well plates following the manufacturer's protocol. A part of the Norwegian sample for replication had previously been genotyped with the Illumina 670 k platform, as part of a GWAS of migraine (8), and was used for in silico replication for the current study. We used the Illuminus calling algorithm, with the following filters for genotyped SNPs: minimum call rate per SNP and per individual (0.97), Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) p value higher than 1.00×10^{-6} and minor allele frequency (MAF) >0.01 . For those SNPs that were not directly genotyped, imputation was performed with Impute v.2.1.2 in a standardized pipeline, using HapMap2 data from a CEU population as the reference panel.

Statistical analyses

We performed power calculations for all three steps of our design, assuming an additive model, an effect allele frequency of 0.20 and effect sizes ranging from 1.2 to 1.4. We added the outcome of these power calculations to the online Supplementary Material. Statistical analyses were performed using PLINK v1.07 (42) and SNPTEST v2.2.0 (43). GTOOL v0.7.5 was used to combine different cohorts. First, the entire panel of SNPs was tested for the HWE for each cohort considering $p < 0.05$ as the threshold. Then, both allele and genotype frequencies were compared between cases and controls, considering additive, genotypic (co-dominance), dominant and recessive models. Subsequently, a meta-analysis was performed using GWAMA v2.1. For all analyses, the threshold for statistical significance was defined as a p value below 0.05. Approval was obtained from local medical ethics committees and written informed consent was obtained from all participants.

Results

For this study, 144 SNPs in genes already implicated in migraine or that had surfaced as interesting secondary hits in GWAS (see online Supplementary Material) were used in a three-stage association design (Figure 2). In the first stage, SNPs were tested in 262 patients with CM vs. 2,879 control individuals. Nominal significant associations (p value < 0.05) were obtained for 30 SNPs (see also online Supplemental Material, Table 2). These 30 SNPs were taken forward to the second stage with 226 patients with HFM and the same control data set, where eight SNPs showed a nominally significant association; rs5742912 (in *SCNN1A*), rs3792603 (in *CLOCK*), rs2956 (in *CALCA*), rs858745 (in *CALCRL*), rs302680 (in *RAMP1*), rs2267730 and rs2299908 (in *ADCYAP1R1*), and rs217693, which is an intergenic SNP (see Table 1 for detailed information on these 8 SNPs). These eight SNPs were taken forward to the replication stage and were genotyped in three replication cohorts from Spain (70 patients with CM or HFM and 394 controls), the Netherlands (210 patients with CM or HFM and 896 controls), and Norway (162 patients with CM or HFM and 495 controls). The availability of GWA data allowed testing of seven of the eight SNPs in 89 additional Norwegian patients with CM or HFM and 706 controls.

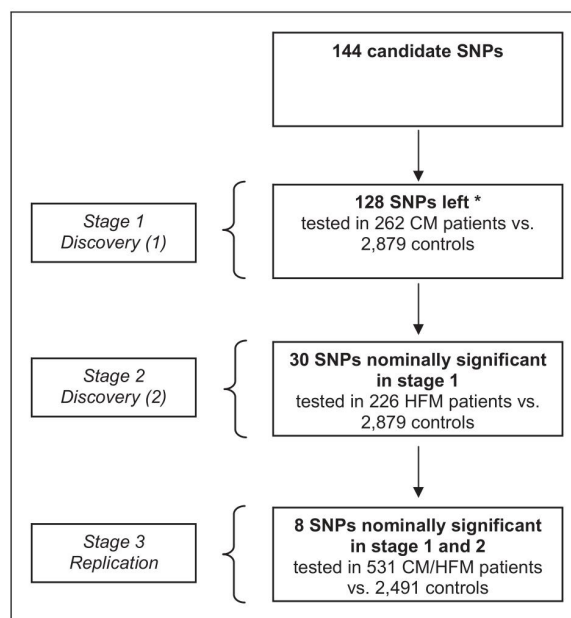


Figure 2. SNP selection study flow.

SNP: single-nucleotide polymorphism; CM: chronic migraine; HFM: high-frequency migraine; HWE: Hardy-Weinberg equilibrium. *16 SNPs excluded due to genotyping failure, low HWE, or low rate of successful genotypes. Nominally significant: $p < 0.05$.

Subsequently, a combined meta-analysis of the association results from these replication cohorts with 531 patients with CM or HFM and 2491 controls was performed but showed no statistically significant associations.

Discussion

Here we present the first comprehensive genetic association study in CM and HFM migraineurs testing 144 SNPs from 48 genes in 1019 patients with CM or HFM, without significant associations. Patient numbers in each cohort were relatively small, largely because of the rarity of CM, which makes it difficult to collect large enough patient samples. As CM is a complex genetic disorder, it is likely that multiple genetic variants, each with relatively small effect, contribute to disease susceptibility, suggesting that large numbers of patients and controls are needed to reach sufficient power to detect a genetic association. We attempted to address this challenge in two ways. First, to increase overall numbers, we decided to include not only CM patients, but also HFM individuals, as we consider the cutoff values for a diagnosis of CM to be rather arbitrary and instead favor the idea that migraine chronification has a broader spectrum with respect to the number of headache days (9). Second, by selecting only candidate genes (and SNPs therein) we reduced the massive correction for multiple testing that is needed for unbiased GWA approaches. Considering the negative results, our approach may still have had insufficient statistical power or we may have selected SNPs irrelevant to migraine

chronification. As even large international collaborations, such as the IHGC, have difficulties collecting large enough cohorts of well-characterized patients with CM and HFM, we feel that studies like ours will probably remain underpowered in the immediate future. We are working with the IHGC on unifying the criteria to select patients so that future studies will be able to count on larger and better phenotyped cohorts.

CM is severely disabling and difficult to manage, as affected patients experience substantially more-frequent headaches, comorbid pain and affective disorders, and fewer pain-free intervals, than do those with episodic migraine (4). Furthermore, the relationship of CM with cutaneous allodynia has been investigated, indicating that cutaneous allodynia is a clear risk factor for migraine chronification (3). Different models have been proposed to explain this relationship. Further investigations into the basic mechanisms of cutaneous allodynia, and its relationship with migraine chronification, could lead to new potential genes that should be studied in future designs.

Clinical and genetic studies have shown that migraine is a multifactorial disorder with complex interaction between multiple predisposing genetic and modulating non-genetic factors. GWAS have identified 13 gene variants pointing, among others, at pathways involved in glutamatergic neurotransmission and synaptic function (8). Translating results from GWAS to pathophysiological mechanisms, however, remains one of the biggest challenges in molecular biology as gene effect sizes are small and their interactions are complex.

Table 1. Results of the replication phase (stage 3).

General SNP information					Stage 1	Stage 2	Stage 3				
					Discovery phase (CM)	Discovery phase (HFM)	Replication phase (CM/HFM)				
SNP	Chr. (position)	Gene	Ref. allele	Alt. allele	<i>p</i> value	<i>p</i> value	<i>p</i> value	OR (95% CI)	Cohorts (N)	Samples (N)	Effects
rs5742912	12 (6458350)	SCNN1A	G	A	0.035	0.003	0.31	0.872 (0.672–1.132)	3	2108	-/?!-/-
rs3792603	4 (56302058)	CLOCK	G	A	0.006	0.004	0.69	1.024 (0.911–1.151)	4	2943	-/+/-/+
rs217693	14 (62402801)	Intergenic	G	A	0.045	0.019	0.10	0.911 (0.816–1.018)	4	2930	-/-/-/-
rs2956	11 (14989121)	CALCA	T	A	<0.001	0.029	0.90	0.993 (0.895–1.102)	4	2967	-/+/+/+
rs858745	2 (188216807)	CALCRL	T	C	<0.001	0.004	0.12	1.129 (0.971–1.313)	4	2925	+/+/+/+
rs302680	2 (238791396)	RAMP1	G	A	0.040	0.010	0.89	1.009 (0.887–1.147)	4	2937	+/-/-/+
rs2267730	7 (31122630)	ADCYAP1R1	T	C	0.043	0.036	0.36	0.956 (0.868–1.052)	4	2845	-/+/+/-
rs2299908	7 (31138096)	ADCYAP1R1	G	A	0.026	0.046	0.34	0.946 (0.843–1.061)	4	2871	-/-/+/-

SNP: single-nucleotide polymorphism; CM: chronic migraine; HFM: high-frequency migraine; Ref. allele: Reference allele; Alt. allele: alternative allele; OR: odds ratio; CI: confidence interval. Genomic position in basepairs according to Build 37. Stage 1 included 262 CM cases and 2879 controls, stage 2 included 226 HFM cases and 2879 controls (same controls as stage 1), and stage 3 included 531 CM/HFM cases and 2491 controls. Effects: Direction of individual effects in the four replication cohorts, depicted in the following order: Spanish CHROMIG (TaqMan)/Norwegian Nord-Trøndelag Health Study (HUNT) (in silico)/Norwegian HUNT (TaqMan)/Dutch Leiden University Migraine Neuro Analysis (LUMINA) (TaqMan). (+) risk addition; (-) risk reduction; (?) not calculated (because of missing data).

We suggest that for future designs it is relevant to consider the outcome of withdrawal from medication, as the vast majority of CM patients are (over)using acute headache medication. In this study, we did not have sufficient data to include this aspect in the analysis. However, future studies would benefit from subdividing CM individuals into patients responsive to withdrawal therapy and returning to episodic migraine after withdrawal of their medication, and

patients in whom such withdrawal has no or less effect on attack frequency. Lastly, although the problem of statistical power will remain problematic in association studies for CM and HFM, we would like to put forward that perhaps other genetic approaches are more fruitful in detecting genes and pathways involved in CM, such as gene-expression studies, epigenetic studies or the analysis of rare variants.

Clinical implications

- No genetic variants were detected, indicating that genetic testing to identify patients at increased risk for migraine chronification is not warranted so far.
- Medication overuse and the success of reverting to episodic migraine after withdrawal of acute medication in individual patients should be considered when studying chronic migraine.
- Future studies may benefit from larger data sets or should use other genetic approaches to identify genetic factors involved in migraine chronification.

Funding

This work was supported by grants from the Netherlands Organization for Scientific Research (NWO) (VICI 918.56.602 to M.D.F., VIDI 917.11.319 to G.M.T.); the European Community (EC); and the Centre for Medical Systems Biology (CMSB) in the framework of the Netherlands Genomics Initiative (NGI), the Orion Farnos Research Foundation (to V.A.), the South-Eastern Norway Regional Health Authority (2010075 and 2011083 to B.W. and J.A.Z.) and the Miguel Servet Programme (CP12/03298 to I.F.-C.). This project has also been funded by public donation mediated by the Fundació La Marato TV3 (072310), Fondo de Investigaciones Sanitarias: FIS (PI10/00876), the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (SAF2009-13182-C01, SAF2009-13182-C03) and the Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (AGAUR) (2009SGR0971). None of the funders had any role in the design or conduct of the study.

Conflict of interest

M.A. Louter reports support for conference visits from Menarini and Allergan. M.D. Ferrari reports grants and consultancy or industry support from Medtronic, Menarini, and Merck and independent support from NWO, ZonMW, the United States National Institutes of Health (NIH), the European Community, and the Dutch Heart Foundation. G.M. Terwindt reports grants and consultancy/industry support from Menarini, and independent support from NWO. P. Pozo-Rosich reports support for conference visits from MSD and Almirall and consultancy for Allergan. The other authors have nothing to declare.

Acknowledgments

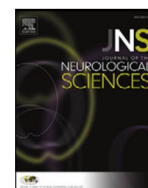
The Nord-Trøndelag Health Study (the HUNT Study) is a collaboration between HUNT Research Centre (Faculty of Medicine, Norwegian University of Science and

Technology, NTNU), Nord-Trøndelag County Council, Central Norway Health Authority, and the Norwegian Institute of Public Health.

References

1. The International Classification of Headache Disorders, 3rd edition (beta version). *Cephalalgia* 2013; 33: 629–808.
2. Bigal ME and Lipton RB. Modifiable risk factors for migraine progression. *Headache* 2006; 46: 1334–1343.
3. Louter MA, Bosker JE, van Oosterhout WP, et al. Cutaneous allodynia as a predictor of migraine chronification. *Brain* 2013; 136 (Pt 11): 3489–3496.
4. Diener HC, Dodick DW, Goadsby PJ, et al. Chronic migraine—classification, characteristics and treatment. *Nat Rev Neurol* 2011; 8: 162–171.
5. Katsarava Z, Manack A, Yoon MS, et al. Chronic migraine: Classification and comparisons. *Cephalalgia* 2011; 31: 520–529.
6. Anttila V, Stefansson H, Kallela M, et al. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet* 2010; 42: 869–873.
7. Freilinger T, Anttila V, de Vries B, et al. Genome-wide association analysis identifies susceptibility loci for migraine without aura. *Nat Genet* 2012; 44: 777–782.
8. Anttila V, Winsvold BS, Gormley P, et al. Genome-wide meta-analysis identifies new susceptibility loci for migraine. *Nat Genet* 2013; 45: 912–917.
9. Lipton RB, Penzien DB, Turner DP, et al. Methodological issues in studying rates and predictors of migraine progression and remission. *Headache* 2013; 53: 930–934.
10. de Vries B, Frants RR, Ferrari MD, et al. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet* 2009; 126: 115–132.
11. Eising E, de Vries B, Ferrari MD, et al. Pearls and pitfalls in genetic studies of migraine. *Cephalalgia* 2013; 33: 614–625.

12. Nyholt DR, LaForge KS, Kallela M, et al. A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine. *Hum Mol Genet* 2008; 17: 3318–3331.
13. Corominas R, Ribasés M, Cuenca-León E, et al. Contribution of syntaxin 1A to the genetic susceptibility to migraine: A case-control association study in the Spanish population. *Neurosci Lett* 2009; 455: 105–109.
14. MacClellan LR, Howard TD, Cole JW, et al. Relation of candidate genes that encode for endothelial function to migraine and stroke: The Stroke Prevention in Young Women study. *Stroke* 2009; 40: e550–e557.
15. Tikka-Kleemola P, Kaunisto MA, Hamalainen E, et al. Genetic association study of endothelin-1 and its receptors *EDNRA* and *EDNRB* in migraine with aura. *Cephalalgia* 2009; 29: 1224–1231.
16. Tzourio C, El Amrani M, Poirier O, et al. Association between migraine and endothelin type A receptor (ETA – 231 A/G) gene polymorphism. *Neurology* 2001; 56: 1273–1277.
17. Fernandez F, Colson N, Quinlan S, et al. Association between migraine and a functional polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase locus. *Neurogenetics* 2009; 10: 199–208.
18. Corominas R, Sobrido MJ, Ribasés M, et al. Association study of the serotonergic system in migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 2010; 153B: 177–184.
19. Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, et al. The estrogen receptor 1 *G594A* polymorphism is associated with migraine susceptibility in two independent case/control groups. *Neurogenetics* 2004; 5: 129–133.
20. Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, et al. Testing of variants of the *MTHFR* and *ESR1* genes in 1798 Finnish individuals fails to confirm the association with migraine with aura. *Cephalalgia* 2006; 26: 1462–1472.
21. Oterino A, Pascual J, Ruiz de Alegría C, et al. Association of migraine and *ESR1 G325C* polymorphism. *Neuroreport* 2006; 17: 61–64.
22. Corominas R, Ribasés M, Cuenca-León E, et al. Lack of association of hormone receptor polymorphisms with migraine. *Eur J Neurol* 2009; 16: 413–415.
23. Joshi G, Pradhan S and Mittal B. Role of the oestrogen receptor (*ESR1 PvuII* and *ESR1 325 C->G*) and progesterone receptor (*PROGINS*) polymorphisms in genetic susceptibility to migraine in a North Indian population. *Cephalalgia* 2010; 30: 311–320.
24. Schurks M. Genetics of migraine in the age of genome-wide association studies. *J Headache Pain* 2012; 13: 1–9.
25. Rainero I, Grimaldi LM, Salani G, et al. Association between the tumor necrosis factor-alpha –308 G/A gene polymorphism and migraine. *Neurology* 2004; 62: 141–143.
26. Mazaheri S, Hajilooi M and Rafiei A. The G-308A promoter variant of the tumor necrosis factor-alpha gene is associated with migraine without aura. *J Neurol* 2006; 253: 1589–1593.
27. Oterino A, Ruiz-Alegría C, Castillo J, et al. *GNAS1 T393C* polymorphism is associated with migraine. *Cephalalgia* 2007; 27: 429–434.
28. Tobin MD, Tomaszewski M, Braund PS, et al. Common variants in genes underlying monogenic hypertension and hypotension and blood pressure in the general population. *Hypertension* 2008; 51: 1658–1664.
29. Yoshida K, Higuchi H, Kamata M, et al. The *G196A* polymorphism of the brain-derived neurotrophic factor gene and the antidepressant effect of milnacipran and fluvoxamine. *J Psychopharmacol* 2007; 21: 650–656.
30. Krugel LK, Biele G, Mohr PN, et al. Genetic variation in dopaminergic neuromodulation influences the ability to rapidly and flexibly adapt decisions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009; 106: 17951–17956.
31. Soria V, Martínez-Amorós E, Escaramís G, et al. Differential association of circadian genes with mood disorders: *CRY1* and *NPAS2* are associated with unipolar major depression and *CLOCK* and *VIP* with bipolar disorder. *Neuropsychopharmacology* 2010; 35: 1279–1289.
32. Smoller JW, Paulus MP, Fagerness JA, et al. Influence of *RGS2* on anxiety-related temperament, personality, and brain function. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65: 298–308.
33. Di Lorenzo C, Sances G, Di Lorenzo G, et al. The wolframin *His611Arg* polymorphism influences medication overuse headache. *Neurosci Lett* 2007; 424: 179–184.
34. Combadiere C, Godin O, Vidal C, et al. Common *CX3CR1* alleles are associated with a reduced risk of headaches. *Headache* 2008; 48: 1061–1066.
35. Nagata E, Hattori H, Kato M, et al. Identification of biomarkers associated with migraine with aura. *Neurosci Res* 2009; 64: 104–110.
36. Liverman CS, Brown JW, Sandhir R, et al. Role of the oestrogen receptors *GPR30* and *ERalpha* in peripheral sensitization: Relevance to trigeminal pain disorders in women. *Cephalalgia* 2009; 29: 729–741.
37. van Oosterhout WP, Weller CM, Stam AH, et al. Validation of the web-based LUMINA questionnaire for recruiting large cohorts of migraineurs. *Cephalalgia* 2011; 31: 1359–1367.
38. Hofman A, van Duijn CM, Franco OH, et al. The Rotterdam Study: 2012 objectives and design update. *Eur J Epidemiol* 2011; 26: 657–686.
39. Hagen K, Zwart JA, Aamodt AH, et al. The validity of questionnaire-based diagnoses: The third Nord-Trøndelag Health Study 2006–2008. *J Headache Pain* 2010; 11: 67–73.
40. Hagen K, Zwart JA, Vatten L, et al. Head-HUNT: Validity and reliability of a headache questionnaire in a large population-based study in Norway. *Cephalalgia* 2000; 20: 244–251.
41. Miller SA, Dykes DD and Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 1215.
42. Purcell S, Neale B, Todd-Brown K, et al. PLINK: A tool set for whole-genome association and population-based linkage analyses. *Am J Hum Genet* 2007; 81: 559–575.
43. Marchini J, Howie B, Myers S, et al. A new multipoint method for genome-wide association studies by imputation of genotypes. *Nat Genet* 2007; 39: 906–913.



Clinical and genetic analysis in alternating hemiplegia of childhood: Ten new patients from Southern Europe



Marta Vila-Pueyo^a, Roser Pons^b, Miquel Raspall-Chaure^a, Anna Marcé-Grau^a, Oriol Carreño^{c,d,e}, Cèlia Sintas^{c,d,e}, Bru Cormand^{c,d,e}, Mercè Pineda-Marfà^f, Alfons Macaya^{a,*}

^a Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b First Department of Pediatrics, Agia Sofia Hospital, University of Athens, Athens, Greece

^c Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

^d Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

^e Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

^f Pediatric Neurology Department, Teknon Clinic, Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 26 March 2014

Received in revised form 4 June 2014

Accepted 9 June 2014

Available online 17 June 2014

Keywords:

Alternating hemiplegia of childhood

ATP1A3

CACNA1A

Genetics

Ketogenic diet

Neurodevelopmental syndrome

ABSTRACT

Alternating hemiplegia of childhood (AHC) is a rare neurodevelopmental disorder featuring attacks of hemiplegia and other paroxysmal and non-paroxysmal manifestations leading to progressive neurological impairment. De novo mutations in *ATP1A3* have been identified in up to 80% of patients. AHC is also associated with rare mutations in other genes involved in episodic neurological disorders.

We sought to find mutations in *ATP1A3*, *CACNA1A*, *ATP1A2*, *SCN1A* and *SLC2A1* in a cohort of ten unrelated patients from Spain and Greece.

All patients fulfilled AHC diagnostic criteria. All five genes were amplified by PCR and Sanger sequenced. Copy number variation (CNV) analysis of *SLC2A1* and *CACNA1A* was performed using two different approaches.

We identified three previously described heterozygous missense *ATP1A3* mutations (p.Asp801Asn, p.Glu815Lys and p.Gly947Arg) in five patients. No disease-causing mutations were found in the remaining genes. All mutations occurred *de novo*; carriers presented on average earlier than non-carriers. Intellectual disability was more severe with the p.Glu815Lys variant. A p.Gly947Arg carrier harbored a maternally-inherited *CACNA1A* p.Ala454Thr variant. Of note, three of our patients exhibited remarkable clinical responses to the ketogenic diet. We confirmed *ATP1A3* mutations in half of our patients. Further AHC genetic studies will need to investigate large rearrangements in *ATP1A3* or consider greater genetic heterogeneity than previously suspected.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Alternating hemiplegia of childhood (AHC) is a complex and rare neurodevelopmental syndrome that was first described by Verret and Steele in 1971 [1]. It is characterized by (i) onset of paroxysmal events before 18 months of age, (ii) repeated periods of hemiplegia involving either side of the body lasting from a few minutes to several days caused by various factors including emotional triggers, head trauma and fatigue, (iii) episodes of bilateral hemiplegia or quadriplegia of varying intensity, (iv) other paroxysmal manifestations including tonic and dystonic episodes, ocular abnormal movements (nystagmus, strabismus) and/or autonomic disturbances occurring during hemiplegic

bouts or in isolation, (v) disappearance of all abnormalities by sleep, with probable recurrence of long-lasting bouts after waking, and (vi) nonparoxysmal neurological abnormalities including developmental delay, choreoathetosis, dystonia and/or ataxia [2,3].

Analysis of whole exome sequencing in 16 proband-parent trios and whole genome sequencing in another two led to establish AHC as a genetic disorder caused by mutations in *ATP1A3*, encoding the neuronal α_3 -subunit of the Na^+/K^+ -ATPase pump [4–6]. Subsequent molecular analysis in 143 additional AHC patients revealed the presence of mutations in 112 of them [4–8]; the negative results in approximately 20% of patients may indicate some degree of genetic heterogeneity in AHC. In fact, some reports have linked AHC, or a very similar phenotype, to mutations in three genes encoding ionic channels or solute carriers expressed in the central nervous system: *CACNA1A* [9], *ATP1A2* [10,11] and *SLC2A1* [12].

In the present study, we sought to determine whether mutations in *ATP1A3* or in any of the three genes involved in familial hemiplegic migraine (FHM), *CACNA1A*, *ATP1A2* and *SCN1A* or in glucose transporter

* Corresponding author at: Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Edifici Mediterrània, Institut de Recerca Vall d'Hebron Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934893890; fax: +34 934894102.

E-mail address: amacaya@vhebron.net (A. Macaya).

type 1 deficiency syndrome (GLUT1DS), *SLC2A1*, were linked to AHC in a cohort of 10 unrelated patients from Spain and Greece.

2. Subjects

Ten sporadic AHC patients who clinically fulfilled the previously described criteria for the disorder [2,3] were recruited by neurologists at four Spanish or Greek centers. After obtaining informed consent from all patient parents or custodians, blood samples were collected and genomic DNA was extracted following standard procedures [13]. The study was approved by the local Ethics Committee at Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona.

3. Methods

3.1. Mutation screening

All promoters, exons and flanking intronic regions of *ATP1A3*, *CACNA1A*, *ATP1A2* and *SLC2A1* genes and the five FHM-associated *SCN1A* exons (number 6, 17, 23, 24 and 26) and flanking intronic regions were amplified by PCR in all the patients (details available upon request). Purified PCR products were sequenced using the BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 and the automated sequencer ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All mutations were assessed by bidirectional sequencing. Inheritance of mutations was determined after sequencing the parents of all mutation carriers.

Mutation nomenclature follows HGVS guidelines (www.hgvs.org/mutnomen) and refers to the *ATP1A3* cDNA sequence NM_152296.4 (protein sequence NP_689509.1) and to the *CACNA1A* cDNA sequence NM_023035.2 (protein sequence NP_075461.2) with +1 corresponding to A of the ATG translation initiation codons.

3.2. Copy number variant analysis

Copy number variation (CNV) studies for *SLC2A1* and *CACNA1A* were performed. For *SLC2A1* we analyzed all exons with the Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) assay by using the SALSA MLPA kit P138 for *SLC2A1* (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands). For *CACNA1A* we used two complementary approaches to maximize gene coverage: MLPA and Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments (QMPSF). For the MLPA assay we used the SALSA MLPA kit P279-A2 for *CACNA1A* (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) and for QMPSF we used four sets of primer pairs that covered 16 additional exons not included in the MLPA kit (experimental details and primer sequences available upon request).

4. Results

4.1. Clinical data

The main clinical features of the ten patients (5 females) are summarized in Table 1.

Briefly, all patients were from Southern Europe, seven from Spain and three from Greece. The age of onset varied from 0 to 18 months; present age is comprised between 6 and 36 years. Attacks lasted minutes to days with a daily to every two months frequency and featured typical motor signs including unilateral or bilateral paresis, hypotonia, dystonia, rigidity, ataxia, nystagmus or other abnormal eye movements, dysphagia, hand posturing and postictal drowsiness. Other frequently reported paroxysmal events included epileptic seizures, cyclic vomiting and migraine with aura. Over a 6–16 year follow-up period, 9/10 patients have developed different degrees of intellectual deterioration, mostly moderate to severe, and other signs of chronic, progressive neurological dysfunction, such as ataxia, dysarthria, spasticity, hypotonia,

hypertonia, dyskinesia, tremor and pyramidal signs. Microcephaly occurred in only one patient.

All patients had MRI studies, which were all normal except for patient 6 who displayed subtle bihemispheric white matter lesions. All patients showed no abnormalities on serial EEGs.

None of the patients had familial history of AHC, however six had familial history of migraine, one of a non-classified neurodegenerative disorder, one of vertigo and one of epilepsy.

Used treatments included prophylaxis with flunarizine, which often provided some degree of improvement in severity and frequency of attacks, or topiramate. Interestingly, in three patients the number and severity of attacks were markedly reduced upon institution of the ketogenic diet (KD). Patient 1 was treated for one year with KD, at age 11. She had been on flunarizine since age 3 with no clear benefit. The frequency of her dystonic attacks while on KD decreased from one per week to one every three weeks, approximately. A more dramatic improvement was recorded in her behavioral status. Both her psychologist and caregivers described frank improvement in her school performance and resolution of mood swings and sociability problems. Because of cost-effectiveness issues the family decided to stop the treatment. Patients 4 and 5 were treated with flunarizine since the disease started with poor response. Benzodiazepines were used to take them quickly to sleep and shorten the attacks: in patient 5 rectal diazepam reduced the duration of her attacks from 2 to 3 days to 4–5 h, but frequency (1–2 a week) remained unchanged; in the case of patient 4 clonazepam in his oral mucosa reduced the attacks to 3–4 h instead of 1–2 days, but their number did also not decrease. In both of them KD brought about a cessation of the hemiplegic attacks. In addition, and according to teachers and caregivers, there were improvements in their motor clumsiness, mood, attention and, though not quantified, global cognitive functions. Of note, patient 5, a 6 year-old girl, has suffered no further attacks since she was put on the diet at age 4.

4.2. Mutation screening

The extensive sequencing of the *ATP1A3* gene in ten subjects with AHC allowed the identification of three previously reported changes in five unrelated patients. We identified a G-to-A transition at cDNA position c.2401, resulting in the substitution of an aspartic acid for an asparagine at residue 801 (p.Asp801Asn), in patient 1; a G-to-A transition at cDNA position c.2443, resulting in the substitution of a glutamic acid for a lysine at residue 815 (p.Glu815Lys), in patient 2; and a G-to-A transition at cDNA position c.2839, resulting in the substitution of a glycine for an arginine at residue 947 (p.Gly947Arg), in patients 3, 4 and 5 (Fig. 1). All mutations were heterozygous and were confirmed to be *de novo*, except in patient 1 whose parental DNA was not available. However, the variant found in this patient has been previously associated with AHC in the literature.

A distinctive clinical feature of *ATP1A3*-positive vs *ATP1A3*-negative patients was an earlier onset of symptoms in the former group (average age of onset: 4.8 vs 13.4 mo).

Moreover, direct sequencing of *CACNA1A* gene revealed a heterozygous G-to-A transition at cDNA position 1360 (c.1360G>A) in patient 5, who also bore an *ATP1A3* change, and in her asymptomatic mother. This mutation results in the substitution of alanine for threonine at residue 454 (p.Ala454Thr) and is assessed as probably damaging by the prediction tool PolyPhen-2 v2.2.2 (score = 1). All mutations are listed in Table 2.

No mutations in *ATP1A2*, *SCN1A* and *SLC2A1* genes nor copy number variants in *SLC2A1* or *CACNA1A* were found in the ten patients screened.

5. Discussion

We have identified three mutations in the *ATP1A3* gene in five out of ten AHC patients from Spain and Greece. *ATP1A3* encodes the alpha-3 catalytic subunit of the Na⁺/K⁺ ATPase pump. Na⁺/K⁺ ATPases maintain

Table 1
 Clinical features of 10 patients with alternating hemiplegia of childhood. M: male; F: female; mo: months; MO: migraine without aura; MA: migraine with aura; HM: hemiplegic migraine; KD: ketogenic diet; ID: intellectual disability; –: no information. Shading indicates *ATP1A3* mutation carrier.

Patient	Origin	Present age (years) and gender	Age at onset (mo)	Attack description	Body part involvement	Duration	Frequency	Other paroxysmal events	Interictal exam	Other	Family history	Treatment (response)
	Greece	16 F	6	Paresis Dystonia	Unilateral	Minutes-to-hours	Daily-to-weekly	–	Mild ID Dysarthria Mild-moderate spasticity Ataxia	Normal MRI, EEG, SPECT	No	Multiple antiepileptic drugs and flunarizine (no effect) KD (improved)
2	Greece	7 M	4	Flaccid paresis Ataxia	Unilateral	1–3 days	1–2/week	Dyskinesia	Severe ID and motor involvement	Normal MRI, EEG	No	Flunarizine (improved)
3	Spain	16 F	4	Flaccid paresis	Bilateral	2–7 days	2/month	Rigidity episodes	Mild ID Cerebellar ataxia	Normal MRI C677T mutation in MTHFR	MO	–
4	Spain	37 M	3	Ataxia Flaccid paresis Dystonia	Unilateral	Hours/days	2–4/month	Autonomic dysfunction	Moderate ID	Normal MRI, arteriography and EEG	No	Flunarizine (no effect) KD (improved) Diazepam (shortened attacks)
5	Spain	6 F	0	Nystagmus Chorea Dystonia Flaccid paresis	Unilateral	1–12 days	1/month	–	Mild ID Squint	Normal MRI, EEG Abnormal SPECT	MO	Flunarizine & topiramate (no effect) KD (attacks abated)
6	Spain	13 M	15	Flaccid paresis “drowsiness postictally”	Unilateral	1h–1 week	6/year	Epilepsy	Severe ID	White matter hyperintensities on MRI	No	Flunarizine (improved)
7	Spain	8 F	13	Hypotonia Nystagmus Dysphagia Hand posturing	Unilateral Bilateral	2–6 days	1/month	Nystagmus	Clumsiness Normal cognition	Normal MRI, EEG Abnormal ictal SPECT	MO	Flunarizine (improved)
8	Greece	9 M	18	Ataxia Flaccid paresis	Unilateral	Minutes-to-days	2/week	–	Developmental delay Tremor Ataxia	Normal MRI, EEG	MO	Topiramate (improved) Vertigo Paresthesia
9	Spain	16 F	3	Flaccid paresis	Unilateral	1–2 days	1/month	Epilepsy Cyclic vomiting	Severe ID Spasticity	Normal MRI, EEG	MO	– Epilepsy
10	Spain	12 M	18	Nystagmus Chorea Dystonia	Unilateral	Minutes-to-days	1–2/month	Epilepsy MA Dystonia Myoclonus	Severe ID	Normal MRI, EEG	MO	Diazepam (shortened attacks) HM

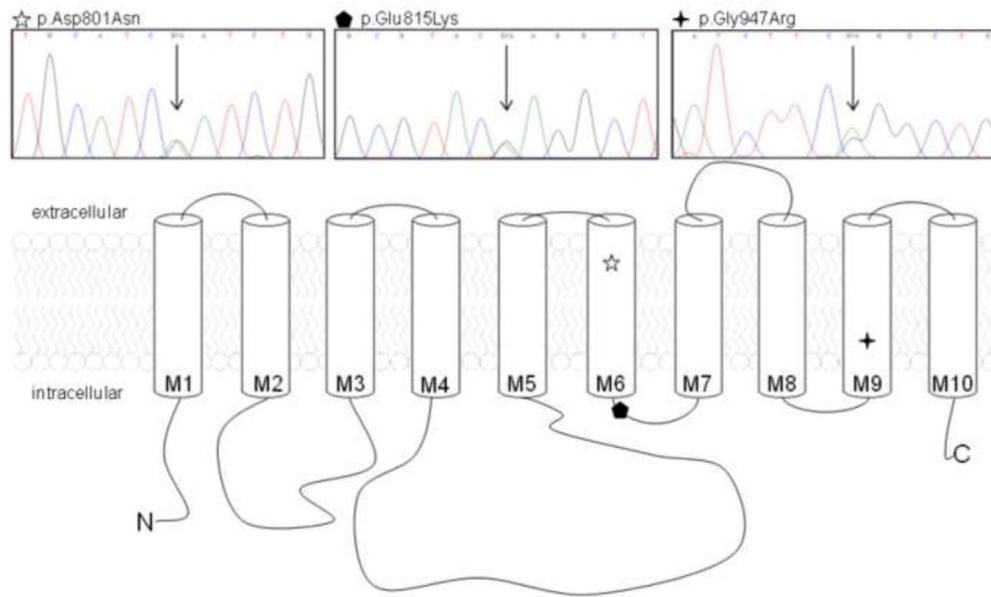


Fig. 1. Electropherograms of *ATP1A3* changes found in AHC patients and diagram of the *ATP1A3* protein indicating the positions of the mutations. Three *ATP1A3* mutations were found in five AHC patients. Mutations p.Asp801Asn and p.Gly947Arg are located within transmembrane domains M6 and M9, respectively, and p.Glu815Lys within cytoplasmic loop M6–7.

cationic gradients essential for a number of cell membrane functions, including muscle and nerve electrical excitability [13]. The ATPase alpha-3 isoform, in turn, appears to play a critical role during high-frequency activity, when intracellular Na^+ increases. Mutations in *ATP1A3*, have been described to cause at least two phenotypes: AHC and rapid-onset dystonia-parkinsonism (RODP) (DYT12), a movement disorder characterized by abrupt onset of dystonia, usually accompanied by signs of parkinsonism. A recent study proposes that the two disorders lie at both ends of a continuous phenotypic spectrum of *ATP1A3*-related disorders [15]. It was hypothesized that inability to maintain the high demand for ion transport during and after stressful events may relate to the development of abnormal movements in RODP [14]. This might be also the case in the more severe AHC phenotype, where even small stressful events may bring about more frequent and severe episodes, including status epilepticus [8]. In fact, presence of epilepsy may reflect a more profound pump dysfunction and in our series it was associated with worse global outcome.

There is evidence that the three identified amino acid substitutions are disease-causing: all are missense, have been previously described in several AHC patients and appeared *de novo*, as shown in all available trios. The mutations identified in our cohort are also the most frequent AHC-causing mutations in the five previous *ATP1A3*-screened case series, where p.Asp801Asn was the most frequent, followed by p.Glu815Lys and p.Gly947Arg [4–8]. In our series, p.Gly947Arg was the most frequently encountered mutation. All of these changes are G>A transitions located within hypermutable CpG dinucleotide sequences and have been only described as *de novo* mutations.

Recently, a Japanese study on 33 AHC cases attempted to establish genotype–phenotype correlations by grouping their case series according to the following *ATP1A3* mutation types: p.Asp801Asn, p.Glu815Lys or other mutations [8]. It was suggested that the p.Glu815Lys group had a more severe clinical course, while the p.Asp801Asn group resulted in a moderate form of AHC. Our results, despite the smaller sample size, may concur with these findings, since patients with the p.Gly947Arg or the p.Asp801Asn variants all had mild to moderate intellectual disability whereas the patient bearing the p.Glu815Lys variant had a severe and global psychomotor involvement. Conversely, patients with no mutation in *ATP1A3* also displayed variable degrees of neurological impairment, though they tended to present later in life.

Compared to ours, previous genetic studies in AHC showed a higher incidence of *ATP1A3* mutations. Although we have not ruled out the presence of *ATP1A3* CNVs in our patients, data derived from the functional analyses of *ATP1A3* mutations suggest that such CNVs would be more apt to produce a DYT12 phenotype, since DYT12-causing mutations reduce protein expression, whereas AHC-causing mutations seem to modulate pump activity [5,14]. Also, the possibility of additional AHC loci remains open, particularly considering the specific geographic origin of the present cohort.

Prior to the description of *ATP1A3* as the major genetic cause of AHC, genetic screenings in smaller AHC cohorts, or single case reports, identified mutations in three genes encoding ion-channels, i.e. *ATP1A2* [10, 11], *CACNA1A* [9] or the solute carriers *SLC2A1* [12] and *SLC1A3* [16]. The proteins encoded by three of these genes play important roles at glutamatergic synapses: *CACNA1A* encodes a presynaptic neuron

Table 2
Mutations found in five out of 10 patients with alternating hemiplegia of childhood.

Patient	Gene	Mutation			Inheritance	Frequency in AHC patients screened for this gene (see refs. [4–8])
		Exon	cDNA level	Protein level		
1	<i>ATP1A3</i>	17	c.2401G>A	p.Asp801Asn	Parental DNA unavailable	48%
2	<i>ATP1A3</i>	18	c.2443G>A	p.Glu815Lys	De novo	33%
3	<i>ATP1A3</i>	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	De novo	8%
4	<i>ATP1A3</i>	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	De novo	8%
5	<i>ATP1A3</i>	21	c.2839G>A	p.Gly947Arg	De novo	8%
	<i>CACNA1A</i>	11	c.1360G>A	p.Ala454Thr	Inherited from asymptomatic mother	17%

calcium channel involved in glutamate neurosecretion, while *ATP1A2* encodes the astrocytic ATPase isoform α_2 involved in glutamate reuptake; *SLC1A3*, in turn, encodes the glial glutamate and aspartate transporter EAAT1. Because of these previous findings and the existing clinical overlap between severe forms of FHM [17] and atypical AHC, we performed sequence analysis of the three known FHM genes and of *SLC2A1*, which encodes the glucose transporter at the blood–brain barrier. Mutations in *SLC2A1* are the cause of GLUT1DS, a syndrome that shows wide phenotypic variability and shares many clinical signs with AHC, such as delayed development, episodic eye movements, transient abnormal involuntary movements – including hemiparesis – and epilepsy. Mutational analysis of these four genes did not reveal the genetic cause of the disease in any of the patients that were negative in the *ATP1A3* screen. This agrees with a recent Italian study investigating *SLC2A1* mutations in AHC [18]. However, we identified the p.Ala454Thr variant in *CACNA1A* in patient 5 and her asymptomatic mother. This mutation was first considered a polymorphic variant with a frequency of 0.02 in the control population of a genetic screen performed in FHM and episodic ataxia patients [19]. It was later associated with early-onset progressive ataxia [20]. More recently, we found this mutation in two subjects displaying the milder phenotype in a family segregating both FHM and migraine with aura [21]. The functional in vitro analysis concluded that this mutation reduced the secretion efficiency of the channel, which prompted us to consider the p.Ala454Thr mutation as a negative modulator of the aura severity. Our patient 5 is also carrying an *ATP1A3* mutation. A possible relationship between *CACNA1A* and *ATP1A3* proteins has only been considered in a study where presynaptic Ca^{2+} buffers were shown to control the strength of a fast post-tetanic hyperpolarization mediated by the *ATP1A3* pump [22]. This led us to speculate that the consequences of the *ATP1A3* mutation in patient 5 could be modulated by the found *CACNA1A* variant and result in a milder AHC phenotype. It is conceivable that the many genes regulating membrane excitability are liable to act as each other's modifiers in paroxysmal neurological phenotypes and that variable expression in these dominantly inherited disorders may relate to epistatic or other types of gene–gene interaction.

A unique feature of three of our patients was the clinical response to KD institution, particularly concerning the paroxysmal symptoms. This concurs with two recent observations of KD-induced amelioration of paroxysmal signs in two AHC patients carrying mutations in *ATP1A3*, both initially diagnosed with GLUT1DS and one of them effectively harboring a *SLC2A1* rare variant [23,24]. At present there is no clear rationale for the use of KD therapy in AHC. Use in our patients was empirical and occurred before molecular diagnosis was known. Institution of the diet was decided in patients with very frequent attacks and lack of response to other treatments, and was based on previous observations of an AHC-like phenotype in GLUT1DS [12] and the finding of interictal abnormal cerebral glucose metabolism in the frontal lobes, ipsilateral putamina and cerebellum in AHC Japanese patients, as detected by means of FDG–PET studies [25]. Whatever the mechanism, all three patients where KD was tried underwent a substantial reduction of attacks and a long-lasting resolution in one (patient 5), only to recur very recently in association with intense emotional stress.

Our results confirm *ATP1A3* mutations as a common cause of AHC at both ends of the Mediterranean area, but also raise the issue of the existence of genetic heterogeneity. Studies focused on AHC patients who are negative for mutations in *ATP1A3*, including data mining of their existing massive sequencing results will hopefully identify novel genes or deep-intronic sequence variants associated with this devastating disorder.

Note added in proof

During the processing of this article, we performed a MLPA analysis, using the SALSA MLPA P059 Dystonia probemix (MRC Holland,

Amsterdam, The Netherlands), of samples from patients 6–10. No *ATP1A3* CNVs were detected.

Conflict of interest

The authors have no conflict of interest to declare.

Acknowledgments

We thank the patients and their families for accepting to participate in this study. We acknowledge the valuable contribution of referring physicians, M.T. García-Silva and M.R. Domingo. M.V-P is supported by Fundació Institut de Recerca Vall d'Hebron and C.S. by MINECO (Spain). This work is supported by Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (Catalunya, Spain), grants SGR 2009/0078 and SGR 2009/0971.

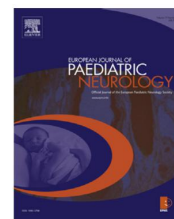
References

- [1] Verret S, Steele JC. Alternating hemiplegia in childhood: a report of eight patients with complicated migraine beginning in infancy. *Pediatrics* Apr 1971;47(4):675–80.
- [2] Bourgeois M, Aicardi J, Goutieres F. Alternating hemiplegia of childhood. *J Pediatr* May 1993;122(5 Pt 1):673–9.
- [3] Guevara-Campos J, Gonzalez-de Guevara L, Urbaz-Cano J, Tinedo R, Villamizar M, Rojas L. Alternating hemiplegia of childhood treated as epilepsy. Two new cases. *Rev Neurol* Mar 16–31 2005;40(6):351–3.
- [4] Rosewich H, Thiele H, Ohlenbusch A, Maschke U, Altmüller J, Frommolt P, et al. Heterozygous de-novo mutations in *ATP1A3* in patients with alternating hemiplegia of childhood: a whole-exome sequencing gene-identification study. *Lancet Neurol* Sep 2012;11(9):764–73.
- [5] Heinzen EL, Swoboda KJ, Hitomi Y, Gurrieri F, Nicole S, de Vries B, et al. De novo mutations in *ATP1A3* cause alternating hemiplegia of childhood. *Nat Genet* Sep 2012;44(9):1030–4.
- [6] Ishii A, Saito Y, Mitsui J, Ishiura H, Yoshimura J, Arai H, et al. Identification of *ATP1A3* mutations by exome sequencing as the cause of alternating hemiplegia of childhood in Japanese patients. *PLoS One* 2013;8(2):e56120.
- [7] Hoei-Hansen CE, Dali CI, Lyngby TJ, Duno M, Uldall P. Alternating hemiplegia of childhood in Denmark: clinical manifestations and *ATP1A3* mutation status. *Eur J Paediatr Neurol* Jan 2004;18(1):50–4.
- [8] Sasaki M, Ishii A, Saito Y, Morisada N, Iijima K, Takada S, et al. Genotype–phenotype correlations in alternating hemiplegia of childhood. *Neurology* Feb 2014;82(6):482–90.
- [9] de Vries B, Stam AH, Beker F, van den Maagdenberg AM, Vanmolkot KR, Laan L, et al. *CACNA1A* mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood. *Cephalalgia* Aug 2008;28(8):887–91.
- [10] Bassi MT, Bresolin N, Tonelli A, Nazos K, Crippa F, Baschiroto C, et al. A novel mutation in the *ATP1A2* gene causes alternating hemiplegia of childhood. *J Med Genet* Aug 2004;41(8):621–8.
- [11] Swoboda KJ, Kanavakis E, Xaidara A, Johnson JE, Leppert MF, Schlesinger-Massart MB, et al. Alternating hemiplegia of childhood or familial hemiplegic migraine? A novel *ATP1A2* mutation. *Ann Neurol* Jun 2004;55(6):884–7.
- [12] Rotstein M, Doran J, Yang H, Ullner PM, Engelstad K, De Vivo DC. *Glut1* deficiency and alternating hemiplegia of childhood. *Neurology* Dec 8 2009;73(23):2042–4.
- [13] Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* Feb 11 1988;16(3):1215.
- [14] de Carvalho Aguiar P, Sweadner KJ, Penniston JT, Zarella J, Liu L, Caton M, et al. Mutations in the $\text{Na}^+/\text{K}^+/\text{ATPase}$ α_3 gene *ATP1A3* are associated with rapid-onset dystonia parkinsonism. *Neuron* Jul 22 2004;43(2):169–75.
- [15] Rosewich H, Ohlenbusch A, Huppke P, Schlotawa L, Baethmann M, Carrillo I, et al. The expanding clinical and genetic spectrum of *ATP1A3*-related disorders. *Neurology* Mar 2014;82(11):945–55.
- [16] Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD, Baloh RW. Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology* Aug 23 2005;65(4):529–34.
- [17] Carreno O, Garcia-Silva MT, Garcia-Campos O, Martinez-de Aragon A, Cormand B, Macaya A. Acute striatal necrosis in hemiplegic migraine with de novo *CACNA1A* mutation. *Headache* Nov–Dec 2011;51(10):1542–6.
- [18] De Grandis E, Stagnaro M, Biancheri R, Giannotta M, Gobbi G, Traverso M, et al. Lack of *SLC2A1* (glucose transporter 1) mutations in 30 Italian patients with alternating hemiplegia of childhood. *J Child Neurol* Jul 2013;28(7):863–6.
- [19] Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, et al. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca^{2+} channel gene *CACNL1A4*. *Cell* Nov 1 1996;87(3):543–52.
- [20] Cricchi F, Di Lorenzo C, Grieco GS, Rengo C, Cardinale A, Racaniello M, et al. Early-onset progressive ataxia associated with the first *CACNA1A* mutation identified within the I–II loop. *J Neurol Sci* Mar 15 2007;254(1–2):69–71.
- [21] Serra SA, Cuenca-Leon E, Llobet A, Rubio-Moscardo F, Plata C, Carreno O, et al. A mutation in the first intracellular loop of *CACNA1A* prevents P/Q channel modulation by SNARE proteins and lowers exocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* Jan 26 2009;107(4):1672–7.

- [22] Kim JH, Sizov I, Dobretsov M, von Gersdorff H. Presynaptic Ca²⁺ buffers control the strength of a fast post-tetanic hyperpolarization mediated by the alpha3 Na⁽⁺⁾/K⁽⁺⁾-ATPase. *Nat Neurosci* Feb 2007;10(2):196–205.
- [23] Ullate-Campos A, Fons C, Artuch R, Castejón E, Martorell L, Ozelius L, et al. Alternating hemiplegia of childhood with a de novo mutation in ATP1A3 and changes in SLC2A1 responsive to a ketogenic diet. *Pediatr Neurol* Apr 2014;50(4):377–9.
- [24] Roubergue A, Roze E, Vuillaumier-Barrot S, Fontenille MJ, Méneret A, Vidailhet M, et al. The multiple faces of the ATP1A3-related dystonic movement disorder. *Mov Disord* Sep 2013;28(10):1457–9.
- [25] Sasaki M, Sakuma H, Fukushima A, Yamada K, Ohnishi T, Matsuda H. Abnormal cerebral glucose metabolism in alternating hemiplegia of childhood. *Brain Dev* Jan 2009;31(1):20–6.



Official Journal of the European Paediatric Neurology Society



Case study

A loss-of-function CACNA1A mutation causing benign paroxysmal torticollis of infancy



Marta Vila-Pueyo^{a,g}, Gemma G. Gené^{b,g}, Marina Flotats-Bastardes^c,
Xabier Elorza^b, Cèlia Sintas^{d,e,f}, Miguel A. Valverde^b, Bru Cormand^{d,e,f},
José M. Fernández-Fernández^b, Alfons Macaya^{a,c,*}

^a Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain

^b Laboratori de Fisiologia Molecular i Canalopaties, Departament de Ciències Experimentals i de la Salut, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

^c Secció de Neurologia Pediàtrica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona, Spain

^d Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain

^e Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain

^f Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER), Barcelona, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 April 2013

Received in revised form

25 November 2013

Accepted 23 December 2013

Keywords:

Benign paroxysmal torticollis of infancy

CACNA1A

P/Q channel

Patch clamp

Genetics

ABSTRACT

Benign paroxysmal torticollis of infancy (BPTI) is a rare paroxysmal disorder characterized by recurrent episodes of head tilt and accompanying general symptoms which remit spontaneously. The rare association with gain-of-function CACNA1A mutations, similar to hemiplegic migraine, has been reported. We report here two new BPTI patients from the same family carrying a heterozygous mutation in the CACNA1A gene leading to the change p.Glu533Lys. Functional analysis revealed that this mutation induces a loss of channel function due to impaired gating by voltage and much lower current density. Our data suggest that BPTI, a periodic syndrome commonly considered a migraine precursor, constitutes an age-specific manifestation of defective neuronal calcium channel activity.

© 2014 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Benign paroxysmal torticollis of infancy (BPTI) is a rare paroxysmal disorder characterized by recurrent episodes of

head tilt to one side and variable behavioral and autonomic changes. Attacks start during infancy, last minutes to days and usually recur monthly. They are accompanied by one or more of the following signs: pallor, irritability, malaise, vomiting and ataxia. Neurological examination between

* Corresponding author. Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Edifici Mediterrània, Institut de Recerca Vall d'Hebron, Passeig Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain. Tel.: +34 934893890; fax: +34 934894102.

E-mail address: amacaya@vhebron.net (A. Macaya).

^g These authors contributed equally to this work.

1090-3798/\$ – see front matter © 2014 European Paediatric Neurology Society. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ejpn.2013.12.011>

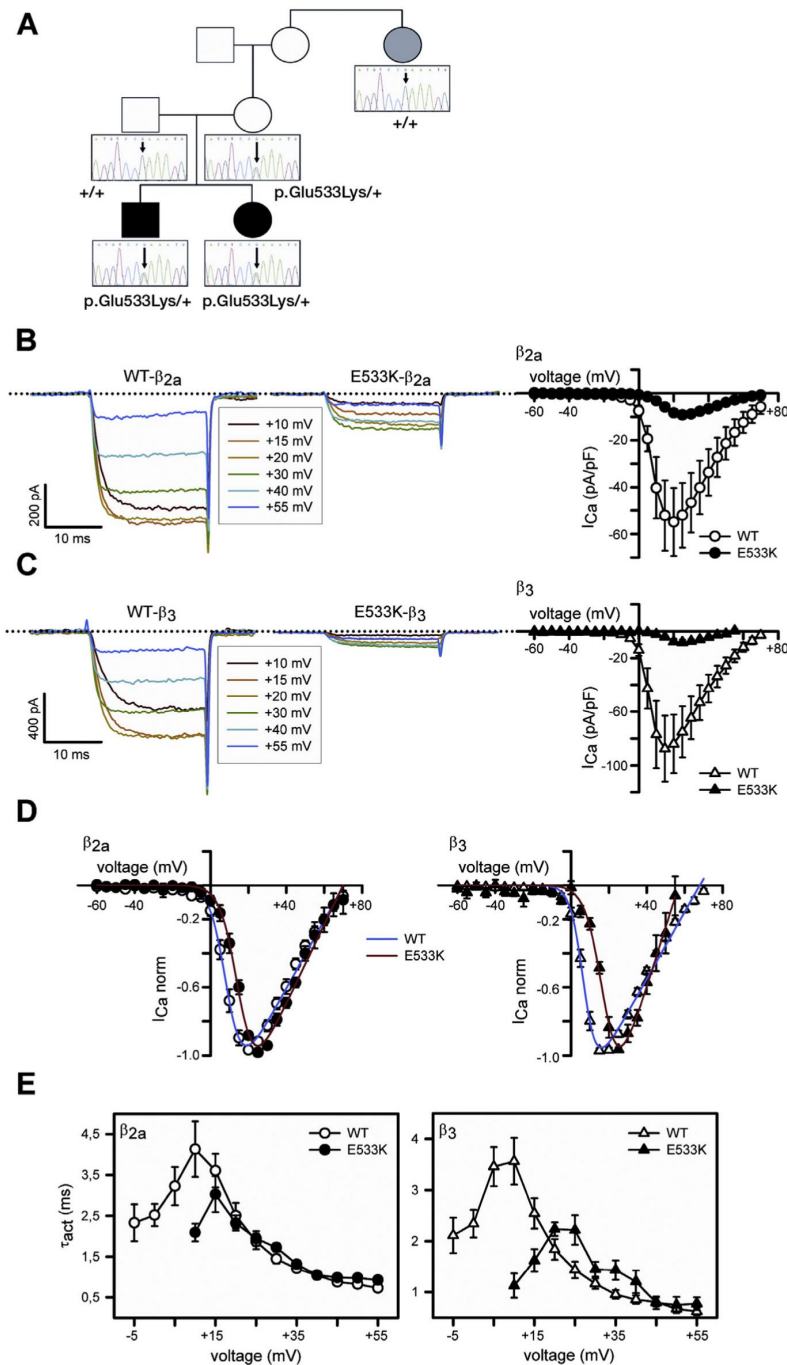


Fig. 1 – A) Pedigree of the family with the electropherograms showing the mutated or the wild-type residue in CACNA1A. White symbols indicate healthy individuals, black BPTI and grey epilepsy. **B-C)** Current traces illustrating voltage-dependence and activation kinetics (τ_{act}) of WT (left) and p.Glu533Lys (center) Ca_v2.1 channels, in response to 20 ms voltage pulses. Dotted lines in the current traces indicate the zero current level. Current density–voltage relationships are shown in the right panels (**B**: for channels containing the β_{2a} subunit; **C**: for channels containing the β_3 subunit). **D)** Normalized I–V curves for WT (open symbols) and p.Glu533Lys (closed symbols) Ca_v2.1 channels expressed in HEK293 cells. A modified Boltzmann equation was fitted to normalized current–voltage (I–V) to obtain the voltage dependence of activation for each Ca_v2.1 channel (indicated by $V_{1/2, act}$ values): $I = G_{max}(V - V_{rev}) / (1 + \exp(-(V - V_{1/2, act})/k_{act}))$. $V_{1/2, act}$ values were (in mV): WT β_{2a} (\circ , $n = 10$) 8.8 ± 1.1 ; p.Glu533Lys β_{2a} (\bullet , $n = 11$) 14.5 ± 0.7 ; WT β_{3a} (Δ , $n = 9$) 7.1 ± 0.8 ; p.Glu533Lys β_3 (\blacktriangle , $n = 8$) 17.3 ± 0.9 . **E)** Average τ_{act} of WT (open symbols) and p.Glu533Lys channels (closed symbols) at the indicated voltages. The presence of either the regulatory β_{2a} subunit or the β_3 subunit is indicated at each panel. Data are presented as the means \pm S.E.M. Statistical tests included Student's t test or Mann–Whitney test, as appropriate. Differences were considered significant if $P < 0.05$.

episodes is normal. It usually improves by age 2 years and tends to resolve by age 3–5, often evolving into benign paroxysmal vertigo (BPV)¹ or migraine with aura (MA).

There is some clinical and genetic evidence pointing to this childhood periodic syndrome as one of the infantile migraine precursors. Clinically, it is a paroxysmal disorder with accompanying signs similar to some of the non-headache features of migraine. Genetically, it has been occasionally associated with mutations in *CACNA1A*, a gene that encodes the ion-conducting pore and voltage-sensing α subunit of the neuronal $\text{Ca}_v2.1$ (P/Q-type) calcium channel and that has been linked to familial hemiplegic migraine (FHM).

We report a new case of this clinical-genetic association and provide functional evidence that the mutation is indeed disease-causing.

2. Case study

A 3-year-old boy was referred with a history of recurrent episodes of torticollis starting at the age of 9 months and occurring twice per month ever since. He experienced acute episodes of lateral flexion of neck, with ipsilateral flexion of the trunk and ataxia, and no useful ipsilateral hand movement. During the episodes, which lasted no longer than 5 min and were relieved by sleep, the patient became irritable, unsteady, aphasic and held onto his mother. No nystagmus or loss of consciousness were recorded. After age 2 years the patient appeared drowsy and apathetic during the episodes. His psychomotor development and interictal examination are normal. No pharmacological treatment was attempted due to the low frequency of the attacks at the age of referral. Her 10-year-old sister had experienced similar attacks between ages 13 months and 3 years. They occurred monthly and lasted from 30 min to 24 h and some reportedly associated upgaze deviation and severe global hypotonia. Treatment with carbamazepine worsened them. Her EEG and RM were normal. No overt migraine attacks have developed.

Peripheral blood samples were collected from both patients, parents and an epileptic aunt. Genomic DNA was isolated using a standard salting-out method. Promoter, all exons and flanking intronic regions of *CACNA1A* were amplified by PCR, purified and sequenced using BigDye Terminator cycle sequencing kit v3.1 and the automated sequencer ABI PRISM 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Copy Number Variant (CNV) studies for *CACNA1A* were performed by Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA) using the SALSA MLPA kit P279-A2 (MRC-Holland, Amsterdam, the Netherlands) and Quantitative Multiplex PCR of Short Fluorescent Fragments (QMPSF) using four sets of primer pairs that covered 16 additional exons (details available upon request).

A heterozygous G to A transition at cDNA position 1597 (c.1597G > A, reference sequence GeneBank NM_023035) was found in both patients and their asymptomatic mother, but not in their father nor their aunt (Fig. 1A). This mutation results in a substitution of glutamate for lysine at residue 533 (p.Glu533Lys). Such residue is located at the second voltage sensor domain (VSD) of the $\text{Ca}_v2.1$ channel and it has been suggested to necessarily contribute to the energy pathway

required for the movement of the voltage sensor to gate the channel. No CNV was found.

$\text{Ca}_v2.1$ wild-type (WT) and p.Glu533Lys (E533K) mutant human channels were heterologously expressed in HEK293 cells and analyzed using the whole-cell patch clamp technique as previously described.² We observed a significant decrease in maximum current density in the mutant p.Glu533Lys compared to WT P/Q channels containing functionally different regulatory β subunits (in channels containing the β_{2a} subunit: from -54.9 ± 14.6 pA/pF ($n = 10$) to -9.2 ± 1.6 pA/pF ($n = 11$), $P < 0.01$ (Fig. 1B); in channels containing the β_3 subunit: from -87.6 ± 24.5 pA/pF ($n = 9$) to -8.3 ± 1.9 pA/pF ($n = 8$), $P < 0.001$ (Fig. 1C)). The potential for half-maximal activation ($V_{1/2, \text{act}}$) was also significantly shifted to depolarized potentials for p.Glu533Lys channels (by ~ 6 mV for channels containing the β_{2a} subunit ($P < 0.001$) and by ~ 10 mV for channels containing the β_3 subunit ($P < 0.0001$)). Consistently, the maximum current amplitude was elicited by depolarizing pulses to $+20/+15$ mV or $+25$ mV for WT or p.Glu533Lys channels, respectively (Fig. 1D). Furthermore, activation kinetics of p.Glu533Lys mutant channels were also right shifted (by ~ 5 mV for channels containing the β_{2a} subunit and by ~ 10 mV for channels containing the β_3 subunit when compared to WT channels) (Fig. 1E).

3. Discussion

We have described the unusual instance of two sibs with BPTI carrying a loss-of-function mutation in *CACNA1A*. This observation adds to previous evidence suggesting that BPTI can be an early manifestation of a calcium neuronal channelopathy.

Because of the accompanying general symptoms, complete recovery between attacks, development of migraine or other related syndromes at follow-up, and the presence of family history of migraine, BPTI is often considered a childhood migraine precursor or equivalent. In fact, three previous reports have identified mutations in *CACNA1A* in patients^{2,3} or in relatives of patients⁴ with BPTI. Here we report the *CACNA1A* p.Glu533Lys mutation in two siblings affected with BPTI and their presumably asymptomatic mother. The latter might have displayed reduced penetrance or have suffered the same symptoms in infancy, but without being cause of concern.

This is the fourth mutation that links this syndrome to the α subunit of the neuronal $\text{Ca}_v2.1$ channel, encoded by the *CACNA1A* gene. The first mutation (p.Tyr1854*) was found in a BPTI patient from a kindred with FHM and episodic ataxia type-2 (EA-2).⁴ The patient was described as having attacks from six weeks of age, starting with tilting of the head, head turning to the left for 15–30 min, followed by vomiting and unsteadiness of gait, and lasting 1–3 days. The second mutation (p.Tyr1245Cys) was found and functionally characterized by our group in the clinical context of neonatal BPTI that evolved with aging, first into BPV and then into HM.² The third one (p.Gln736*) was found in a BPTI patient from a kindred with paroxysmal tonic upgaze and EA.³ The patient was described as having attacks from 16 months of age, starting with head tilting, accompanied by unsteadiness, moaning,

sweating and sometimes vomiting, and lasting for one to several hours.

The results of our functional studies of the p.Glu533Lys mutation on Ca_v2.1 channels expressed in HEK293 cells show that this mutation induces a loss of channel function due to an impaired gating by voltage and much lower current density. The later effect might be due to a reduction in the traffic of P/Q channels to the plasma membrane, as suggested for other EA-2 mutation (p.Glu147Lys) affecting a glutamate residue placed at a similar position but on the first VSD of the Ca_v2.1 channel. The p.Tyr1854* was analyzed *in vitro* elsewhere showing also a loss-of-function of the mutant channel. Moreover, the premature stop codon can lead to nonsense-mediated RNA decay (NMD) of the resulting transcripts, a process that, if triggered, would induce a loss-of-function due to haploinsufficiency. The p.Gln736* mutation has not been functionally studied, but the early position of the resulting premature stop codon made the authors suppose it would lead to NMD of the mutated transcripts and therefore to haploinsufficiency of the CACNA1A protein. These mutations all lead to a loss-of-function of the channel. However, our functional analysis of the p.Tyr1245Cys mutation showed a clear gain of function due to improved channel activation by voltage and decreased direct channel inhibition by G-proteins.²

Thus, the p.Glu533Lys mutation identified in our family and the two previously described mutations with premature stop codon (p.Tyr1854* and p.Gln736*), all induce a loss-of-function of the calcium channel, the most common functional correlate of mutations causing EA-2. Indeed, the p.Glu533Lys mutation has been previously found in a EA-2 patient and her affected relatives.⁵ Her spells started at age 12, lasted about 20 min and were sometimes precipitated by stress and preceded by headache.

Mutations in the CACNA1A gene have been now associated with a wide variety of paroxysmic syndromes, including EA-2, FHM, BPTI, other childhood periodic syndromes and a variant of alternating hemiplegia of childhood (AHC).

On the basis of its association with loss-of-function CACNA1A mutations, as in the cases reported here, or with CACNA1A haploinsufficiency, we hypothesize that BPTI may represent an age-specific, early manifestation of defective neuronal calcium channel activity.

Acknowledgments

The work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness, Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) Funds, and Plan E (Grants SAF2009-13182-C01, C02 and C03, SAF2012-31089, SAF2012-38140), Fondo de Investigación Sanitaria (Red HERACLES RD12/0042/0014) and Generalitat de Catalunya (grants 2009SGR1369, 2009SGR0971 and 2009SGR0078). MAV is the recipient of an ICREA Academia Award (Generalitat de Catalunya). MV-P was supported by a predoctoral grant from VHIR, Barcelona (Spain).

REFERENCES

1. Jahn K. Vertigo and balance in children—diagnostic approach and insights from imaging. *Europ J Paediatr Neurol* 2011;15:289–94.
2. Serra SA, Fernandez-Castillo N, Macaya A, et al. The hemiplegic migraine-associated Y1245C mutation in CACNA1A results in a gain of channel function due to its effect on the voltage sensor and G-protein-mediated inhibition. *Pflugers Arch* 2009;458:489–502.
3. Roubertie A, Echenne B, Leydet J, et al. Benign paroxysmal tonic upgaze, benign paroxysmal torticollis, episodic ataxia and CACNA1A mutation in a family. *J Neurol* 2008;255:1600–2.
4. Giffin NJ, Benton S, Goadsby PJ. Benign paroxysmal torticollis of infancy: four new cases and linkage to CACNA1A mutation. *Dev Med Child Neurol* 2002;44:490–3.
5. Scoggan KA, Friedman JH, Bulman DE. CACNA1A mutation in a EA-2 patient responsive to acetazolamide and valproic acid. *Can J Neurol Sci* 2006;33:68–72.