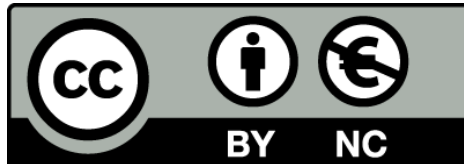




## Anàlisi genètica i funcional de la migranya hemiplègica i la migranya comuna

Oriel Carreño



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement- NoComercial 3.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento - NoComercial 3.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution-NonCommercial 3.0. Spain License.**



# Anàlisi genètica i funcional de la migranya hemiplègica i la migranya comuna

Oriel Carreño 2011

# **ANÀLISI GENÈTICA I FUNCIONAL DE LA MIGRANYA HEMIPLÈGICA I LA MIGRANYA COMUNA**

Memòria presentada per

**Oriel Carreño**

Per optar al grau de

**Doctora per la Universitat de Barcelona**

Programa de Genètica  
Departament de Genètica  
Bienni 2009-2011

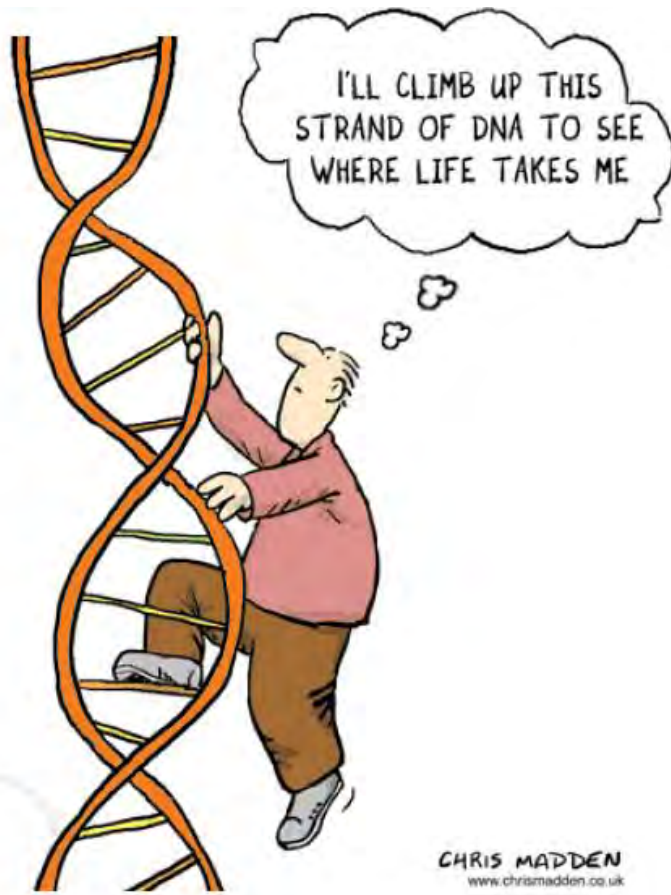
Tesi dirigida pel **Dr. Bru Cormand Rifà** i el **Dr. Alfons Macaya Ruiz** al  
Departament de Genètica de la Universitat de Barcelona

Dr. Bru Cormand Rifà

Dr. Alfons Macaya Ruiz

Oriel Carreño

2011



CHRIS MADDEN  
[www.chrismadden.co.uk](http://www.chrismadden.co.uk)

# ÍNDEX

---

ÍNDEX.....	1
<b>Abreviatures</b> .....	5
<b>Glossari</b> .....	7
<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	9
<b>1. La migranya</b> .....	9
1.1 Característiques clíniques.....	10
1.2 Diagnòstic.....	10
1.2.1 Classificació .....	10
1.2.2 Migranya sense aura (MO, 1.1 ICHD-II) .....	11
1.2.3 Migranya amb aura (MA, 1.2 ICHD-II).....	11
1.2.4 Migranya amb aura hemiplègica (FHM1.2.4, SHM1.2.5 ICHD-II) .....	11
1.3 Epidemiologia.....	12
1.3.1 Prevalença .....	12
1.3.2 Distribució per sexes.....	13
1.4 Fisiopatologia .....	14
1.4.1 Activació del sistema trigèminovascular: dolor, inflamació neurogènica i sensibilització .....	14
1.4.2 Depressió cortical propagant (CSD) i aura .....	15
1.4.3 Depressió cortical propagant i activació del sistema trigèminovascular.....	16
1.4.4 Possibles desencadenants de la CSD i la migranya en el cervell humà .....	17
1.5 Migranya i ambient .....	18
1.6 Tractament.....	18
1.6.1 Tractament agut de la migranya .....	18
1.6.2 Tractament profilàctic de la migranya .....	19
1.6.3 Noves dianes farmacològiques .....	19
<b>2. Bases genètiques de la migranya</b> .....	20
2.1 La migranya és un trastorn genètic .....	20
2.2 Formes monogèniques de la migranya .....	20

2.2.1	<i>Loci</i> i gens en la migranya hemiplègica .....	21
2.2.2	<i>Loci</i> i gens en altres formes de migranya .....	23
2.3	Formes comunes de migranya: l'herència complexa .....	23
2.3.1	Estudis d'associació: gens candidats .....	25
2.3.2	Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS) .....	25
<b>3.</b>	<b>Estudis funcionals en la migranya</b> .....	<b>30</b>
3.1.	Models cel·lulars .....	30
3.1.1	Estudis electrofisiològics de mutacions en el gen <i>CACNA1A</i> .....	31
3.1.2	Estudis funcionals de mutacions en el gen <i>ATP1A2</i> amb ouabaïna .....	31
3.1.3	Estudis funcionals de mutacions en el gen <i>SCN1A</i> .....	32
3.1.4	Estudis funcionals de mutacions en el gen <i>TRESK</i> .....	32
3.2	Model animals .....	32
3.2.1	Ratolins <i>knock-out</i> o genoanul·lats .....	32
3.2.2	Ratolins <i>knock-in</i> o genomodificats .....	33
3.2.3	<i>Caenorhabditis elegans</i> .....	33
3.3	Estudis en humans .....	33
<b>4.</b>	<b>Canals receptors de potencial transitori (TRPs)</b> .....	<b>34</b>
4.1	Classificació dels canals en mamífers .....	35
4.2	Modes d'activació .....	35
4.3	Estructura dels canals .....	35
4.3.1	Tetramerització en homòmers o heteròmers .....	36
4.5.	TRPs i malaltia .....	37
4.4.1	Implicació dels TRPs en malalties neurològiques .....	37
	<b>OBJECTIUS</b> .....	
	<b>RESULTATS</b> .....	
	INFORME DELS DIRECTORS DE LA TESI DOCTORAL .....	
	<b>Formes monogèniques de migranya</b> .....	<b>4</b>
	Article 1: Cribratge dels gens <i>ATP1A2</i> i <i>CACNA1A</i> en pacients amb migranya hemiplègica: estudis clínics, genètics i funcionals	
	<b>Formes monogèniques de migranya</b> .....	
	Article 2: Necrosi estriada aguda en migranya hemiplègica amb una mutació <i>de novo</i> al gen <i>CACNA1A</i>	

<b>Formes monogèniques de migranya .....</b>	
Article 3: Una mutació al primer llaç intracel·lular del canal CACNA1A evita la modulació per proteïnes SNARE i disminueix l'exocitosi	
<b>Formes multifactorials de migranya .....</b>	
Article 4: Variacions de tipus SNP en gens dels receptors de vanil·loids TRPV1 i TRPV3 estan associats amb la migranya a la població espanyola	
<b>DISCUSSIÓ .....</b>	<b>117</b>
<b>1. Anàlisi mutacional i funcional de gens prèviament relacionats amb les formes monogèniques de migranya.....</b>	<b>117</b>
1.1 Anàlisi del gen <i>CACNA1A</i> .....	117
1.1.1 Descripció de les variants identificades al gen <i>CACNA1A</i> .....	118
1.1.2 Efecte funcional de les variants identificades .....	122
1.1.3 Altres mutacions al gen <i>CACNA1A</i> .....	124
1.1.4 <i>CACNA1A</i> : Un gen, diversos fenotips.....	125
1.2 La migranya hemiplègica (HM) i altres gens ( <i>ATP1A2</i> , <i>SCN1A</i> ) .....	128
1.2.1 Descripció de les variants <i>ATP1A2</i> identificades.....	128
1.2.2 Estudis funcionals de la mutació p.Glu825Lys .....	129
1.2.3 El gen <i>SCN1A</i> .....	130
1.3 Mecanismes mutacionals .....	131
1.3.1 Mutacions <i>de novo</i> .....	131
1.3.2 Transicions.....	131
<b>2. Estudi d'associació genètica de tipus cas-control entre la migranya comuna i la superfamília gènica dels canals TRP .....</b>	<b>133</b>
2.1 Consideracions metodològiques de l'estudi cas-control .....	133
Determinació del fenotip en una malaltia complexa i selecció de la mostra control ....	133
Poder estadístic .....	134
Estratificació poblacional.....	134
Variables de confusió .....	135
Correccions per comparacions múltiples.....	135
Estimació d'haplotips .....	135
Errors de genotipació .....	136
Selecció de gens / tipus d'estudi associació .....	137
Selecció de polimorfismes .....	137
Interaccions gen-gen .....	138

Mecanismes epigenètics .....	138
Rèpliques .....	139
2.2 Els canals TRP i la migranya .....	139
<b>3. Consideracions generals sobre la migranya.....</b>	<b>142</b>
3.1 Heterogeneïtat clínica i genètica de la migranya .....	142
3.1.1 El rol dels gens FHM en SHM i en MA no hemiplègica.....	142
3.1.2 L'heterogeneïtat en les formes complexes de la migranya .....	143
3.2 Comorbiditat amb altres trastorns .....	144
3.3 La migranya sense aura i la migranya amb aura són el mateix trastorn? .....	145
3.3.1 Hipòtesi de treball per a la migranya complexa.....	146
3.4 Les cefalees primàries com a continuum .....	147
<b>4. Perspectives de futur en l'estudi de la migranya .....</b>	<b>149</b>
4.1 Aproximació a les formes complexes .....	149
4.1.1 GWAS: variants genètiques comunes .....	149
4.1.2 Variants genètiques rares .....	150
4.1.3 Altres variants genètiques .....	151
4.1.4 Efectes epigenètics .....	151
4.2 Aproximació a les formes mendelianes.....	151
4.2.1 Seqüenciació massiva .....	151
<b>CONCLUSIONS .....</b>	<b>153</b>
<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>155</b>



## ABREVIATURES

3'UTR: Regió no traduïda a 3' del gen (de l'anglès *untranslated region*)

5-HT: 5-hidroxitriptamina o serotonina

ACh: Acetilcolina

AH: Hemiplegia alternant (de l'anglès *alternating hemiplegia*)

ATP1A2: Gen de la subunitat  $\alpha 2$  de l'ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$

CACNA1A: Gen de la subunitat  $\alpha 1A$  del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  de tipus P/Q

CADASIL: Arteriopatia dominant amb infarts subcorticals i leucoencefalopatia (de l'anglès *dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leucoencephalopathy*)

CBF: Flux de sang cerebral (de l'anglès *cerebral blood flow*)

CGRP: Gen del pèptid relacionat amb la calcitonina

CNVs: Variants del número de còpies (de l'anglès *copy number variants*)

CSD: Depressió cortical propagant (de l'anglès *cortical spreading depression*)

DNA: Àcid desoxiribonucleic

DZ: Dizigòtics

EA2: Atàxia episòdica de tipus 2 (de l'anglès *episodic ataxia type 2*)

EAAT1: Gen del transportador d'aminoàcids excitatoris 1 (de l'anglès *excitatory amino acid transporter 1*)

EAAT2: Gen del transportador d'aminoàcids excitatoris 2 (de l'anglès *excitatory amino acid transporter 2*).

eQTL: Locus d'expressió d'un caràcter quantitatiu (de l'anglès *expression quantitative trait locus*)

ERDB: Ceguesa repetitiva transitòria provocada diària (de l'anglès *elicited repetitive transient daily blindness*)

FHM: Migranya hemiplègica familiar (de l'anglès *familial hemiplegic migraine*)

FRET: Transferència d'energia per ressonància de fluorescència basada en espectroscopia (de l'anglès *spectroscopy-based fluorescence resonance energy transfer*)

GPCR: Receptors units a proteïnes G (del anglès *G protein-coupled receptor*)

GWAS: Estudi d'associació a escala genòmica (de l'anglès *genome-wide association study*)

HeLa: Llinatge de cèl·lules epitelials humanes procedents d'un carcinoma cervical de la pacient Henrietta Lacks.

ICHD: Classificació internacional de cefalees (de l'anglès *International Classification for Headache Disorders*)

IHS: Societat internacional de cefalees (de l'anglès *International Headache Society*)

IP3: Inositol trifosfat

K2P: Canal de potassi amb dos dominis de tipus porus (de l'anglès *two-pore domain*)

LCA: Anàlisi de classes latents (de l'anglès *latent class analysis*)

MA: Migranya amb aura

MLPA: Amplificació multiplex dependent de lligació de la sonda (de l'anglès *multiplex ligation-dependent probe amplification*)

MO: Migranya sense aura

MRI: Ressonància magnètica (de l'anglès *magnetic resonance imaging*)

mRNA: RNA missatger

MTDH: Gen de la metadherina (de l'anglès *metadherin*)

MTHFR: Gen de la metilentetrahidrofolat reductasa (de l'anglès *methylenetetrahydrofolate reductase*)

MZ: Monozigòtics

NGFR: Gen del receptor del factor de creixement nerviós (de l'anglès *nerve growth factor receptor*)

NKA: Neuroquinina A

NMD: Degradació mediada per mRNA sense sentit (de l'anglès *nonsense-mediated mRNA decay*)

NO: Òxid nítric

OR: De l'anglès *odds ratio*

PCR: Reacció en cadena de la polimerasa (de l'anglès *polymerase chain reaction*)

pRTA: Acidosi tubular renal (de l'anglès *renal tubular acidosis*)

QMPSF: PRC multiplex quantitativa de petits fragments fluorescents (de l'anglès *quantitative multiplex polymerase chain reaction of short fluorescent fragments*)

RNA: Àcid ribonucleic

RVCL: Vasculopatia retinal amb leucodistròfia cerebral (de l'anglès *retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy*)

SCA6: Atàxia espinocerebel·losa de tipus 6

SCN1A: Gen de la subunitat  $\alpha 1$  del canal de sodi Na<sub>1.1</sub> dependent de voltatge

SHM: Migranya hemiplègica esporàdica (de l'anglès *sporadic hemiplegic migraine*)

SNP: Polimorfisme d'un sol nucleòtid (de l'anglès *single nucleotide polymorphism*)

SPG: Gangli esfenopalatí

SSN: Nucli salivar superior

SSNC: Sistema nerviós central

TCA: Anàlisi de components d'un tret (de l'anglès *trait component analysis*)

TREX1: gen de l'exonucleasa reparadora tres prima 1 (del anglès *three prime repair exonuclease 1*)

TRPs: Canals receptors de potencial transitori (de l'anglès *transient receptor potential channels*)

VIP: Pèptid intestinal vasoactiu

WT: Silvestre (de l'anglès *wild type*)

## GLOSSARI

**Afàsia:** Trastorn complex del llenguatge caracteritzat per l'alteració de la facultat normal d'expressar les idees mitjançant símbols lògics o de comprendre llur valor semàntic.

**Al·lodínia:** Sensació de dolor en resposta a estímuls normalment no dolorosos

**Aura:** Sensació o fenomen d'ordre cutani, psíquic, motor, etc., que anuncia o precedeix una crisi migranyosa o d'alguna altra malaltia (p.ex. epilèpsia).

**Comorbiditat:** Dues condicions mèdiques estan presents de forma simultània en una mateixa persona de forma més freqüent que allò que s'esperaria per atzar.

**EF-hand:** Domini estructural hèlix-llaç-hèlix que es troba en una gran família de proteïnes d'unió a calci.

**Escotoma:** Àrea del camp visual en què la visió és nul·la o molt feble.

**Estudis *in vitro*:** Estudis de biologia experimental que es duen a terme utilitzant els components d'un organisme que han estat aïllats del seu context biològic habitual per tal de permetre una anàlisi més detallada o més convenient que la que es pot fer amb organismes sencers.

**Fonofòbia:** Sensibilitat extrema al soroll.

**Fotofòbia:** Sensibilitat extrema a la llum.

**Hiperèmia:** Acumulació de sang en una regió orgànica; congestió, plètora.

**Isquèmia:** Detenció o suspensió, absoluta o relativa, de la circulació arterial en una zona determinada; l'estat subsegüent.

**Oligoèmia:** Deficiència en la quantitat de sang en el cos, un òrgan o teixit.

**Ouabaïna:** Toxina potent que s'utilitzava per emmetzinar fletxes al Gabó. Es pot extreure de l'escorça de l'*Acocanthera ouabaïo*. S'uneix i inhibeix la bomba de sodi-potassi (ATPasa de Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>)

**Parestèsia:** Sensació o conjunt de sensacions anormals, especialment formigueig, adormiment o ardor que experimenten a la pell certs malalts del sistema nerviós o circulatori.

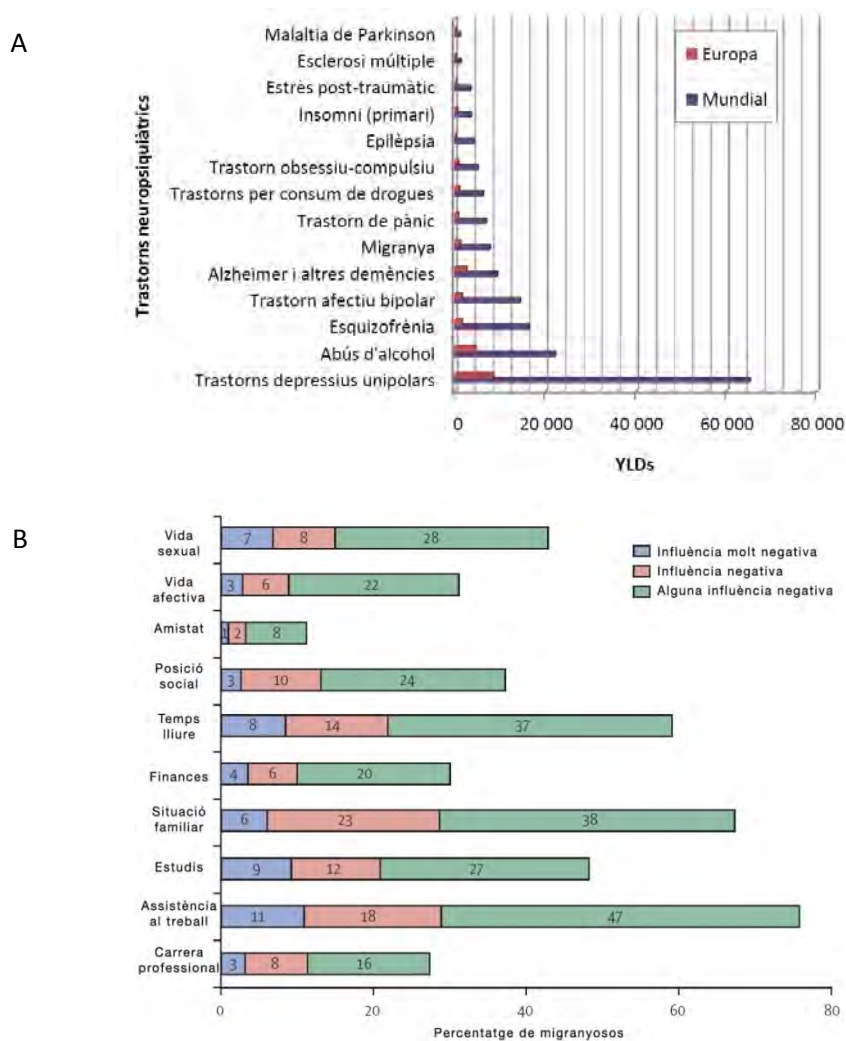
**Pròdrom:** Signe precursor d'un mal.



# INTRODUCCIÓ

## 1. La migranya

La migranya (del grec *hemikranion* 'un costat del cap') és una malaltia neurològica que consisteix en mal de cap, habitualment molt intens i incapacitant per a la persona que el pateix. Està a la sisena posició del rànquing mundial de l'Organització Mundial de la Salut (OMS) de malalties neuropsiquiàtriques que provoquen discapacitat. Ocasiona costos socioeconòmics molt elevats, no només durant la fase aguda de l'atac, ja que repercuteix en les relacions socials i familiars, el rendiment escolar i fins i tot la permanència al lloc de treball (Wessman et al. 2007; WHO 2008) (**figura 1**).



**Figura 1.** A) Gràfica amb les dades de la OMS dels anys viscuts amb discapacitat (YLD) de les malalties neuropsiquiàtriques. Dades extretes de (WHO 2008). B) Efecte de la migranya en aspectes importants de la vida. Adaptat de (Jensen i Stovner 2008).

## 1. 1 Característiques clíniques

La migranya és una malaltia comuna caracteritzada per atacs incapacitants i recurrents de mal de cap. Aquesta cefalea primària presenta episodis de naturalesa pulsativa, amb distribució unilateral, intensitat moderada o severa, que empitjoren amb el moviment, i poden anar acompanyats de fotofòbia, fonofòbia, nàusees i/o vòmits (IHS 2004). Un atac de migranya típic conté cinc fases: pròdrom (p.ex. ànsia pel menjar), aura, cefalea, resolució (disminueix el dolor), i recuperació. No totes les fases són necessàries per constituir un atac de migranya i varien entre pacients i atacs (revisat a (Wessman et al. 2007)).

## 1.2 Diagnòstic

La manca de marcadors biològics i el caràcter episòdic de la migranya dificulten en gran mesura el diagnòstic d'aquest trastorn.

### 1.2.1 Classificació

Els criteris de classificació sistemàtica de les cefalees foren publicats l'any 1988 per la *International Classification for Headache Disorders ICHD-I* (IHS 1988). Posteriorment, la classificació va ser revisada i actualment s'utilitza la *ICHD-II*, publicada l'any 2004 (IHS 2004) (revisat a (Olesen 2008)). Les principals categories de la migranya i el codi de diagnòstic es detallen a la **taula 1**.

**Taula 1.** Classificació de la migranya (ICHD-II): codi i diagnòstic (IHS 2004).

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 cíclics
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
1.6 Probable migranya
1.6.1 Probable migranya sense aura
1.6.2 Probable migranya amb aura
1.6.3 Probable migranya crònica

Malgrat tot, els avenços en la recerca posen de manifest mancances en els criteris de diagnòstic. La classificació de la ICHD és massa restrictiva i molts pacients no es poden diagnosticar correctament. Actualment s'està preparant una nova edició que es publicarà l'any 2013 (Olesen 2011).

Per aquesta raó s'han desenvolupat altres mètodes. L'anàlisi de les classes latents (LCA) és un mètode estadístic que permet identificar subgrups de pacients (classes latents) a partir de dades categòriques multivariades. S'aplica a les dades simptomatològiques de les cefalees per obtenir grups ordenats segons la severitat. Aquests grups poden incloure tant individus amb migranya sense aura (MO) com amb migranya amb aura (MA), així com individus que no complirien estrictament els criteris ICHD (Nyholt 2004). Un altre mètode utilitzat ha estat l'anàlisi de components d'un tret (TCA) que separa en endofenotips la ICHD.

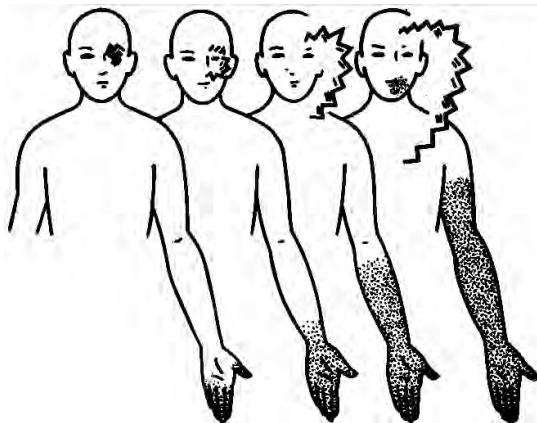
### 1.2.2 Migranya sense aura (MO, 1.1 ICHD-II)

La migranya sense aura (MO) és la variant més comuna, presenta una major freqüència de crisis i aquestes són més severes. Per al diagnòstic de MO, un individu ha de patir com a mínim 5 crisis que compleixin els criteris de la **taula 2**. En els cas dels nens, el diagnòstic variarà: la durada de les crisis pot ser de 2 a 72 hores i el dolor acostuma a ser bilateral (IHS 2004).

### 1.2.3 Migranya amb aura (MA, 1.2 ICHD-II)

La migranya amb aura (MA) es diagnostica quan la cefalea està associada a un o més símptomes, totalment reversibles, de disfunció de l'escorça cerebral o del tronc de l'encèfal. Els més comuns són l'aura visual i la sensorial (**figura 2**). Els criteris de diagnòstic s'especifiquen a la **taula 2** i la classificació a la **taula 1** (IHS 2004).

**Figura 2.** Representació de l'aura visual i sensorial al llarg del temps. L'aura visual es presenta sovint en forma de figures en zig-zaga en el punt de fixació, que s'estenen progressivament cap a dreta o esquerra i adopten formes convexes, poden centellejar i deixar un cert grau d'escotoma. L'aura sensorial es presenta en forma de formigueig o punxades que s'estenen des del punt d'origen cap al voltant i afecten en major o menor grau una banda del cos o la cara (IHS 2004). Modificat de <http://www.humgen.nl/lab-frants/migraine/Introduction.htm>



### 1.2.4 Migranya amb aura hemiplègica (FHM, 1.2.4 i SHM, 1.2.5 ICHD-II)

La migranya hemiplègica (HM) és una forma rara de MA caracteritzada per la presència de debilitat motora o paràlisi d'un hemicòs durant l'aura. Presenta dues formes principals en funció de la història familiar: els pacients amb almenys un parent de primer o de segon grau que té aura que inclogui debilitat motora pateix migranya hemiplègica familiar (FHM), mentre

que els pacients sense història familiar reben un diagnòstic de migranya hemiplègica esporàdica (SHM) (IHS 2004). La FHM té una herència mendeliana autosòmica dominant i se n'han pogut identificar tres gens responsables (veure apartat 2.2.1 Introducció).

**Taula 2.** Criteris de diagnòstic per a la migranya sense aura (MO) i la migranya amb aura (MA) (IHS 2004).

1.1 MIGRANYA SENSE AURA
A. Com a mínim 5 episodis que compleixin criteris B-D
B. Cefalea de entre 4 i 72 hores de durada (no tractada o amb tractament ineficaç)
C. Cefalea que presenta com a mínim dues de les següents característiques:
1. Localització unilateral
2. Qualitat pulsativa
3. Intensitat moderada a greu
4. Conduex a evitar o està agreujada per l'activitat física rutinària (p.ex. caminar, pujar escales)
D. Durant el dolor presenta com a mínim un dels següents símptomes:
1. Nàusea i/o vòmit
2. Fotofòbia i fonofòbia
E. No és atribuïble a cap altra trastorn
1.2 MIGRANYA AMB AURA TÍPICA
A. Com a mínim 2 episodis que compleixin el criteri B-D
B. Aura migranyosa per a un dels subtipus 1.2.1 – 1.2.6 consisteix en almenys una de les següents característiques, sense debilitat motora:
1. Síntomes visuals completament reversibles, incloent trets positius (llums pampalluguejants, taques i línies) i/o trets negatius (escotoma)
2. Síntomes sensitius totalment reversibles incloent trets positius (parestèsia) i/o trets negatius (entumiment)
3. Trastorn disfàsic de la parla totalment reversible
C. Com a mínim dues de les següents característiques:
1. Síntomes visuals homònims i/o sensitius unilaterals
2. com a mínim un dels símptomes de l'aura es desenvolupa gradualment durant 5 o més min. i/o diferents símptomes d'aura ocorren successivament 5 min. o més
3. cada símptoma té una durada d'entre 5 i 60 minuts.
D. La cefalea compleix els criteris B-D per a "migranya sense aura" i comença durant o en el 60 minuts següents
E. No atribuïble a cap altre trastorn

## 1.3 Epidemiologia

La manca d'un criteri de diagnòstic clar complica els estudis epidemiològics. L'aplicació dels criteris ICHD-II ha permès homogeneïtzar les definicions i realitzar estudis amb una major precisió (Jensen i Stovner 2008).

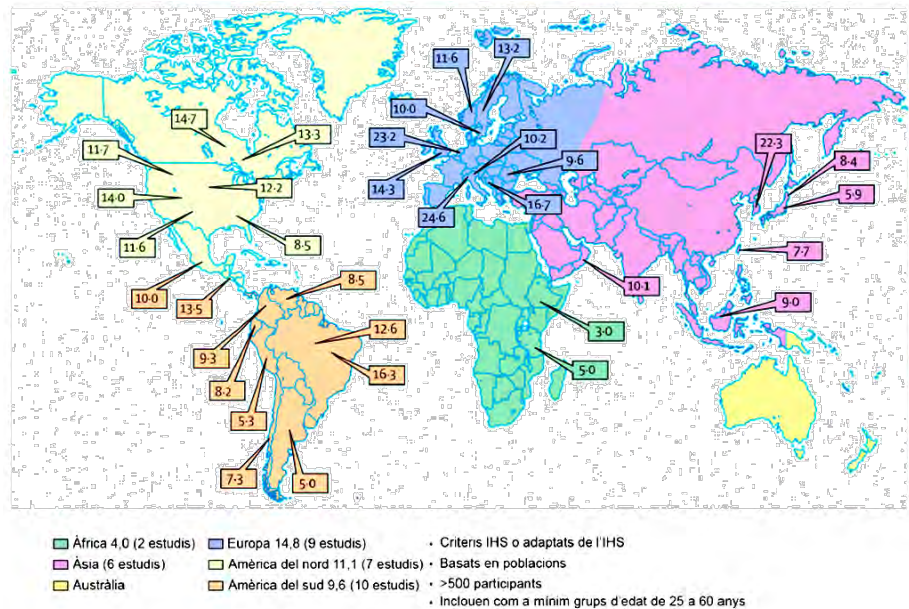
### 1.3.1 Prevalença

La prevalença mundial de la migranya és d'un 10% i la prevalença al llarg de la vida és del 14% (Jensen i Stovner 2008). La prevalença al diferents països és molt variable (**figura 3**), però no és fàcil saber si aquests diferències són reals o degudes a les diferències metodològiques entre estudis com ara: la forma de la recollida de dades, l'estructura de la població estudiada, l'aplicació dels criteris diagnòstics, la formulació de les preguntes, les diferències culturals a l'hora de descriure els símptomes o les diferències en els factors ambientals entre regions



geogràfiques (Jensen i Stovner 2008; Cooke i Becker 2010; Stovner i Andree 2010). L'últim estudi que recull les dades europees fa una estimació de la prevalença de les cefalees en un 53%. I concretament la migranya, un dels tipus de cefalea, la patirien un 14,7% dels adults (8% en homes i 17,6% en dones), un 9,2% dels infants (5,2% nens i 9,1% nenes) i al llarg de la vida un 16% de les persones (11% homes i 20% dones) (Stovner i Andree 2010).

**Figura 3.** Estudis de prevalença anual de migranya en adults utilitzant els criteris ICHD-II o modificats. Adaptada de (Jensen i Stovner 2008).



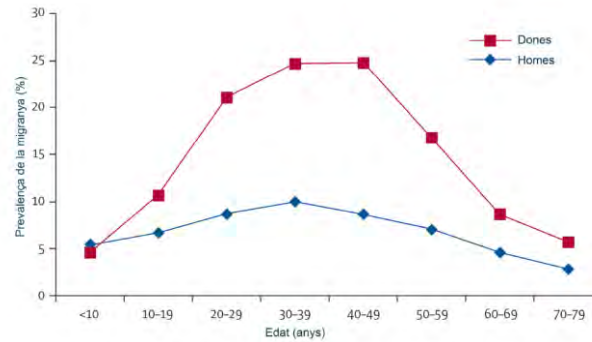
Pocs estudis

tenen en compte les categories diagnòstiques ja que el qüestionari s'ha de dur a terme mitjançant entrevistes amb especialistes. Un estudi detallat va estimar que la prevalença al llarg de la vida en dones era del 16% per MO, 7% per MA amb cefalea i 3% per MA sense cefalea, mentre que en homes era de 8%, 4% i 1%, respectivament (Russell et al. 1995). El mateix grup de recerca en un estudi sistemàtic de MA no va trobar diferències entre gèneres (Russell i Olesen 1996). La prevalença de FHM i SHM s'ha estimat en 0,001-0,002% (Thomsen et al. 2002; Ducros 2008)

### 1.3.2 Distribució per sexes

A partir de la pubertat s'observa que la prevalença en el sexe femení augmenta. Així, als 20 anys observem una relació dona:home 2:1 que arriba a un màxim al voltant dels 40 anys en què el desequilibri és de 3:1. Després de la menopausa la prevalença disminueix en dones però continua essent més alta que en homes (**figura 4**) (Jensen i Stovner 2008).

**Figura 4.** Distribució de la prevalença de la migranya per edat i sexe. Adaptada de (Jensen i Stovner 2008).



## 1.4 Fisiopatologia

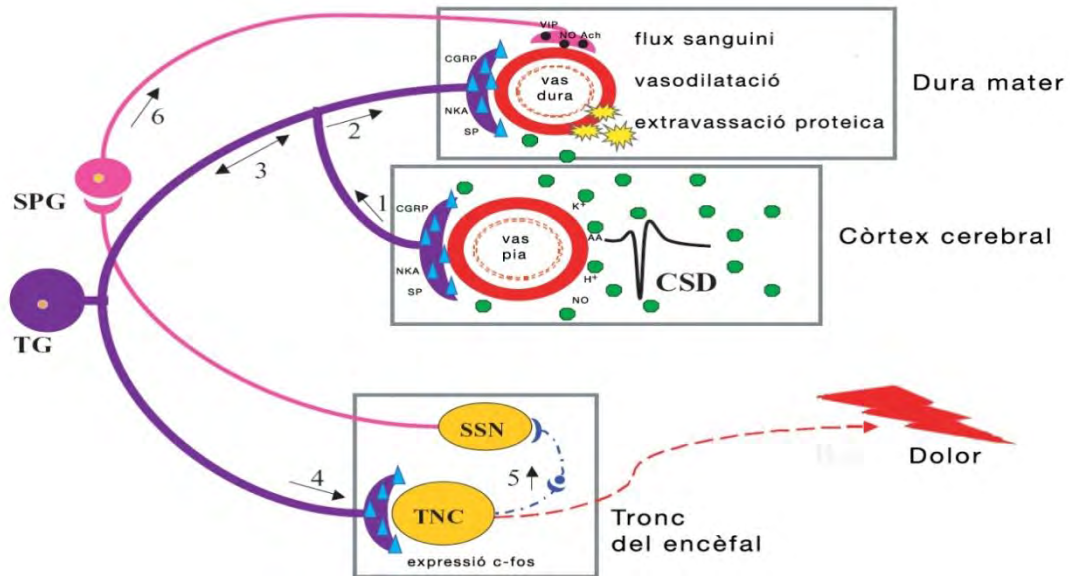
Encara que es pensava que la migranya tenia un origen exclusivament vascular o neurogènic, la visió actual és que la migranya té un origen neurovascular (revisat a (Goadsby 2007)).

### 1.4.1 Activació del sistema trigèminovascular: dolor, inflamació neurogènica i sensibilització

La causa del mal de cap migranyós és l'activació del sistema trigèminovascular (TGVS). Aquest està format per vasos sanguinis de la superfície de l'escorça cerebral i de les meninges que estan innervats per fibres sensorials nociceptives aferents de la divisió oftàlmica del nervi trigemin, el qual es projecta al nucli caudat trigeminal (TNC) del tronc de l'encèfal, que al seu torn es projecta als centres del dolor (de Vries, B. et al. 2009).

Les estructures cerebrals involucrades en la percepció del dolor inclouen una àrea de la substància gris periaqueductal (PAG) i diversos nuclis talàmics. La PAG està implicada en el dolor craniovascular no només a través de les projeccions ascendents del tàlem, sinó també mitjançant vies neuronals de modulació descendent (Pietrobon i Striessnig 2003).

Per una altra banda, l'activació del TGVS també provoca l'alliberament de neuropèptids vasoactius com el pèptid relacionat amb el gen de la calcitonina (CGRP), la substància P (SP) o la neuroquinina A (NKA), continguts a les terminals de les neurones perifèriques (**figura 5**). Aquests neuropèptids, sobretot el CGRP, produeixen la inflamació neurogènica: vasodilatació de les meninges, extravasació plasmàtica i desgranulació de mastòcits amb la conseqüent secreció de substàncies proinflamàtores a la *dura mater* (Bolay et al. 2002). L'activació del nervi trigemin també produeix la vasodilatació a les meninges a través de l'activació del reflex parasimpàtic a nivell del nucli salivar superior (SSN) i eferents parasimpàtiques via gangli esfenopalatí (SPG), on es promou l'augment de flux sanguini a la *dura mater* mitjançant l'alliberament de pèptid intestinal vasoactiu (VIP), oxid nítric (NO) i acetilcolina (ACh) (**figura 5**; (Bolay et al. 2002)). La vasodilatació neurogènica estimula encara més els nociceptors aferents i contribueix al dolor (Pietrobon 2005). Entre 5 a 20 minuts després de l'inici d'un atac migranyós, se sensibilitzen els nociceptors perifèrics del trigemin. El llindar d'activació neuronal disminueix, produint alliberament d'agents proinflamatoris i una sensació de dolor pulsativa. Més tard, la pell del pacient es torna al·lòdínica, a causa de la sensibilització de neurones de segon ordre (Meents et al. 2010). La majoria dels pacients amb migranya (63,2%) presenten al·lòdínica cutània (Lipton et al. 2008).



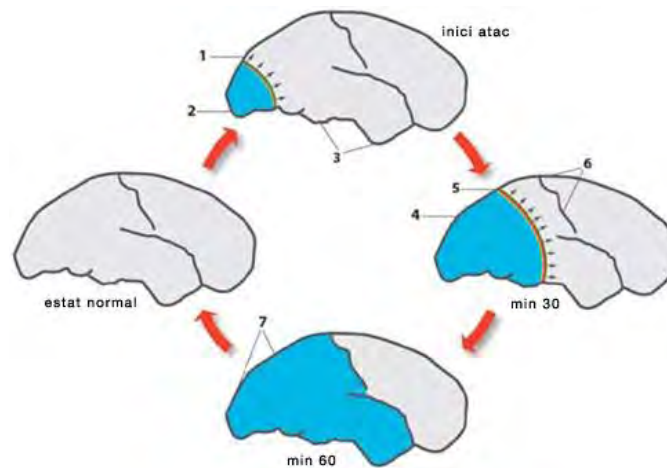
**Figura 5.** Connexió entre CSD i activació del sistema trigèmino-vascular. La intensa activitat neurometabòlica de la CSD provoca l'alliberament de ions  $K^+$  i  $H^+$ , neurotransmissors i metabòlits (p.ex. òxid nítric (NO)), adenosina i àcid araquidònic (AA) a l'espai extracel·lular i perivascular causant hiperèmia transitòria i vasodilatació a l'escorça, la pia i la dura mater. Aquestes molècules activen (1) i sensibilitzen les aferents perivasculars del trigemin i transmeten els impulsos al gangli trigeminal (TG, 3) i al nucli caudat trigeminal (TNC, 4). Els impulsos del TNC es dirigeixen a estructures involucrades en la transmissió i el processament del dolor. Les aferents trigeminals de la dura poden ser activades directament o indirectament (2) i possiblement sensibilitzades per edema (groc) alliberant pèptids vasoactius. (CGRP, SP, NKA; triangles blaus). L'activació ipsilateral del sistema nerviós estimula el nucli salivatori superior (SSN, 5) i les aferents parasimpàtiques per via del gangli esfenopalatí (SPG, 6). Les parasimpàtiques postganglionars promouen la vasodilatació i augmenten el flux sanguini alliberant a la dura mater VIP, NO o Ach (cercles negres). Adaptada de (Bolat et al. 2002).

#### 1.4.2 Depressió cortical propagant (CSD) i aura

La CSD és una onada de despolarització de les membranes de les cèl·lules neuronals i gials que s'estén per l'escorça cerebral a una velocitat de 2-5 mm/min, va acompanyada de fluxos massius de ions (calci, sodi i potassi) i va seguida d'una inhibició de llarga durada de l'activitat neuronal espontània i evocada. Fou observada per Leão en estimular elèctricament el còrtex de conill (Leao 1944). Actualment s'accepta que la migranya amb aura té un origen neuronal i molt probablement és causada per l'equivalent humà de la CSD de Leão. Presenta la mateixa velocitat que va calcular Lashley per a la seva aura visual (Lashley 1941). Els canvis electrofisiològics de la CSD estan associats amb seqüències d'augment o disminució del flux sanguini cerebral. Les similituds entre la CSD i l'aura visual fan postular la hipòtesi que la CSD és responsable de l'aura (**figura 6**; (Lauritzen 2001)).

És possible que la CSD sigui un mecanisme de defensa propi del cervell als estímuls forts, i pot ser provocada per l'estimulació elèctrica del teixit cerebral, trauma cortical, isquèmia cerebral, o l'aplicació al còrtex d'altres concentracions de potassi o aminoàcids neuroexcitadors com el glutamat. Els fenòmens d'aura positius (p.ex: centelleigs) poden explicar-se pel front d'hiperexcitació transitori de la CSD, mentre que els negatius (p.ex: escotoma) s'explicarien per

la depressió neuronal subsegüent (revisat a (van den Maagdenberg et al. 2007; de Vries, B. et al. 2009)).



**Figura 6.** Efecte de la depressió cortical propagant (CSD) durant un atac de migranya amb aura. Línia vermella: regió de la despolarització neuronal que causa i coincideix amb la depressió de l'activitat cortical. Zona de color blau clar: flux de sang cerebral (CBF). Fletxes: indiquen direcció de la propagació. A l'inici de l'atac migranyós amb aura visual, la CSD sorgeix occipitalment (1) i avança anteriorment. En el front de l'ona despolaritzant, els desequilibris transitoris iònics i metabòlics desencadenen símptomes neurològics a l'escorça, l'aura.(2) Arran de la CSD, el CBF disminueix en un 20%-30% mentre la taxa metabòlica d'oxigen cerebral incrementa durant >2 h. (3) El CBF a les regions no envaïdes per la CSD es manté normal.(4) La regió amb CBF disminuït s'expandeix anteriorment amb la CSD. (5) A les extremitats apareixen símptomes somatosensorials quan la CSD envaeix l'escorça sensorial primària al girus postcentral.(6) La CSD en general s'atura en arribar al solc central, però en molts pacients ni tan sols hi arriba. La propagació ventral de la CSD activa les fibres nociceptives i apareix el mal de cap.(7) Atac a gran escala. Un cop la CSD s'atura, es detecta una reducció persistent del flux sanguini cortical, disfunció neurovascular i augment del metabolisme energètic. Després de l'atac, l'escorça cerebral torna al seu estat normal (Lauritzen et al. 2011).

Utilitzant tècniques de neuroimatge (BOLD fMRI) en un pacient capaç de provocar-se atacs de migranya amb aura visual, es va demostrar que un esdeveniment electrofisiològic com la CSD genera l'aura a l'escorça, amb una clara correlació temporal i espacial entre les fases de l'aura i els canvis de flux sanguini a l'escorça cerebral (Hadjikhani et al. 2001). Els canvis de potencial de la despolarització de la CSD durant l'aura també s'han pogut observar mitjançant magnetoencefalografia (Bowyer et al. 2001). Les aures amb símptomes motors i sensitius probablement provindrien d'esdeveniments similars a la CSD dins de l'escorça motora o sensitiva. Per als individus MO s'ha proposat que la CSD s'originaria probablement en àrees 'silencioses' de l'escorça cerebral (Pietrobon i Striessnig 2003; Granziera et al. 2006).

### 1.4.3 Depressió cortical propagant i activació del sistema trigèminovascular

Tot i que la CSD pot explicar la migranya amb aura, la seva relació amb la fase de la cefalea segueix essent controvertida (revisat a (van den Maagdenberg et al. 2007; de Vries, B. et al. 2009))

La hipòtesi més acceptada que la CSD activa el sistema trigèminovascular (**figura 5**) (Bolay et al. 2002), se sustenta de forma indirecta a partir d'experiments en animals. La inducció de CSD

augmenta l'expressió c-fos al nucli del trigemin caudalis a través de senyals de les meninges cranials, mentre que amb denervació del trigemin se suprimeix l'augment del flux sanguini produït per la CSD (Bolay et al. 2002). Recentment s'ha vist que la inducció de CSD té correlació amb l'activació de nociceptors a les meninges (Zhang, X. et al. 2010) i amb l'activació seqüencial de neurones perifèriques i centrals del sistema trigèmino-vascular (Zhang, X. et al. 2011). En la mateixa línia, un altre estudi en rates va demostrar que el tractament crònic, però no agut, amb medicaments profilàctics de la migranya (p.ex. antidepressius tricíclics, anticonvulsius i medicaments serotoninèrgics) suprimeixen, de forma temporal i dosi-dependent, la freqüència de la CSD entre un 40 i un 80% i també incrementen el llindar per a la inducció de la CSD (Ayata et al. 2006).

#### **1.4.4 Possibles desencadenants de la CSD i la migranya en el cervell humà**

S'ha proposat que l'excitabilitat cortical pot causar un augment de  $K^+$  i glutamat extracel·lular suficient com per iniciar la CSD. Factors genètics i ambientals podrien modular la susceptibilitat individual a l'excitabilitat tot disminuint el llindar per desencadenar la CSD (Dalkara et al. 2006; Moskowitz 2007). S'han identificat mutacions en tres gens responsables de formes mendelianes de migranya hemiplègica que codifiquen proteïnes implicades en el transport iònic (en detall a l'apartat 3.2 de la Introducció; (Pietrobon 2007). Els models animals *knock-in* d'una d'aquestes canalopaties presenten hiperexcitabilitat cortical i una disminució del llindar de la CSD (Pietrobon 2010).

La periodicitat dels episodis de migranya, així com l'existència de factors desencadenants, suggereixen que les formes més comunes de migranya també podrien ser canalopaties (Moskowitz et al. 2004). No obstant, els resultats negatius d'un estudi exhaustiu d'associació genètica entre la migranya comuna i 155 gens relacionats amb el transport iònic no donen suport a aquesta hipòtesi (Nyholt et al. 2008) (veure apartat 2.3 de la Introducció). Recentment s'ha identificat en una família una mutació en un canal responsable del fenotip MA (veure apartat 2.2.2 de la Introducció) (Lafreniere et al. 2010).

La variabilitat en la resposta als diferents fàrmacs profilàctics en pacients migranyosos apunten que hi hauria múltiples mecanismes moleculars que donen vulnerabilitat a la CSD (Pietrobon 2005).

Diversos estudis de comportament, electrofisiologia i d'imatge mostren que el sistema visual a nivell cortical és hiperexcitable. En canvi, altres estudis apunten cap a un cervell hipoexcitable. Actualment es parla d'una desregulació de la funció cortical que produiria variacions en qualsevol direcció que predisposarien a la migranya. De totes maneres, el fenomen de manca d'habitució també es troba en pacients amb malalties cròniques com el Parkinson, el dolor crònic o l'acufen. És per això que s'ha proposat que els canvis en l'excitabilitat neuronal poden ser deguts a la cronicitat d'aquestes malalties en comptes de ser factors de predisposició (revisat a (Aurora i Wilkinson 2007; Stankewitz i May 2009)).

Una altre hipòtesi postula que trombosis i microembolitzacions podrien produir un focus d'isquèmia hipòxica transitòria que induiria la CSD sense deixar danys en el teixit (Dalkara et al. 2010)

## 1.5 Migranya i ambient

Malauradament, la relació entre els factors ambientals i els atacs migranyosos ha estat difícil d'estudiar de manera sistemàtica i, en conseqüència, la relació causal de molts factors desencadenants no és clara (Dodick 2009). Migranyosos a tot el món informen constantment sobre desencadenants ambientals similars (canvi de la pressió atmosfèrica, la llum del sol, les llums espurnejants, la qualitat de l'aire i certes olors, entre d'altres). No obstant, pocs estudis confirmen de forma rigorosa les influències ambientals sobre la migranya. Les investigacions indiquen que els migranyosos tenen llindars més baixos al malestar induït per la llum, a la tolerància al soroll i a la sensibilitat olfactiva en comparació amb la població general (revisat a (Friedman i De ver Dye 2009)). Un estudi d'associació entre l'estil de vida i el mal de cap no va permetre identificar cap associació. Així, factors com el consum d'alcohol o tabac, l'activitat física o el sobrepès sembla que no estan relacionats amb la migranya (Winter et al. 2011).

## 1.6 Tractament

### 1.6.1 Tractament agut de la migranya

#### - Agonistes dels receptors de serotonina

Els triptans són els medicaments més eficaços en el tractament agut de la migranya. Mostren una elevada afinitat pels receptors 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>1F</sub>. El seu efecte depèn del receptor. Així, els receptors 5-HT<sub>1B</sub> produeixen un efecte vasoconstrictor (Villalon et al. 2002), mentre que els 5-HT<sub>1D</sub> i 5-HT<sub>1F</sub> no tenen efecte vasoconstrictor. Els receptors 5-HT estan localitzats a les terminals presinàptiques de les neurones sensibles del trigemin (Nelson, D. L. et al. 2010) tot hiperpolaritzant les terminals nervioses i inhibint els impulsos trigeminals. Malauradament, no tots els pacients responen al tractament amb triptans. Recentment s'han obtingut resultats positius en la fase de II d'un estudi amb lasmiditan, un agonista selectiu del receptor 5-HT<sub>1F</sub> (Ferrari et al. 2010).

#### - Antagonistes del CGRP

El CGRP és un neuropèptid vasoactiu que s'expressa a les neurones sensibles, dilata els vasos sanguinis intracranials i extracranials i modula la nocicepció vascular centralment. Té un paper important en la fisiopatologia de la migranya, pot induir atacs de migranya i el bloqueig dels seus receptors pot aturar la migranya. S'han fet estudis clínics amb els antagonistes olcegepant i talcegepant, però han fallat perquè el primer només es podia administrar de forma intravenosa i el segon tenia efectes secundaris sobre el fetge a llarg termini (revisat a (Villalon i Olesen 2009)). Actualment s'està provant un altre antagonista oral anomenat BI 44370 TA (Diener et al. 2011). Aquests fàrmacs s'anomenen col·loquialment gepants.

- Antagonistes del NO

El NO també indueix atacs de migranya en ser injectat. Està involucrat en el procés nociceptiu i en la modulació del flux sanguini cranial (revisat a (Olesen 2010)). Un inhibidor de la NO sintasa va reduir un 60% el dolor en un petit assaig (Lassen et al. 1998). Una altra molècula que combina agonisme al receptor 5-HT<sub>1B/D</sub> amb inhibició de la NO sintasa neuronal està essent avaluat en un assaig clínic en fase II (<http://clinicaltrials.gov>).

### **1.6.2 Tractament profilàctic de la migranya**

- Mesures higièniques

La millor profilaxi consisteix a intentar reduir les situacions desencadenants dels atacs, tot adoptant hàbits que poden ajudar en gran mesura a millorar la qualitat de vida dels migranyosos. Entre aquestes mesures hi ha la introducció de canvis en l'estil de vida (higiene de la son), la dieta (hi ha pacients amb desencadenants com l'alcohol, la ceba o la xocolata) i la disminució del nivell d'estrès.

- β-bloquejants i antiepilèptics

Els β-bloquejants i els antiepilèptics són els fàrmacs no específics més utilitzats per al tractament profilàctic de la malaltia. Els antiepilèptics més utilitzats són el topiramata, el valproat i la gabapentina. Els fàrmacs β-bloquejants, antagonistes de receptors β-adrenèrgics, actuarien a nivell de receptors neuronals post-sinàptics, però el mecanisme d'acció en la prevenció de la migranya no està clar (Rapoport 2008). Aquests medicaments tenen un guany terapèutic del 25% (50% dels pacients experimenten un 50% d'eficàcia) alhora que presenten efectes secundaris importants. És per això que cal desenvolupar medicaments més específics, més eficaços i amb menys efectes secundaris (Olesen 2011).

- Inhibidors de serotonina

Un altre medicament utilitzat sovint és el pizotifè, que pertany al grup dels antihistamínics ja que bloqueja els receptors H<sub>1</sub> de la histamina (substància alliberada durant el procés al·lèrgic). El pizotifè també és capaç de bloquejar els receptors de serotonina a nivell cerebral.

### **1.6.3 Noves dianes farmacològiques**

A partir dels avenços en la base biològica de la migranya s'han senyalat diferents components com a dianes terapèutiques per la seva acció sobre diferents molècules implicades en la fisiopatologia de la malaltia. Així, podem destacar els agonistes selectius del receptors 5HT<sub>1D</sub> i antagonistes del 5HT<sub>7</sub>, anticossos o altres components agonistes del CGRP, agonistes d'altres pèptids com el VIP, agonistes de l'acetilcolina, l'orexina, els cannabinoids, antagonistes del canal *TRPV1*, inhibidors de la depressió cortical propagant, antagonistes del glutamat i antagonistes d'altres canals. Algunes d'aquestes molècules necessiten validacions i altres es troben actualment en fases avançades d'assaigs clínics (revisat a (Olesen 2011)).

## 2. Bases genètiques de la migranya

Des de la pràctica clínica és perceptible que molts pacients tenen familiars de primer grau afectats de migranya, i a més nombrosos estudis descriuen històries familiars positives. Tant els estudis poblacionals com els estudis amb bessons suggereixen de forma sòlida que la MO i la MA són malalties multifactorials, causades per una combinació de factors ambientals i genètics (Goadsby 2005). De totes formes també hi ha subgrups de famílies que presenten patrons d'herència específics: mendeliana o mitocondrial (Russell et al. 1995).

### 2.1 La migranya és un trastorn genètic

Estudis clàssics de concordança de bessons indiquen que la migranya té un fort component hereditari, ja que s'ha detectat una major concordança en bessons monozigòtics (MZ) que en dizigòtics (DZ) tant en MO (MZ 43%, DZ 31%) (Gervil et al. 1999) com en MA (MZ 50%, DZ 21%) (Ulrich et al. 1999). Un gran estudi poblacional amb gairebé 30.000 parelles de bessons de sis poblacions diferents va estimar una heretabilitat per a la migranya d'entre el 34% i el 57% (Mulder et al. 2003). El fet que la concordança en parelles de bessons MZ no arribi al 100% s'explica per la implicació de factors ambientals a banda dels genètics. Comparant bessons que s'han criat junts o separats s'ha observat que els factors ambientals compartits semblen jugar un paper menor (Svensson et al. 2003).

Els estudis poblacionals de famílies mostren que el risc familiar per a la migranya és més elevat que a la població general. En un estudi realitzat a Dinamarca, els familiars de primer grau dels pacients MO tenien un increment de risc de 1,9 vegades de patir MO i 1,4 de patir MA en relació a la població general. Els familiars de primer grau dels pacients amb MA tenien un increment de 3,8 vegades de risc de MA i cap risc incrementat de MO. Els familiars en primer grau dels pacients que mai havien tingut migranya no tenien més risc de MA o de MO (Russell i Olesen 1995).

### 2.2 Formes monogèniques de la migranya

La metodologia més emprada fins ara per a la cerca de gens causals en malalties monogèniques és l'anàlisi de lligament genètic. Es determina la localització del *locus* del trastorn, és a dir, la regió cromosòmica que conté probablement el gen responsable de la malaltia, mitjançant la genotipació de marcadors genètics en famílies amb individus afectats. La tècnica es basa en el fet que *loci* físicament propers normalment no recombinen entre ells, de manera que determinats marcadors polimòrfics cosegregarien amb el gen que causa la patologia en la transmissió d'al·lels de pares a fills.

Un cop localitzat el gen responsable del fenotip, l'anàlisi mutacional de gens posicionalment candidats en els pacients de la o les famílies en què s'ha realitzat l'estudi de lligament permet la identificació de variants genètiques etiològicament relacionades amb la patologia.

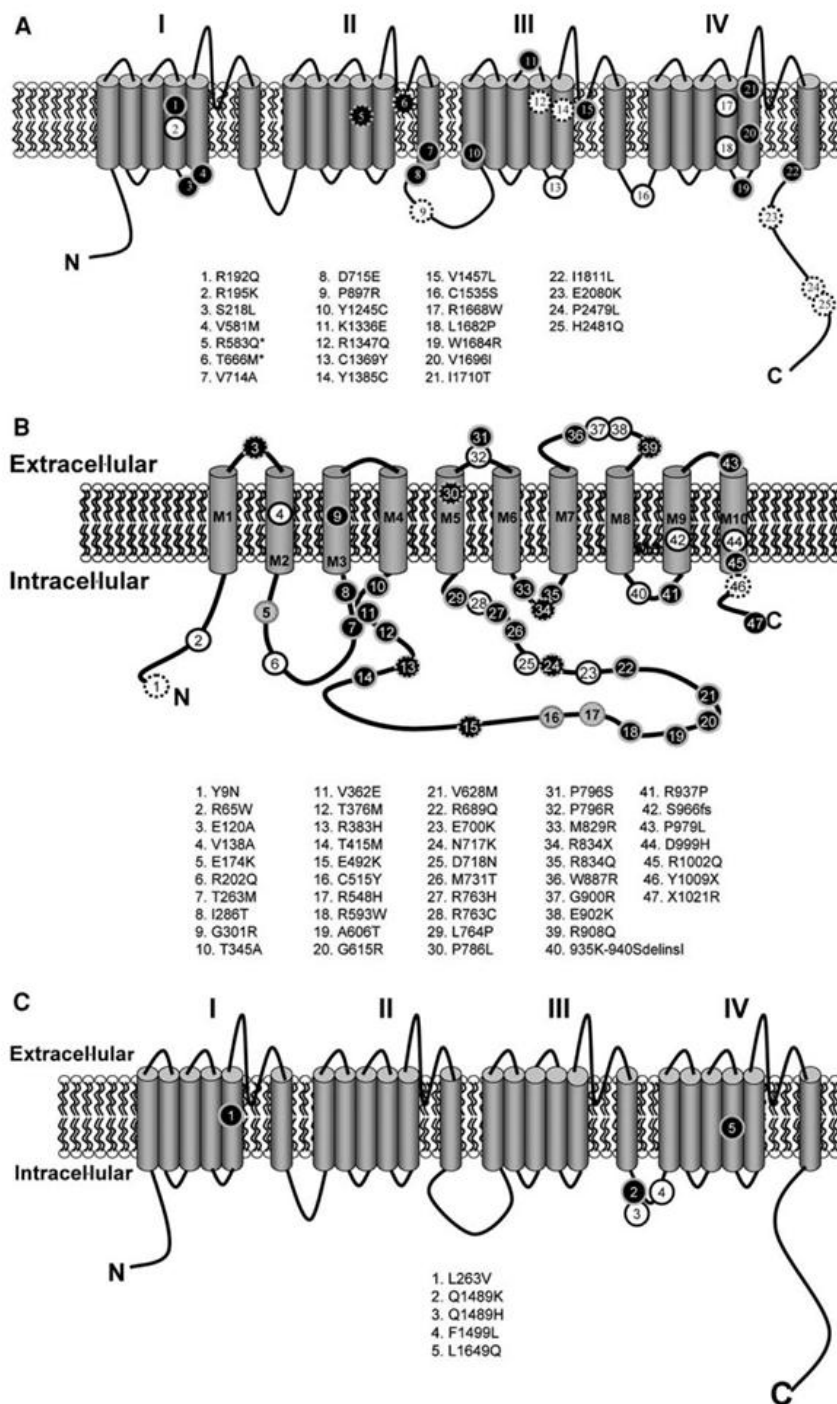


### 2.2.1 Loci i gens en la migranya hemiplègica

Els pacients HM sense història familiar reben un diagnòstic de SHM, mentre que aquells que tenen familiars de primer o segon grau afectats són FHM. En famílies FHM s'han identificat fins ara mutacions en tres gens (*CACNA1A*, *ATPA1A2*, *SCN1A*) (de Vries, B. et al. 2009). Aquests gens són també en part responsables del fenotip SHM (Terwindt et al. 2002; de Vries, B. et al. 2007; Thomsen et al. 2008; Riant et al. 2010; Stam et al. 2011).

El *locus* FHM1 correspon al gen *CACNA1A*, situat al cromosoma 19p13 (Ophoff et al. 1996) i que codifica la subunitat  $\alpha 1$  del canal de calci  $Ca_v2.1$  dependent de voltatge (tipus P/Q), àmpliament expressat al SNC. Les 25 mutacions identificades en FHM1 (**figura 7A**) són de canvi de sentit i estan associades a un guany de funció (apartat 3 de la Introducció). Clínicament, les mutacions al canal  $Ca_v2.1$  s'han associat a un espectre fenotípic molt ampli. A part de la migranya hemiplègica, és freqüent la presència d'atàxia cerebel·losa i d'epilèpsia, durant o independentment dels atacs de HM. Fins i tot, la mutació p.Ser218Leu, identificada en alguns pacients, pot ser letal després d'un traumatisme cranial lleu (Kors et al. 2001). Aquest gen presenta una gran heterogeneïtat al·lèlica amb implicacions clíniques rellevants, de manera que clàssicament mutacions de canvi de sentit causen guany de funció i van associades a migranya hemiplègica, mutacions que introdueixen codons de parada de la traducció o que trenquen la pauta de lectura causen pèrdua de funció i donen lloc a atàxia episòdica tipus 2 (EA2) i finalment, expansions del polimorfisme (CAG) $_n$  a 3'UTR, amb un efecte dominant negatiu, causen atàxia espinocerebel·losa de tipus 6 (SCA6) (Pietrobon 2010).

El segon *locus*, FHM2, conté el gen *ATPA1A2*, situat al cromosoma 1q23 (De Fusco et al. 2003). Codifica la subunitat  $\alpha 2$  de l'ATPasa de  $Na^+/K^+$  i s'expressa de forma ubíqua. Les 47 mutacions descrites fins ara, substitucions aminoacídiques, codons de parada prematurs, delecions o insercions, causen totes pèrdua de funció (apartat 3 de la Introducció) (**figura 7B**). La majoria d'aquests canvis s'han identificat en pacients FHM purs sense altres símptomes clínics associats, però també s'han descrit alguns casos amb problemes cerebel·losos, convulsions en la infància, epilèpsia i retard mental. Fins i tot algunes mutacions estan associades a altres fenotips com la migranya de tipus basilar i MA, encara que no se n'han fet estudis funcionals (de Vries, B. et al. 2009).



**Figura 7.** Representació esquemàtica de les proteïnes implicades en HM localitzades a la membrana plasmàtica: **A)** Ca<sub>v</sub>2.1 **B)** ATP1A2 i **C)** Na<sub>v</sub>1.1. Cercles negres: mutacions en què s'han realitzat estudis funcionals. Figura adaptada de (de Vries, B. et al. 2009).

El tercer *locus*, FHM3, correspon al gen *SCN1A*, situat a 2q24 (Dichgans et al. 2005) i que codifica la subunitat  $\alpha 1$  del canal de sodi  $\text{Na}_v1.1$  dependent de voltatge. Les més de 700 mutacions identificades en aquest gen estan associades normalment a epilèpsia infantil. S'han identificat només cinc mutacions en pacients amb HM (**figura 7C**), tres dels quals tenen a més atacs d'epilèpsia amb crisis tònico-clòniques independents dels atacs de HM. Altres símptomes clínics associats són ceguesa repetitiva (ERDB) i epilèpsia infantil (de Vries, B. et al. 2009).

Hi ha una heterogeneïtat genètica no explicada per cap dels gens FHM coneguts ja que només una petita proporció dels pacients HM són portadors de mutacions en aquests gens. Membres del nostre equip van identificar un altre *locus* al cromosoma 14q32 però encara no s'ha determinat quin és el gen causal subjacent (Cuenca-Leon et al. 2009).

En famílies amb acidosi renal tubular (pRTA), anomalies oculars i migranya hemiplègica, s'han identificat diverses mutacions en el gen *SLC4A4*, que codifica la proteïna NBCe1, un co-transportador de  $\text{Na}^+\text{-HCO}_3^-$  (Suzuki et al. 2010). L'estudi determina que mutacions en homozigosi provoquen FHM, MA o MO. Els autors postulen que les mutacions alteren l'excitabilitat neuronal a través de canvis en el pH i provoquen el mal de cap.

En un altre treball es va identificar una mutació al gen *EAAT1*, que codifica un transportador de glutamat, en un pacient amb atàxia episòdica, hemiplègia i convulsions. Els estudis funcionals mostren una pèrdua de funció que podria contribuir a la hiperexcitabilitat neuronal (Jen et al. 2005), el mateix mecanisme fisiopatològic que el proposat per a la MA. (veure **figura 8**, apartat 3 de la Introducció)

### 2.2.2 Loci i gens en altres formes de migranya

Tot i que s'han identificat 18 *loci* lligats a diferents fenotips migranyosos (**taula 3**; (Maher i Griffiths 2011), només s'ha pogut identificar un gen com a responsable de MA, *KCNK18* (Lafreniere et al. 2010).

El gen *KCNK18* codifica la proteïna TRESK, un canal de potassi de tipus K2P (dos dominis de tipus porus) que s'expressa àmpliament al sistema nerviós i concretament als ganglis sensorials i al gangli trigemin (Lafreniere et al. 2010), zones crucials en la fisiopatologia de la migranya. TRESK modula l'excitabilitat neuronal, sembla que està involucrat en vies de senyalització del dolor i és activat per l'anestèsic hal·lotà, compost que s'ha vist que inhibeix la CSD (Wood 2010). La mutació identificada causa una pèrdua de funció (apartat 3.1.4 Introducció).

## 2.3 Formes comunes de migranya: l'herència complexa

En contrast amb les variants rares de MA (HM), la majoria de casos de MA i MO segueixen un patró d'herència complexa. Els estudis d'associació de tipus cas-control s'utilitzen per avaluar la susceptibilitat genètica a les patologies complexes. Es basen en la comparació de les freqüències genotípiques o al·lèliques de polimorfismes entre una mostra de casos i una de

controls per tal d'identificar diferències estadísticament significatives que determinarien un increment del risc de patir la malaltia.

Les característiques clíniques de la HM i les formes comunes de migranya són idèntiques (deixant de banda l'hemiparèsia) i 2/3 del pacients HM pateixen també atacs de migranya comuna. Això fa pensar que comparteixen mecanismes fisiopatològics.

**Taula 3.** Cribratges de lligament a escala genòmica a variants de migranya. Adaptat de (Maher i Griffiths 2011).

Locus	Subtipus de migranya	Famílies (n)	Població	Mètode de genotipació	Referència
1q31	MA i MO	85	Australiana	Microsatèl.lits <i>loci</i> -específics	(Lea et al. 2002)
2p12	TCA-pulsativitat, MA i LCA-migranya	58	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Anttila et al. 2008)
3qter	LCA sever	21	Australiana	<i>Genome-wide scan</i>	(Lea et al. 2005)
4q21	MO	103	Islandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Bjornsson et al. 2003)
4q24	MA	50	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Wessman et al. 2002)
	TCA: edat d'inici, fotofòbia, fonofòbia, intensitat del dolor, unilateralitat i pulsativitat	50	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Anttila et al. 2006)
5q21	LCA	Bessons	Australiana	<i>Genome-wide scan</i>	(Nyholt et al. 2005)
6p12.2-p21.1	MO i MA	1	Sueca	<i>Genome-wide scan</i>	Carlsson et al. (2002)
	Fotofòbia i mal de cap que prohibeix l'activitat	Bessons	Australiana	<i>Genome-wide scan</i>	(Nyholt et al. 2005)
9q21-22	MA visual	36	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Tikka-Kleemola et al. 2010)
10q22-23	LCA	756	Bessons australians	<i>Genome-wide scan</i>	(Nyholt et al. 2005)
	LCA: migranya, MA, TCA: unilateralitat, pulsativitat, intensitat/dolor, nàusea/vòmits, fotofòbia i fonofòbia	210	Finlandesa i Australiana	<i>Genome-wide scan</i>	(Anttila et al. 2008)
	TCA-fonofòbia	50	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Anttila et al. 2006)
	LCA migranya, fonofòbia, fotofòbia	Bessons	Australiana	<i>Genome-wide scan</i>	(Nyholt et al. 2005)
11q24	MA	43	Canadensa	<i>Genome-wide scan</i>	(Cader et al. 2003)
14q21.2-q22.3	MO	1	Italiana	<i>Genome-wide scan</i>	(Soragna et al. 2003)
	TCA: intensitat del dolor	125	Australiana		(Anttila et al. 2008)
15q11-q13	MA	10		<i>Microsatèlits loci específics</i>	(Russo et al. 2005)
17p13.1	TCA-pulsativitat	50	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Anttila et al. 2006)
18p11	LCA sever	92	Australiana	<i>Genome-wide scan</i>	(Lea et al. 2005)
18q12	TCA: durada de l'atac	58	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Anttila et al. 2008)
	TCA: agreujat per activitat física, durada de l'atac	50	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Anttila et al. 2006)
	MO	103	Islandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Bjornsson et al. 2003)
19p13	MA	1	Australiana	Microsatèl.lits <i>loci</i> -específics	(Nyholt et al. 1998)
	MA	16	Nord-americana	Microsatèl.lits <i>loci</i> -específics	(Jones et al. 2001)
Xp22	TCA pulsativitat, MA i LCA sever	58	Finlandesa	<i>Genome-wide scan</i>	(Anttila et al. 2008)
	MA, MO i FHM	61	Descendents europeus	Microsatèl.lits <i>loci</i> -específics	(Wieser et al. 2010)
Xq24-28	MA i MO	2	Australiana	Microsatèl.lits <i>loci</i> -específics	(Nyholt et al. 2000), (Nyholt et al. 1998)

Diversos estudis han investigat el rol dels gens *CACNA1A* i *ATP1A2*, tradicionalment relacionats amb les formes monogèniques de migranya, en les formes comunes d'aquest trastorn, amb resultats contradictoris (de Vries, B. et al. 2009). A l'estudi d'associació més extens realitzat fins ara entre la migranya i gens candidats, amb 841 pacients i 884 controls, en què es cobrien genèticament 155 gens que codifiquen canals iònics (incloent els 3 gens FHM) i proteïnes relacionades, es van identificar associacions nominals amb 66 marcadors de tipus SNP a la població MA, però aquests resultats no es van poder replicar. Els resultats indiquen que variants genètiques comunes en aquests canals iònics no juguen un paper important en la migranya comuna, tot i que el disseny no permetia detectar variants rares o d'efecte menor (Nyholt et al. 2008).

### **2.3.1 Estudis d'associació: gens candidats**

S'han dut a terme molts estudis d'associació genètica amb la migranya, ja sigui a nivell de gens candidats o de sistemes gènics que estan implicats en la fisiopatologia de la malaltia. A grans trets es poden dividir els gens diana en quatre grans grups.

1) Gens amb funcions relacionades amb el sistema nerviós: Són bons candidats els neurotransmissors (dopaminèrgics, serotoninèrgics i glutamatèrgics), neuropèptids, receptors i els seus canals associats ja que una disfunció a nivell neuronal podria induir el sistema vascular i conseqüentment activar els senyals de dolor. 2) Gens relacionats amb el sistema hormonal: A causa del desequilibri existent en la distribució de sexes entre els pacients migranyosos, alguns estudis s'han centrat sobretot en els receptors d'estrogen (*ESR*) i de progesterona (*PRG*). 3) Gens relacionats amb el sistema vascular: Cal destacar el gen més clarament associat a la migranya, *MTHFR*. L'enzim codificat per aquest gen està implicat en el metabolisme de l'homocisteïna, un regulador vascular important. L'al·lel TT del polimorfisme C677T de *MTHFR* s'ha associat en diverses poblacions a una lleugera hiperhomocisteïnèmia (revisat a (Maher i Griffiths 2011)). 4) Per últim, els canals iònics comentats a l'apartat 2.3 de la Introducció.

En general els resultats dels estudis d'associació han estat difícils d'interpretar ja que molts s'han dut a terme amb eines diagnòstiques diferents, hi ha un biaix de publicacions cap a resultats positius, i els grups poblacionals petits tenen poc poder estadístic. Per uniformar resultats contradictoris s'han utilitzat metanàlisis i estudis de rèplica en diferents poblacions, que permeten disminuir el nombre de falsos positius. Els resultats dels estudis d'associació previs amb un mínim de 275 casos i 275 controls es detallen a la **taula 4**.

### **2.3.2 Estudis d'associació a escala genòmica (GWAS)**

En aquest cas es genotipen SNPs distribuïts de forma més o menys homogènia per tot el genoma tot buscant associació entre alguna de les variants i la malaltia. No hi ha biaix cap a gens candidats predeterminats. Es necessiten grans poblacions per assolir poder estadístic suficient i detectar efectes genètics menors.

El primer GWAS realitzat en migranya, de l'any 2010, es va centrar en una mostra clínica de 2.731 pacients migranyosos i 10.747 controls de 3 poblacions, i va permetre identificar una variant genètica al cromosoma 8q22.1 (rs1835740:  $p=5.38 \times 10^{-9}$ , OR=1.23, CI:1.150–1.324) que confereix susceptibilitat a la migranya. L'associació es va poder replicar en 3.202 casos i 40.062 controls de 4 poblacions i va mostrar un efecte més fort en els individus amb MA. Mitjançant una anàlisi quantitativa en fibroblasts es va observar que l'al·lel A d'aquest SNP es correlacionava amb nivells d'expressió més alts del gen *MTDH*, situat prop del SNP associat i que codifica la metadherina, un regulador del transportador de glutamat SLC1A2 (Anttila et al. 2010). El gen *SLC1A2* pertany a la mateixa família que *SCL1A3*, que codifica el polipèptid EAAT1, implicat en un fenotip neurològic també paroxístic (Jen et al. 2005) (veure apartat 2.2 de la Introducció).

Una metanàlisi de GWAS amb 6 poblacions europees va analitzar 10.980 individus (2.446 casos i 8.534 controls) i va detectar associació nominal ( $p < 10^{-5}$ ) del fenotip amb 31 SNPs. El valor P més significatiu s'obtingué per l'SNP rs9908234 ( $p=8 \times 10^{-8}$ ). Cap dels 19 SNPs que es van avaluar en cohorts de rèplica es van poder replicar. També es van explorar variacions en el gen *MTDH*, identificat en un GWAS previ (Anttila et al. 2010), on van trobar una associació modesta a la migranya ( $p=0.026$ , (corregit per Bonferroni) (Ligthart et al. 2011).

En un altre GWAS amb 1001 pacients es van estudiar individus amb trastorn bipolar i migranya comòrbida ( $n=699$ ) i sense mal de cap ( $n=56$ ). Es va identificar una regió de 317kb que conté dos SNPs associats amb la migranya, amb una OR de 4,98 (CI:2,6-9,48) (rs9566867) i valors de  $p$  de  $7.7 \times 10^{-8}$  (rs9566845) i  $8.2 \times 10^{-8}$  (rs9566867). El resultat es va replicar ( $p=0,013$  amb OR=2,42 [CI:1,18-4,97]) en una mostra independent noruega de pacients amb trastorn per dèficit d'atenció amb i sense migranya comòrbida ( $n=131$  i  $n=324$ ), respectivament. La regió conté el gen sense caracteritzar KIAA0564 (Oedegaard et al. 2010).

**Taula 4.** Estudis d'associació genètica entre la migranya i gens candidats que inclouen com a mínim 275 casos i 275 controls.

Gen	Variant genètica	Casos (n) (MA/MO)	Controls (n)	Al·lel associat amb el fenotip (valor de p)	Comentaris	Referències
<b>5', 10'-Methylenetetrahydrofolat reductasa (MTHFR)</b>						
MTHFR	c.677C>T (Ala222Val)	652 (465/187)	320	677T: NS ( $P = 0,017/-$ )	Combinació de casos i famílies, valor de P basats en la cohort inicial de 270 casos i 270 controls, estudi amb rèplica	(Lea et al. 2004)
MTHFR	c.677C>T (Ala222Val)	413 (187/226)	1212	677T: $-$ ( $P < 0,006/NS$ )		(Scher et al. 2006)
MTHFR	c.677C>T (Ala222Val)	898 (898/-)	900	677T: $-$ (NS/-)		(Kaunisto et al. 2006)
MTHFR	c.677C>T (Ala222Val)	2.961 (2.170/791)	3.844	677T: NS ( $P = 0,0005/NS$ )	Meta-anàlisi	(Rubino et al. 2009)
MTHFR	c.677C>T (Ala222Val)	4.577 (1.275/1.951)	20.424	677T: $P = 0,03$ ( $P = 0,02/NS$ )	Efecte protector de 677T	(Schurks et al. 2008)
<b>Sistema dopaminèrgic</b>						
COMT	c.472A>G (Val158Met)	305	1468	NS		(Hagen et al. 2006)
DBH	-1021C>T +1603C>T	830 (588/242)	500	-1021T: $P = 0,004$ ( $P = 0,011/NS$ ) NS (NS/NS)	Valors de P basats en la cohort inicial de 275 casos i 275 controls, rèplica, efecte protector de l'al·lel T	(Fernandez et al. 2009)
DBH	c.1434 + 1579A>G (rs2097629)	650 (650/-)	650	c.1434 + 1579G: $-$ ( $P = 0,01/-$ )	Disseny en dos passos (tagging d'haplotips), 35 SNPs del sistema dopaminèrgic, Valors de P corregits basats en la cohort total	(Todd et al. 2009)
DRD2	c.-32+16024T>G (rs7131056)			c.-32 + 16024T $-$ ( $P = 0,006/-$ )		
SLC6A3	c.1840-204G>A (rs40184)			c.1840-204A: $-$ ( $P = 0,03/-$ )		
SLC6A3	VNTR intró 8	550 (401/149)	550	NS (NS/NS)	SLC6A3, també conegut com a DAT1	(McCallum et al. 2007)
ADRA2B	c.-4825indel12	368	517	NS (NS/NS)		(Ni et al. 2010)
8 gens	Múltiples variants	522	561	NS (NS/NS)	8 gens del sistema dopaminèrgic* (estudi amb rèplica. P de la població conjunta)	(Corominas et al. 2009)
<b>Sistema serotoninèrgic</b>						
HTR2C	c.69G>C (Cys23Ser)	275	275	NS		(Johnson et al. 2003)
HTR2C	c.2831T>G			NS		
HTR2C	c.69G>C (Cys23Ser)	335 (184/151)	335	NS (NS/NS)		(Oterino et al. 2007)
HTR2B	c.69G>C (Cys23Ser)	561 (561/i)	1.235	NS (NS/-)	Meta-anàlisi	(Oterino et al. 2007)
MAOA*	rs16827801-rs10194776	528 (308/220)	528	T/G: NS (NS/P = 0,0017)	Disseny amb 122 SNPs de 19 gens relacionats amb el sistema serotoninèrgic (Valor de P del haplotips corregits)	(Corominas et al. 2010)
DDC*	rs3027400-rs2072743			G/C: NS (NS/P = 0,0061)		
	rs2329340-rs11974297-rs2044859-rs11761683			A/C/G: NS ( $P = 0,0019/NS$ )		
SLC6A4	LPR	1502	1958	NS (NS/NS)	Meta-anàlisi de 12 estudis	(Liu et al. 2011)
SLC6A4	rs2020942	790	794	NS (NS/NS)	Meta-anàlisi de 2 estudis	

SLC6A4	VNTR STin2	495	729	STin2.12: $P = 0,006$ (0,04/0,04)	Meta-anàlisi de 9 estudis	(Schurks et al. 2010)
SLC6A4	VNTR STin2	849 (257/289)	557	NS (NS/NS)	Meta-anàlisi de 5 estudis	(Schurks et al. 2010)
TPH2	Múltiples variants	503	512	NS (NS/NS)	8 SNPs que cobreixen el gen. No passen correccions per tests múltiples	(Jung et al. 2010)
<b>Receptors GABA (àcid gamma-aminobutíric) tipus A</b>						
GABRA5	Múltiples variants	898 (898/-)	900	- (NS/-)	34 SNPs de la regió 15q11-q13 (tagging d'haplòtíps)	(Oswell et al. 2008)
GABRB3	Múltiples variants			- (NS/-)		
GABRG3	Múltiples variants			- (NS/-)		
GABRA5	Múltiples variants	649 (649/-)	652	- (NS/-)	56 SNPs de la regió 15q11-q13 (tagging d'haplòtíps), valors de P per duess cohorts	(Netzer et al. 2008)
GABRB3	Múltiples variants			- (NS/-)		
GABRG3	Múltiples variants			- (NS/-)		
GABRE	Múltiples variants	384 (254/130)	275	NS (NS/NS)	3 SNPs del gen GABRE	(Fernandez et al. 2008)
GABRQ	c.1432T>A (Ile478Phe)			NS (NS/NS)		
<b>Sistema hormonal</b>						
ESR1	c.594G>A	484 (360/124)	484	594A: $P = 0,003$ ( $P = 0,01/P = 0,02$ )	Dues cohorts combinades, valors de P basats en la cohort inicial (224 casos i 224 controls)	(Colson et al. 2004)
ESR1	c.2014G>A		900	- (NS/-)		(Kaunisto et al. 2006)
ESR1	c.594 G>A	898 (898/-)	900	(OR combinat 1,37; 95% CI 1.02-1.83)	Meta-anàlisi	(Schurks et al. 2010)
ESR1	c.325 C>G			(OR combinat 1,16; 95% CI 1.03-1.32)		
ESR1	PvuII C>T			NS (NS/NS)		
ESR1	c.325G>C	356 (198/158)	374	325C: $P = 0,03$ ( $P = 0,045/NS$ )		(Oterino et al. 2008)
ESR2	c.2100A>G			2100A: NS ( $P = 0,03/NS$ )		
F5HR	c.2039G>A (Ser680Asn)			2039G: NS ( $p = 0,01/NS$ )		
CYP19A1	c.1672C>T			NS (NS/NS)		
NR1P1	c.225G>A (Gly75Gly)			NS (NS/NS)		
AR	Repetició CAG exó 1	509 (371/138)	454	NS (NS/NS)	Valors de P basats en la cohort inicial de 275 casos i 275 controls; PROGINS replicat	(Colson et al. 2005)
PGR	PROGINS ins (intró 7)			PROGINS ins: $P = 0,02$ (NS/ $P = 0,008$ )	Meta-anàlisi	(Schurks et al. 2010)
PGR	PROGINS			NS (NS/NS)		
<b>Gens relacionats amb la inflamació</b>						
TNFA	c.308G>A	299 (38/261)	306	308G: $P < 0,001$ (NS/ $P < 0,001$ )		(Rainero et al. 2004)
TNFA	Múltiples variants	439 (65/327)	382	NS	15 SNPs	(Lee et al. 2007)
LTA	-294T>C (rs2844482)			294C: $P = 0,0002$		
	Promotor			( $P = 0,006/P = 0,0008$ )		
TNFA	c.308G>A	299 (-/299)	278	- (-/NS)		(Asuni et al. 2009)



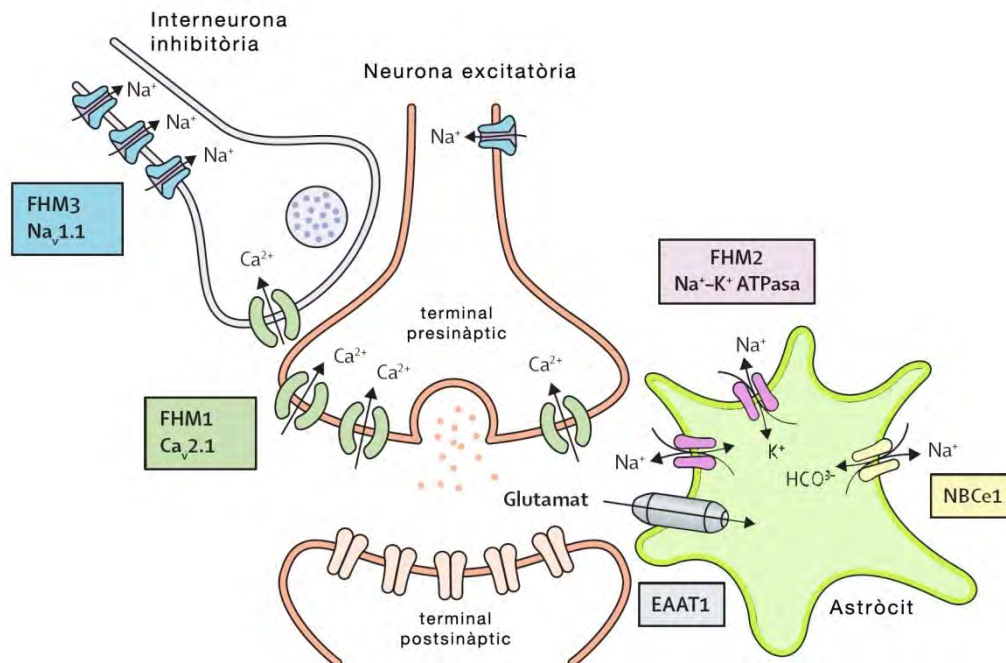
<i>TNFB</i>	c.252G>A				252A: - ( $P = 0,018$ )	
$\alpha$ -CGRP	c.6037indel16 (rs35815751)	320	320		NS (NS/NS)	
<b>Receptor de la insulina (<i>INSR</i>)</b>						
<i>INSR</i>	c.2946-713C>A SNP84: rs2860172	827 (377/450)	765		c.2946-713A: NS ( $P = 0,002$ /NS)	48 SNPs de la regió 19p13, valors de P basats en 331 casos i 466 controls (McCarthy et al. 2001)
	c.2842 + 1451T>A + 1451T>A SNP90: rs2860174				c.2842 + 1451A: NS ( $P = 0,007$ /NS)	
	c.3255C>T SNP274: rs1799817/His1085His				c.3255T: NS ( $P = 0,008$ /NS)	
<i>INSR</i>	c.2842 + 1451T>A (rs2860174)	1.278 (1.278/-)	1337		c.2842 + 1451T: - ( $P = 0,005$ /-)	Disseny en dos passos ( <i>tagging</i> d'haplòtíps), 35 SNPs de la regió 19p13, valor de P de la cohort total (Netzer et al. 2008)
<b>Vasoconstrictors</b>						
<i>ACE</i>	Ins/del (rs1799752)	342 (187/155)	403		NS (NS/NS)	(Tronvik et al. 2008)
<i>ACE</i>	Ins/del (rs1799752)	3.226 (1.275/1.951)	20.423		NS (NS/NS)	(Schurks et al. 2009)
<i>AGTR1</i>	c.1166A>C	3.226 (1.275/1.951)	20.423		NS (NS/NS)	(Schurks et al. 2009)
<i>AGT</i>	c.803T>C (Met235Thr)				NS (NS/NS)	
<i>EDN1</i>	Múltiples variants	850 MA	890		NS (NS/NS)	Estudi de 32 SNPs dels gens de l'endotelina, rèplica (Tikka-Kleemola et al. 2009)
<i>EDNRA</i>	Múltiples variants				NS (NS/NS)	
<i>EDNRB</i>	Múltiples variants				NS (NS/NS)	
<b>Altres gens</b>						
<i>MOS2</i>	(CCTT) <sup>n</sup> al promotor	504 (33/471)	512		11 repeticions: $P = 0,0014$ (-/-)	(Jia et al. 2011)
<i>MOS3</i>	c.-51-898G>A (rs1800779)	337 (188/149)	341		NS (NS/NS)	NOS3: sintasa endotelial del NO (Toriello et al. 2008)
	c.894T>G (rs1799983)				NS (NS/NS)	
Canals iònics	Múltiples variants	3.676	3.624		NS (NS/NS)	>5.000 SNPs ( <i>tagging</i> d'haplòtíps) de 155 gens, rèplica (Nyholt et al. 2008)

\* Els gens *MAOA* i *DDC* estan implicats també en el metabolisme de la dopamina

NS: No significatiu; MA: migranya amb aura; MO: migranya sense aura

### 3. Estudis funcionals en la migranya

Els estudis funcionals de mutacions relacionades amb fenotips migranyosos han ajudat a millorar la comprensió de la fisiopatologia de la migranya (veure apartat 1.4 Introducció). La teoria més acceptada és que aquestes mutacions condueixen a una disfunció en la neurotransmissió del glutamat, tot donant lloc a un cervell hiperexcitable. A la **figura 8** s'explica com els diferents gens relacionats la migranya monogènica o la migranya comuna tenen influència directa o indirecta sobre la neurotransmissió glutamatèrgica.



**Figura 8.** Sinapsi glutamatèrgica. La neurona presinàptica rep informació d'una interneurona inhibidora GABAèrgica. Es mostra un astròcit al costat de l'espai sinàptic. Els gens amb mutacions identificades en FHM que condueixen a la interrupció de l'equilibri de la neurotransmissió cortical es mostren dins de quadres. Els canals Ca<sub>v</sub>2.1 estan situats a la terminal presinàptica en neurones excitadores i inhibidores. En resposta a un potencial d'acció, aquests canals permeten l'entrada de Ca<sup>2+</sup> dins la cèl·lula, tot desencadenant l'alliberament de glutamat a l'espai sinàptic. Les mutacions identificades en FHM al gen *CACNA1A* augmenten la probabilitat que els canals Ca<sub>v</sub>2.1 alliberin glutamat excitatori, mantenint-se inalterats els circuits GABAèrgics inhibitoris. Les bombes Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa s'expressen en cèl·lules glials (astròcits). La funció d'aquestes bombes és eliminar el io K<sup>+</sup> de l'espai sinàptic per limitar l'excitabilitat neuronal, mantenen un gradient de Na<sup>+</sup> a través de la membrana cel·lular, que impulsa la captació de glutamat de l'espai per part de transportadors com EAAT1. Les mutacions al gen *ATP1A2/FHM2* afecten la funció de la bomba Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPasa reduint molt probablement la recaptació de K<sup>+</sup> i glutamat per part de les cèl·lules glials, tot provocant conseqüentment una recuperació lenta de l'excitació neuronal. Els canals Na<sub>v</sub>1.1 s'expressen principalment a les interneurons inhibidores, on inicien i propaguen els potencials d'acció. Les mutacions a *SCN1A/FHM3* condueixen a alteracions en els canals Na<sub>v</sub>1.1 i es creu que afecten l'activitat inhibidora de les interneurons GABAèrgiques. Per tant, la disfunció dels tres transportadors iònics dona lloc a concentracions elevades de glutamat i K<sup>+</sup> a l'esquerra sinàptica, el que faria el cervell més susceptible a la CSD. Estudis recents suggereixen que les mutacions en dos gens nous també estan associades amb FHM: 1) *SLC4A4*, que codifica el cotransportador de Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> - NBCe1, i *SLC1A3*, que codifica el transportador de glutamat EAAT1. Els estudis funcionals indiquen que mutacions en aquests gens podrien afectar l'excitabilitat neuronal mitjançant la desregulació del pH sinàptic (NBCe1) i afectar la recuperació de glutamat per part de les cèl·lules glials mitjançant EAAT1 (o SLC1A3). Adaptat de (Russell i Ducros 2011).

## 1. Models cel·lulars

### 3.1.1 Estudis electrofisiològics de mutacions en el gen *CACNA1A*

L'electrofisiologia ha estat un tècnica àmpliament emprada en els estudis funcionals de les mutacions al gen *CACNA1A*, especialment a nivell de *patch clamp*. Hi ha múltiples aspectes dels canals  $Ca_v2.1$  que són importants per a la seva funció: l'expressió, la localització a la membrana cel·lular i diversos paràmetres electrofisiològics del propi canal com ara la densitat de corrent, la cinètica i voltatge-dependència de l'activació dels canals, la cinètica de desactivació o tancament dels canals, la cinètica i voltatge-dependència de la inactivació dels canals i finalment la cinètica de la recuperació de l'activitat del canal després de la seva inactivació. Per als estudis electrofisiològics de les mutacions s'utilitzen sistemes d'expressió heteròloga, tot transfectant cèl·lules sense activitat  $Ca_v2.1$  endògena amb canals  $Ca_v2.1$  recombinants (la subunitats  $\alpha1A$ , una subunitat  $\beta$  ( $\beta3$  o  $\beta2A$ ) i la subunitat  $\alpha2\delta$ ). Per tal d'avaluar les conseqüències de les mutacions es poden mesurar els diversos paràmetres biofísics dels canals de calci, i avaluar les conseqüències de les mutacions a nivell cel·lular (és a dir, l'efecte combinat de tots els canals  $Ca_v2.1$  a la membrana plasmàtica) o en un únic canal (la conductància unitària del canal i la seva probabilitat d'obertura a diferents voltatges). Fins ara s'han estudiat les conseqüències funcionals de 14 mutacions FHM1 en sistemes heteròlegs que expressen canals  $Ca_v2.1$  recombinants (**figura 7a** mutacions marcades en negreta). S'ha observat que aquestes mutacions afecten de forma complexa la funció dels canals individuals (especialment llur activació), i també la densitat de canals funcionals a la superfície cel·lular. Tot i que no s'ha trobat un mecanisme global comú per a totes les mutacions FHM1, en totes elles s'ha observat un guany de funció del canal que condueix a una entrada de calci dins de la cèl·lula a voltatges més baixos (Pietrobon 2010). Algunes mutacions disminueixen la inhibició mediada per proteïna G (Melliti et al. 2003; Weiss et al. 2008; Serra et al. 2009). Alguns resultats contradictoris es podrien explicar pel tipus de subunitat  $\beta$  del canal que s'ha co-transfectat amb la subunitat  $\alpha1A$  (Mullner et al. 2004), o per la variant de *splicing* utilitzada (Adams et al. 2009). A la **figura 8** s'il·lustra com afecta aquest guany de funció la neurotransmissió del glutamat.

### 3.1.2 Estudis funcionals de mutacions en el gen *ATP1A2* amb ouabaïna

S'han estudiat a nivell funcional trenta-dues de les mutacions identificades al gen *ATP1A2* (**figura 7b** mutacions marcades en negreta). Els estudis de la subunitat  $\alpha2$  de l'ATPasa de  $Na^+/K^+$  es duen a terme tot transfectant cèl·lules amb una forma mutant de la bomba resistent a la toxina ouabaïna, que inhibeix la bomba de sodi/potassi. A aquesta forma mutant se li s'introdueixen els canvis a estudiar i es cultiven les cèl·lules en presència d'ouabaïna. Si la bomba perd la funció a causa de la mutació, les cèl·lules moren (Price et al. 1990). A la **figura 8** s'il·lustra com afecta aquesta pèrdua de funció a la neurotransmissió glutamatèrgica.

### 3.1.3 Estudis funcionals de mutacions en el gen *SCN1A*

Tres de les cinc mutacions descrites al gen *SCN1A* s'han estudiat a nivell electrofisiològic en el canal  $Na_v1.1$  (**figura 7c**, mutacions marcades en negreta), i s'ha observat una pèrdua de funció en dues de les mutacions associades a fenotips FHM. La tercera mutació, identificada en un pacient que presentava també epilèpsia tònico-clònica produïa guany de funció (Kahlig et al. 2008). Amb aquests resultats complexos es va hipotetitzar que les mutacions del canal podien tenir un efecte de guany de funció en neurones excitadores i un efecte de pèrdua de funció en neurones inhibidores (de Vries, B. et al. 2009). Aquesta darrera situació seria similar a la que s'observa en el cas de l'haploinsuficiència de  $Na_v1.1$ , que provoca epilèpsia per la reducció de corrents de sodi a les neurones inhibidores GABAèrgiques (Catterall et al. 2008). En cultiu neuronal s'ha vist que les mutacions provoquen hiperexcitabilitat autolimitada (Cestele et al. 2008) (**figura 8**).

### 3.1.4 Estudis funcionals de mutacions en el gen *TRESK*

La mutació p.Phe139TrpfsX24 del gen *KCNK18* identificada en una família amb MA s'ha caracteritzat funcionalment a través d'estudis electrofisiològics, tot observant-se una pèrdua de funció total del canal. A més, la subunitat mutant suprimeix la funció del canal WT, la qual cosa explica l'herència dominant o l'efecte tòxic de la mutació (Lafreniere et al. 2010).

## 3.2 Model animals

Es pot provocar una CSD a animals mitjançant l'aplicació d'estímuls químics o físics. Per això s'han utilitzat diferents models animals, com la rata o el gat, per a l'estudi de la malaltia.

També s'han identificat soques de ratolins amb mutacions esporàdiques de canvi d'aminoàcid al gen ortòleg del *CACNA1A* humà, que donen lloc a un fenotip d'afectació cerebel·losa (atàxia) i produeixen una pèrdua de funció del canal  $Ca_v2.1$ : disminució de les corrents de tipus P/Q en cèl·lules de Purkinje (Pietrobon 2007). Tot i que els ratolins mutants de pèrdua de la funció del canal  $Ca_v2.1$  es consideren sovint com a models de ratolí EA2, hi ha diferències importants entre el ratolí i els fenotips EA2 humans. En primer lloc, el fenotip EA2 en humans presenta una herència dominant, mentre que els ratolins heterozigots sovint tenen símptomes molt lleus comparats amb els homozigots. En segon lloc, els pacients EA2 pateixen episodis d'atàxia intermitent que pot o no anar acompanyada d'atàxia progressiva i, en canvi, els ratolins mostren símptomes d'atàxia progressiva contínua (tot i que el diagnòstic en ratolins és difícil). I en tercer lloc, la majoria de les mutacions EA2 en pacients provoquen una pèrdua total de la funció dels canals  $Ca_v2.1$ , mentre que les mutacions murines espontànies porten a una reducció funcional del 50-70% (revisat a (Pietrobon 2010).

### 3.2.1 Ratolins *knock-out* o *genoanul·lats*

El ratolí *knock-out* de l'ortòleg del gen *CACNA1A* en homozigosi presenta símptomes d'atàxia cerebel·losa greu, distonia i degeneració cerebel·losa progressiva. En comparació amb els

homozigots, els heterozigots +/- tenen una reducció en la resposta inflamatòria i el dolor neuropàtic (Pietrobon 2007), i són més aviat models per EA2 que per FHM.

En el cas del gen *ATP1A2* també s'ha generat un ratolí *knock-out*. Els ratolins homozigots per la mutació moren poc després de néixer, tot mostrant apoptosi neuronal selectiva a l'amígdala i l'escorça piriforme (Ikeda et al. 2003). L'epilèpsia és també una característica del fenotip clínic en éssers humans portadors de mutacions al gen *ATP1A2* i està relacionada amb una hiperexcitabilitat del cervell.

També s'ha generat un ratolí *knock-out* del tercer gen implicat en la HM, *SCN1A* (Ogiwara et al. 2007). El ratolí homozigot desenvolupa atàxia i mor poques setmanes després del naixement. Els animals heterozigots mostren convulsions espontànies i també moren postnatalment.

Els estudis amb ratolins *knock-out* pel gen *TRESK*, gen relacionat amb MA en humans, mostren com la disminució de l'activitat del canal provoca un augment de l'excitabilitat neuronal (Dobler et al. 2007).

### 3.2.2 Ratolins *knock-in* o genomodificats

Neurones de ratolins  $Ca_v2.1^{-/-}$  que expressen subunitats  $\alpha 1$  humanes del canal  $Ca_v2.1$  amb les mutacions FHM1 p.Arg192Gln o p.Ser218Leu en homozigosi presenten un augment de l'alliberament de glutamat, essent aquest efecte major en el cas de la mutació p.Ser218Leu. Estudis en microcultius neuronals de la neurotransmissió excitatòria cortical mostren un augment de les sinapsis (Pietrobon 2010), la qual cosa ajuda a induir, mantenir i propagar la CSD; això està en concordança amb la disminució del llindar de CSD que s'observa en els ratolins *knock-in* (de Vries, B. et al. 2009).

El model *knock-in* murí del gen *SCN1A* és portador d'una mutació d'epilèpsia mioclònica i presenta convulsions epilèptiques ja durant el primer mes de naixement (Yu et al. 2006).

Serà interessant veure l'efecte de models *knock-in* dels gens *FHM2/3* i *TRESK*, que sens dubte seran útils per estudiar més a fons les conseqüències funcionals de les mutacions identificades en pacients HM i proporcionaran una visió més clara de la patogènesi de la malaltia.

### 3.2.3 *Caenorhabditis elegans*

Un altre model utilitzat ha estat l'invertebrat *C.elegans*. Animals amb mutacions al gen *Unc-2*, l'ortòleg del gen *CACNA1A*, són letàrgics i descoordinats. S'ha estudiat la possible interacció entre la senyalització serotoninèrgica i *Unc-2*, tot demostrant de forma directa que aquest gen regula la síntesi de serotonina (Estevez 2006).

## 3.3 Estudis en humans

Un mètode que permet estudiar la fisiopatologia de la migranya és la inducció d'atacs en humans. Diverses molècules poden induir atacs de migranya en pacients migranyosos, indistingibles dels seus atacs espontanis, com p.ex. la nitroglicerina, el CGRP o la prostaglandina  $I_2$  ( $PGI_2$ ) (figura 9) (Schyetz et al. 2010). Mentre s'indueix l'atac es poden

enregistrar diferents variables hemodinàmiques, la freqüència cardíaca i a més a més les tècniques de neuroimatge permeten entendre millor els esdeveniments que tenen lloc durant l'atac migranyós (**figura 9**). Els models humans de migranya ofereixen la possibilitat d'estudiar els diferents subtipus de migranya i explorar els mecanismes d'acció dels medicaments antimigranyosos (Schytz et al. 2010). Els estudis de neuroimatge i magnetoencefalografia han estat útils per entendre millor la relació entre la CSD i l'aura (veure apartat 1.4.2 de la Introducció).



**Figura 9.** Els pacients amb migranya o voluntaris sans són assignats a l'atzar per rebre una infusió intravenosa (20 min) de la substància problema o un placebo (solució salina) en un disseny creuat, doble cec. La intensitat de la cefalea es registra en una escala de valoració verbal de 0 a 10 (0- sense mal de cap, 1- mal de cap molt suau, 2- mal de cap (incloent una sensació de pressió o pulsativa), 5- mal de cap moderat, 10- el pitjor mal de cap imaginable). A continuació es registren en intervals diferents variables hemodinàmiques (velocitat mitjana del flux sanguini a l'artèria cerebral, diàmetre de l'artèria temporal superficial) mentre que la freqüència cardíaca i la pressió arterial es mesuren de forma contínua. Els individus omplenen un diari de mal de caps cada hora durant 10h. Adaptada de (Olesen et al. 2009).

## 4. Canals receptors de potencial transitori (TRPs)

Els TRP formen una superfamília de canals permeables al calci amb 6 dominis transmembrana. S'agrupen en 6 subfamílies (TRPC, TRPV, TRPM, TRPA, TRPML i TRPP (amb els subgrups PKD-like)). Malgrat la seva similitud en l'estructura, hi ha una gran variació quant als seus mecanismes d'activació i a la selectivitat iònica.

Tenen propietats d'activació polimodal, tot integrant múltiples estímuls concomitants i amplificant el senyal cap a vies de senyalització cel·lular situades *downstream*. Mitjançant el flux

de ions  $\text{Ca}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  a través d'aquests canals es crea un gradient electroquímic que despolaritza la membrana plasmàtica (Ramsey et al. 2006).

Dins del reticle endoplasmàtic hi ha reserves de calci intracel·lular que poden ser mobilitzades a través del procés SOCE (*Store-Operated  $\text{Ca}^{2+}$  Entry*), pel qual flueix el  $\text{Ca}^{2+}$  a través de la membrana plasmàtica en resposta a l'esgotament del calci intracel·lular. S'han relacionat els canals TRP amb aquest procés però no està del tot clar si realment algun TRP està implicat en el SOCE (Nelson, P. L. et al. 2011).

## 4.1 Classificació dels canals en mamífers

Els canals TRP en mamífers es divideixen en 6 subfamílies a partir de similituds en la seqüència d'aminoàcids: TRPC (canònic), TRPM (melastanina), TRPV (vainil·loid), TRPA (anquirina), TRPML (mucolipina) i TRPP (policistina).

## 4.2 Modes d'activació

Molts canals de la família poden respondre a múltiples estímuls, i per això hom creu que actuen com a integradors de senyals. Els estímuls es poden dividir en tres categories (revisat a (Ramsey et al. 2006)):

### Activació mediada per receptors

Els receptors units a proteïnes G (GPCR) i els receptors tirosina cinasa que activen la fosfolipasa C poden modular l'activitat dels canals TRPs de diverses maneres, com ara a través de l'inositol trifosfat ( $\text{IP}_3$ ) i la subsegüent alliberació dels dipòsits intracel·lulars, o a través de la producció de diacilglicerol.

### Activació mediada per lligand

Els lligands que activen els TRP es poden classificar en:

- a) Petites molècules orgàniques exògenes que poden provenir de components naturals (p.ex. la capsaïcina, responsable de gust picant de la caiena, el mentol o l'alicina).
- b) Lípids endògens o productes del metabolisme lipídic (p.ex. diacilglicèrids o fosfoinosítids)
- c) Nucleòtids purínics i els seus metabòlits (p.ex. ADP-ribose o  $\beta\text{-NAD}^+$ )
- d) Ions inorgànics (p.ex.  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ )

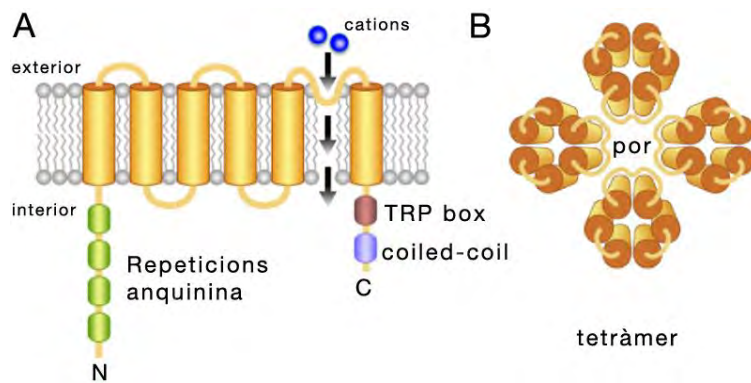
### Activació directa

Estímuls mecànics, canvis de temperatura, la unió a  $\text{IP}_3$  i/o la fosforilació del canal poden activar-los directament.

## 4.3 Estructura dels canals

La majoria de canals TRP estan compostos de sis dominis transmembrana amb la regió del porus situada entre els segments 5 i 6 i els dominis C- i N- terminal a l'espai intracel·lular (**figura 9A**). A l'extrem C-terminal de la proteïna hi ha el domini conservat TRP (*TRP box*) i

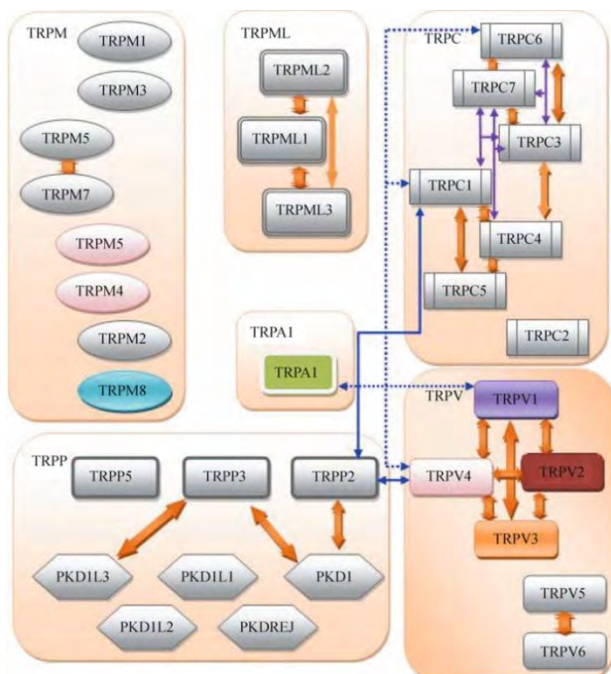
algunes famílies TRP tenen un nombre variable de repeticions d'anquirina a l'extrem N-terminal, que podria participar en interaccions proteïna-proteïna i serveixen com a lloc d'unió a lligands múltiples. Altres dominis reguladors estan relativament conservats a la majoria dels TRPs. Per exemple, a l'extrem N-terminal hi ha un domini *coiled-coil*, que podria estar implicat en la formació de tetràmers. Les regions C- terminals són més variables entre les famílies TRP. Així, les subfamílies TRPC i TRPV tenen un domini d'unió a proteïnes PDZ. En canvi, els membres de les famílies TRPC, TRPV i TRPM tenen llocs d'unió a calmodulina, i TRPML i TRPP contenen dominis d'unió al  $Ca^{2+}$  de tipus *EF-hand*. Finalment, els canals TRPM2/6/7 fins i tot contenen dominis enzimàtics (revisat a (Cheng et al. 2010; Nelson, P. L. et al. 2011)).



**Figura 9.** Estructura bàsica dels canals TRP. A) Esquema del canal ancorat a la membrana plasmàtica. B) Esquema del tetràmer funcional. Adaptat de (Nelson, P. L. et al. 2011).

#### 4.3.1 Tetramerització en homòmers o heteròmers

Els canals, per ser funcionals, formen complexos proteics, tetràmers homomèrics i heteromèrics (**figura 9B**). Aquesta qualitat dels canals TRPs els confereix la capacitat d'adquirir funcions que no tindrien als teixits on es coexpressen canals que poden formar complexos (revisat a (Cheng et al. 2010)). La majoria d'aquests heteròmers es formen entre membres de la mateixa subfamília de TRPs (p.ex. TRPV1 amb TRPV2/3/4) però també poden formar-se complexos entre membres de famílies diferents (p.ex. TRPC1-TRPP2) i fins i tot s'han descrit interaccions entre tres subunitats diferents (**figura 10**).



**Figura 10.** Associacions entre subunitats dels canals TRP de mamífers. Fletxes de color taronja: Indiquen unió entre dues subunitats. Fletxes porpra: Indiquen interacció entre tres subunitats diferents de la mateixa subfamília. Fletxes contínues blaves: Indiquen interacció entre subfamílies diferents. Fletxes discontinües blaves: Indiquen interacció funcional reconeguda entre canals pels quals la interacció heteromèrica no ha estat demostrada. (adaptat de (Cheng et al. 2010)).



## 4.5. TRPs i malaltia

En participar en múltiples funcions cel·lulars i fisiològiques, els canals TRP s'han vist implicats en malalties molt diverses com ara trastorns de tipus neurològic, del sistema respiratori, del sistema renal o fins i tot càncer (**taula 5**).

### 4.4.1 Implicació dels TRPs en malalties neurològiques

Quasi tots els canals TRP s'expressen al sistema nerviós. La seva participació en les vies de senyalització del dolor i la sensació tèrmica així com el seu paper en la homeostasi de ions suggereixen que poden tenir un paper important en diverses malalties neurològiques

Alguns canals ja s'han relacionat amb algunes malalties neurològiques. La sensibilització dels canals TRPV1 és important en els mecanismes de la hiperalgèsia tèrmica i l'al·lodínia que caracteritzen el dolor neuropàtic. En estudis *in vitro*, els canals TRPM7 i TRPM2 s'han relacionat amb el dany neuronal provocat per la hipòxia o l'estrès oxidatiu similar al de l'isquèmia cerebral. A més, TRPM7 incrementa la susceptibilitat a la inhibició del  $Mg^{2+}$  intracel·lular en pacients amb la malaltia de Parkinson i demència de Guam. Finalment, s'han relacionat mutacions en el gen que codifica el canal TRPML amb la mucopolidosis tipus IV, una malaltia amb herència autosòmica recessiva (revisat a (Benarroch 2008)).

**Taula 5.** Funcions dels canals TRP i relació amb patologies humanes. Adaptat de (Nelson, P. L. et al. 2011).

Subfamília	Rol fisiològic	Associacions fisiopatològiques
Canònics	Impedeixen el gir del con de creixement Regulen el volum cel·lular de l'hepatòcit i la permeabilitat endotelial Detecció de feromones Conducta sexual específica de gènere Desenvolupament neuronal Activació del factor de la conductància transmembrana de la fibrosi quística en l'endoteli vascular Proliferació de les cèl·lules endotelials de l'artèria pulmonar Reglament del múscul vascular llis i la proliferació de cèl·lules epitelials de la còrnia Funció a l'amígdala Comportament relacionat amb la por Degranulació mediada per IgE dels mastòcits	Miocardiopatia dominant autosòmica de Darier Hipertròfia cardíaca Asma Malaltia pulmonar obstructiva crònica (MPOC) Glomeruloesclerosi focal i segmentària (FSGS) Malaltia pulmonar idiopàtica amb hipertensió arterial (IPAH) Hipertensió vascular
Vanil·loids	Nociceptors Sensors de calor Receptors vanil·loids Reabsorció de Ca <sup>2+</sup> en ronyons i os	Tos crònica Asma, MPOC Diabetis mellitus tipus I Diabetis mellitus tipus II Adipogènesi Obesitat Hiperalgèsia Dermatitis al·lèrgica de contacte Hipersensibilitat neurogènica de la bufeta Càncer de pròstata Càncer de bufeta Càncer de còlon Càncer de pàncrees Caiguda del cabell Dermatitis atòpica Defectes termosensitius Reabsorció del Ca <sup>2+</sup> defectuosa
Melastatina	Inhibeix el creixement de les cèl·lules de melanoma Media la mort neuronal induïda per peròxid Controla la secreció d'insulina Receptors de membrana per a efectes a curt termini de les hormones esteroidals Mediator en les reaccions al·lèrgiques Control de la migració de les cèl·lules dendrítiques i mastòcits Detecció dolç, amarg i umami (gustós) per part de les papil·les gustatives Detecció de feromones en les neurones olfactives Inflamació Termotaxi Quimiotaxi	Hipomagnesèmia amb hipocalcèmia secundària Esclerosi lateral amiotròfica de Guam Parkinsonisme demència de Guam Càncer de pròstata Asma
Anquirina	Mecanosensació en les cèl·lules ciliades de vertebrats Ajuda a l'amplificació del so coclear	Inflamació neurogènica Asma MPOC
Mucolipina	Transport vesicular durant endocitosi i exocitosi Control de pH en els lisosomes Canal transductor mecanoelèctric a la còclea	Mucolipidosi tipus IV (MLIV)
Policistina	Sensors per a l'estimulació mecànica Resposta al moviment del líquid pels cilis Maduració i diferenciació del fol·licle	Malaltia renal policística autosòmica dominant (ADPKD) Malaltia renal terminal

# OBJECTIUS

---

L'objectiu principal d'aquesta tesi ha estat aprofundir en les causes genètiques i moleculars de la migranya: tant de les formes rares de la patologia amb un patró d'herència monogènic, com de les formes més comunes, amb un patró d'herència complex.

Objectius específics:

1. Cerca de mutacions en els gens *CACNA1A* i *ATP1A2*, prèviament descrits com a responsables de formes monogèniques de migranya, en individus no emparentats amb fenotips FHM i SHM. Caracterització funcional de les mutacions no descrites. (Article 1, Article 2 i Article 3).
2. Realització d'un estudi d'associació genètica de tipus cas-control poblacional amb rèplica entre la migranya comuna i 14 gens amb expressió neuronal de la superfamília dels canals TRP (Article 4).



# RESULTATS

---



## INFORME DELS DIRECTORS SOBRE LA CONTRIBUCIÓ DEL DOCTORAND A LES PUBLICACIONS D'AQUESTA TESI DOCTORAL

**Títol de la Tesi:** “Anàlisi genètica i funcional de la migranya hemiplègica i la migranya comuna”

**Autor:** Oriel Carreño

**Directors:** Dr. Bru Cormand i Rifà, Dr. Alfons Macaya Ruiz

### ARTICLE 1

Oriel Carreño, Roser Corominas, Selma Angèlica Serra, Miguel Llana, María-Jesús Sobrido, Miguel Ángel Valverde, José Manuel Fernández-Fernández, Alfons Macaya, Bru Cormand. Screening of the *ATP1A2* and *CACNA1A* genes in patients with hemiplegic migraine: clinical, genetic and functional studies. *Human Mutation* (manuscrit en preparació).

**Índex de qualitat:** SCI2009=6,887, quartil 1 de la categoria GENETICS & HEREDITY.

**Aportació personal a l'article:** Disseny de l'estudi. Cerca bibliogràfica. Extracció d'ADN de pacients migranyosos i controls. Seqüenciació del gen *CACNA1A*. Interpretació dels resultats. Elaboració de part del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

### ARTICLE 2

Oriel Carreño, María Teresa García-Silva, Óscar García-Campos, Ana Martínez-de Aragón, Bru Cormand, Alfons Macaya. Acute striatal necrosis in hemiplegic migraine with de novo *CACNA1A* mutation. *Headache* (en premsa).

**Índex de qualitat:** SCI2009=2,786, quartil 2 de la categoria CLINICAL NEUROLOGY.

**Aportació personal a l'article:** Disseny de l'estudi. Cerca bibliogràfica. Extracció d'ADN genòmic. Seqüenciació del gen *CACNA1A*. Interpretació dels resultats. Elaboració de part del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

### ARTICLE 3

Selma A. Serra, Ester Cuenca-León, Artur Llobet, Francisca Rubio-Moscardo, Cristina Plata, Oriel Carreño, Noèlia Fernández-Castillo, Roser Corominas, Miguel A. Valverde, Alfons Macaya, Bru Cormand, and José M. Fernández-Fernández. A mutation in the first intracellular loop of CACNA1A prevents P/Q channel modulation by SNARE proteins and lowers exocytosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107(4);1672–1677, 2010.

**Índexs de qualitat:** SCI2009=9,432, decil 1 de la categoria MULTIDISCIPLINARY SCIENCES.

**Aportació personal a l'article:** Participació en el disseny de l'estudi. Cerca bibliogràfica. Preparació de construccions genètiques per als estudis funcionals. Interpretació dels resultats i participació en l'elaboració del manuscrit.

### ARTICLE 4

Oriel Carreño, Roser Corominas, Jessica Fernández-Morales, Montserrat Camiña, María-Jesús Sobrido, José Manuel Fernández-Fernández, Patricia Pozo-Rosich, Bru Cormand, Alfons Macaya. SNP variants within the vanilloid *TRPV1* and *TRPV3* receptor genes are associated with migraine in the Spanish population. *American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric genetics* (manuscrit sotmès per a la seva publicació).

**Índexs de qualitat:** SCI2009=3,481, quartil 2 de la categoria GENETICS & HEREDITY.

**Aportació personal a l'article:** Participació en el disseny de l'estudi. Cerca bibliogràfica. Extracció d'ADN de casos i controls. Preparació de les mostres per a la seva genotipació automatitzada. Anàlisi estadística. Elaboració del primer esborrany del manuscrit i participació en l'edició final.

Barcelona, 11 de juny de 2011

Signat pels directors:

Dr. Bru Cormand Rifà

Dr. Alfons Macaya Ruiz



## Formes monogèniques de migranya

### Article 1:

### Cribratge dels gens *ATP1A2* i *CACNA1A* en pacients amb migranya hemiplègica: estudis clínics, genètics i funcionals

#### Resum

La migranya hemiplègica (HM) és un subtipus poc freqüent i greu de migranya amb aura, presenta una herència autosòmica dominant i està caracteritzada per una aura complexa que inclou un cert grau de debilitat motora. S'han detectat mutacions en tres gens (*CACNA1A*, *ATP1A2* i *SCN1A*) en casos familiars i esporàdics. Aquesta malaltia genètica i clínicament heterogènia pot anar acompanyada de signes cerebel·losos permanents, atacs epilèptics, retard mental, coma i atàxia progressiva crònica.

Descrivim aquí el cribratge mutacional exhaustiu dels gens *CACNA1A* i *ATP1A2* en 19 pacients amb HM. S'han identificat cinc mutacions de canvi de sentit al gen *CACNA1A* que ja s'havien descrit prèviament (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln, p.Thr666Met i p.Tyr1387Cys) i un canvi intrònic (c.2175+9G> A) que podria donar lloc a un *splicing* aberrant. S'han detectat també dues variants de canvi de sentit en el gen *ATP1A2*, que inclouen el canvi prèviament descrit p.Ala606Thr i la nova variant p.Glu825Lys. S'han realitzat estudis funcionals dels canvis *ATP1A2*-p.Glu825Lys i *CACNA1A*-p.Thr501Met, aquest últim descrit anteriorment en el context d'un fenotip d'atàxia episòdica de tipus 2 (EA2). Els resultats suggereixen que les dues variants són responsables de la malaltia.

#### Referència

Carreño O, Corominas R, Serra SA, Llana M, Sobrido MJ, Valverde MA, Fernández-Fernández JM, Macaya A, Cormand B. Screening of the *ATP1A2* and *CACNA1A* genes in patients with hemiplegic migraine: clinical, genetic and functional studies [Manuscrit en preparació. Se sotmetrà per a la seva publicació a la revista *Human Mutation*]



# SCREENING OF *ATPIA2* AND *CACNA1A* GENES IN HEMIPLEGIC MIGRAINE: CLINICAL, GENETIC AND FUNCTIONAL STUDIES

Oriel Carreño<sup>1,2,3</sup>, Roser Corominas<sup>1,3,4</sup>, Selma Angèlica Serra<sup>5</sup>, Marta Vila<sup>4</sup>, Noèlia Fernández-Castillo<sup>1,2,3</sup>, Cèlia Sintas<sup>1,2,3</sup>, Roser Pons<sup>6</sup>, Miguel Llanea<sup>7</sup>, María-Jesús Sobrido<sup>8,3</sup>, Miguel Ángel Valverde<sup>5</sup>, José Manuel Fernández-Fernández<sup>5</sup>, Alfons Macaya<sup>4</sup>, Bru Cormand<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup> Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain; <sup>2</sup> Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain; <sup>3</sup> Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER)-Institute of Health Carlos III, Spain; <sup>4</sup> Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat Autònoma de Barcelona, Spain; <sup>5</sup> Laboratory of Molecular Physiology and Channelopathies, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain; <sup>6</sup> First Department of Pediatrics, Agia Sofia Hospital, University of Athens, Athens, Greece; <sup>7</sup> Sección de Neurología, Complejo Hospitalario Arquitecto Marcede-Novoa Santos, Ferrol, Spain; <sup>8</sup> Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain;

Corresponding author:

Bru Cormand, PhD

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona

Av. Diagonal 645, 08028 Barcelona, Spain

Telephone: +34 934021013

Fax: +34 934034420

Email address: bcormand@ub.edu

## 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 three genes (*CACNA1A*, *ATPIA2* and *SCN1A*) 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 screening for mutations in *CACNA1A* and *ATPIA2* in 19 patients with HM. We identified five previously described missense *CACNA1A* mutations (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln, p.Thr666Met and p.Tyr1387Cys) and an intronic change (c.2175+9G>A) that could potentially lead to abnormal splicing. Two missense variants were found in the *ATPIA2* gene, the previously described p.Ala606Thr and the novel variant p.Glu825Lys. Functional studies were performed for the *ATPIA2* p.Glu825Lys change and the *CACNA1A* p.Thr501Met mutation, the latter having been previously described only in association with the EA2 phenotype. Our data suggest that both of these variants are disease-causing.

## 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, three

causative genes have been described in hemiplegic migraine (HM): *CACNA1A* on

chromosome 19p13 (FHM1, MIM #301011) (Ophoff, et al., 1996), *ATPIA2* at 1q23 (FHM2, MIM #182340) (De Fusco, et al., 2003) and *SCN1A* at 2q24 (FHM3, MIM #182389) (Dichgans, et al., 2005). Additionally, two *loci* have been reported in FHM families at 1q31 (Gardner, et al., 1997) and 14q21 (Cuenca-Leon, et al., 2009), although the specific genetic defect has not yet been uncovered.

In recent years, over 60 mutations have been reported in the *ATPIA2* gene,

more than 30 mutations in the *CACNA1A* gene and only 5 in *SCN1A* (de Vries, et al., 2009), (Riant, et al., 2010), (Freilinger, et al., 2011). *ATPIA2* encodes the  $\alpha 2$  subunit of the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase, is expressed in astrocytes and is involved in the clearance of extracellular  $\text{K}^+$  and production of a  $\text{Na}^+$  gradient used in the reuptake of glutamate. *CACNA1A* encodes the pore-forming  $\alpha 1$  subunit of the voltage-gated neuronal  $\text{Ca}_v2.1$  (P/Q-type). Calcium channels are located in glutamatergic presynaptic terminals and play an important role in controlling neurotransmitter release. Finally, *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).

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), characterized by recurrent attacks of vertigo and cerebellar ataxia, and spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6, MIM 183086); recently, a patient with recurrent ischemic stroke with a mutation in the *CACNA1A* gene has been reported (Knierim, et al., 2011). Clinical variation is also seen within the HM phenotype, as typical attacks in HM are often associated with other aura symptoms: the clinical spectrum can include permanent cerebellar signs and, less frequently, various types of epileptic seizures, mental retardation, coma, and in approximately 50% of FHM1 families, chronic progressive ataxia occurs independently of the migraine attacks (International Headache Society (IHS), 2004). The *SCN1A* gene has also 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), severe myoclonic epilepsy in infancy (SMEI) (MIM 607208) and familial febrile convulsions type 2 (FEB2, MIM 604403).

At the functional level, HM and EA2 mutations have opposite effects on the  $\text{Ca}_v2.1$  channels, leading to increased or decreased  $\text{Ca}^{2+}$  influx, respectively. HM-related mutations in the *ATPIA2* gene

typically produce a loss of function of the pump.

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 *ATPIA2* (Cuenca-Leon, et al., 2008). In the present work we analyzed 19 additional patients with HM of Spanish or Greek origin and identified six mutations in the *CACNA1A* gene and two mutations in *ATPIA2*. Two of these changes have been functionally studied to establish their relevance to the disease phenotype.

## MATERIALS AND METHODS

### Patients

All patients, examined and diagnosed by specialized neurologists, fulfilled the International Criteria for Headache Disorders 2nd edition (International Headache Society (IHS), 2004) for FHM or SHM diagnoses except patient #157, with probable HM but only one severe HM episode. Clinical characteristics of the sample are presented in Table 1 and the structure of pedigrees of patients in which mutations were identified is shown in Figure 1. One hundred Caucasoid Spanish unrelated 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 *ATPIA2* genes. In addition, 50 Caucasoid Greek individuals from the general population were used as controls for the novel mutation identified in the *ATPIA2* gene in a Greek patient. This study was approved by the local Ethics Committees 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 *ATPIA2* and *CACNA1A* genes were sequenced as previously described, including all exons, splice sites and branch points (Cuenca-Leon, et al., 2008), except for exon one because of technical constraints. Mutation

nomenclature follows HGVS guidelines (www.hgvs.org/-mutnomen) and refers to the *ATP1A2* cDNA sequence NM\_000702.3 (protein sequence NP\_000693.1) with nucleotide 1A (ATG) corresponding to the initiation codon and the *CACNA1A* cDNA sequence NM\_023035.1 (protein sequence NP\_075461.2), with nucleotide 283A (ATG) corresponding to +1. All mutations were assessed by bidirectional sequencing. In addition, most mutations were confirmed by restriction fragment length polymorphism (RFLP) analysis of PCR products or single-strand conformation polymorphism (SSCP) (Table 2). Control individuals were screened by sequencing, SSCP analysis or via RFLP analysis to test the possible presence of the identified changes.

#### DNA constructs and site-directed mutagenesis

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).

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

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

#### Functional analysis of ATP1A2

##### *Transfections and ouabain treatment*

Two  $\mu$ g of constructs were transfected in HeLa cells using Lipofectamine 2000 (Invitrogen). 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 24h, the  $Na^+/K^+$ -ATPase inhibitor ouabain (1  $\mu$ M) was added to the medium (DMEM

containing 10% FBS and 1% Penicillin-Streptomycin). After 48h 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*

Twenty-five  $\mu$ g of total protein extract (per lane) were subjected to 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. Gels were transblotted to a nitrocellulose membrane and were incubated overnight with monoclonal antibodies against c-Myc (4  $\mu$ g/ml). Horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse immunoglobulins were used as a secondary antibody. Proteins were visualized with the Enhanced Chemiluminescence kit (GE Healthcare). Blots were probed with anti-tubulin 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).

#### 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, Maryland, USA) (8 equivalents PEI/3.3  $\mu$ g DNA/dish) as previously reported (Fernandez-Fernandez, et al., 2004). Transfection was performed using the ratio for  $\alpha_{1A}$  (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 $\Omega$  when filled with a solution containing (in mM): 140 CsCl, 1 EGTA, 4  $Na_2$ ATP, 0,1  $Na_3$ GTP and 10 Hepes (pH 7.2-7.3 and 295-300

mosmoles/l). The external solution contained (in mM): 140 tetraethylammonium-Cl, 3 CsCl, 2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 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 pClamp8 software (Axon Instruments, Foster City, CA, USA) was used for pulse generation, data acquisition and subsequent analysis.

Peak inward Ca<sup>2+</sup> currents were measured from cells clamped at -80 mV and pulsed for 20 ms from -60 mV to +70 mV in 5 mV steps. A modified Boltzmann equation (Equation 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<sub>Ca</sub> currents at +20 mV following 30 s steps to various holding potentials (conditioning pulses) between -80 and +5 mV. During the time interval between test pulses (20 ms) cells were held at -80 mV. I<sub>Ca</sub> currents obtained following the conditioning pulses were normalized to maximal I<sub>Ca</sub> to determine the persistent current. Half-maximal voltage ( $V_{1/2, \text{inact}}$ ) was obtained by fitting the data to the following Boltzmann equation (Equation 2). All experiments were carried out at room temperature (22–24°C).

Equation 1:

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

Equation 2:

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

### Statistics

Data are presented as the means ± S.E.M. Student's *t* test or Mann-Whitney test was used for statistical analysis, as appropriate. Differences were considered significant if  $P < 0.05$ .

## RESULTS

### Clinical data

Nineteen patients with hemiplegic migraine and other accompanying clinical features were identified and screened for mutations in the *CACNA1A* and *ATP1A2* genes. Ten were classified as FHM and nine as SHM. The clinical characteristics of all patients are summarized in Table 1.

There was, as previously described, a female preponderance in our HM population (13F/6M). Age of onset was known for 18 cases. Eight patients presented within the first decade; the youngest age of presentation of hemiplegia was at age 3, in a patient affected with a most severe phenotype (case #336). 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 cases #336 and #1310, both bearing *CACNA1A* mutations.

Other ictal manifestations were common in this cohort of HM patients: six cases developed migraine with aura (n=5) or migraine without aura (n=1) episodes; two patients had epileptic seizures and one had a history of febrile seizures; transient visual loss, episodic ataxia and isolated transient aphasia were described in one case each.

All patients had MRI studies. The only remarkable neuroradiologic findings were chronic cerebellar atrophy in two cases and cerebral edema at the time of the episodes in two cases. Both, neuroradiological abnormalities as well as interictal, permanent neurological abnormalities occurred exclusively in the subgroup of patients bearing mutations in any of the two genes analyzed. The remaining patients did not have any chronic disability and had normal interictal exams. Six patients harbored mutations in the *CACNA1A* gene and two in the *ATP1A2* gene.

A more detailed clinical description of patient #387A and his father, who bears a novel mutation in the *ATP1A2* gene, is

provided as supplementary material (see Supplementary Materials and Methods).

### Genetic analysis

The extensive sequencing of the *CACNA1A* gene in 19 subjects with hemiplegic migraine allowed the identification of five previously reported variants and one novel change in six unrelated families. In the remaining 13 patients, a novel and a previously described mutation were detected in the *ATPIA2* gene (Table 2 and Figure 2). The presence of these variants, except for p.Thr501Met, was confirmed by restriction analysis of the corresponding PCR products (Table 2). The identified changes were not present in 200 chromosomes from Spanish non-migraneurs. The novel p.Glu825Lys mutation in the *ATPIA2* gene, identified in a Greek patient, was also absent from a set of 100 chromosomes from unscreened Greek individuals.

Seven out of eight mutations led to amino acid substitutions (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln, p.Thr666Met, p.Tyr1387Cys in *CACNA1A*; p.Glu825Lys and p.Ala606Thr in *ATPIA2*) and one was intronic (c.2175+9G>A in position +9 of *CACNA1A* intron 17). Only two of them are described here for the first time (c.2175+9G>A in *CACNA1A* and p.Glu825Lys in *ATPIA2*), whereas the rest had previously been reported by other authors. Thus, four of the identified *CACNA1A* mutations had previously been associated with HM in several patients: p.Arg583Gln (Battistini, et al., 1999), the prevalent changes p.Ser218Leu (Chan, et al., 2008; Curtain, et al., 2006; Debiais, et al., 2009; Kors, et al., 2001; Stam, et al., 2009; Zangaladze, et al., 2010) and p.Thr666Met (Ducros, et al., 1999; Freilinger, et al., 2008; Friend, et al., 1999; Kors, et al., 2003; Ophoff, et al., 1996; Thomsen, et al., 2007; Wada, et al., 2002; Yabe, et al., 2008), and p.Tyr1387Cys (Vahedi, et al., 2000) (Riant, et al., 2010). In contrast, the p.Thr501Met variant was recently identified in an EA2 family (Mantuano, et al., 2010). The previously reported p.Ala606Thr *ATPIA2* mutation had also been reported in a HM subject (Riant, et al., 2005).

The novel missense mutation p.Glu825Lys in *ATPIA2* and mutation p.Thr501Met in *CACNA1A*, described only once prior to our study, and both of them subjected to functional studies in our work (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 variation was present in the proband's affected father and absent in the healthy mother and brother (Fig. 1; for a detailed clinical description see Supplementary Material). p.Thr501Met was transmitted to two of the proband's sibs, both with HM (Fig. 1).

The newly described c.2175+9G>A mutation, identified in a Spanish patient with SHM that also suffers from basilar-type auras, attention-deficit hyperactivity disorder and seizures during a HM attack, produces a G to A transition at position +9 in intron 17 of the *CACNA1A* gene (Figs. 3 and 4).

### Functional studies

#### *ATPIA2* (p.Glu825Lys): Ouabain resistant survival assays

p.Glu825Lys exchanges a negatively charged residue for a positive one and is located in the intracellular L6/7 loop of the *ATPIA2* protein, between the transmembrane segments M6 and M7 (Fig. 2). Potential pathogenicity of the mutation p.Glu825Lys was indirectly tested through ouabain resistance survival assays.

HeLa cells transfected with the  $\alpha_2$ \_oua\_825Lys construction showed a 10% survival rate, compared with cells transfected with  $\alpha_2$ \_oua\_wt (Fig. 5). 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. 5).

#### *CACNA1A* (p.Thr501Met): Current density and activation/inactivation voltage dependence of heterologously expressed *Ca<sub>v</sub>2.1* (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  $\alpha_{1A}$  subunit

of the neuronal  $\text{Ca}_v2.1$  (P/Q-type)  $\text{Ca}^{2+}$  channel. It lies in the S1 segment of domain II (II-S1) which makes up part of the voltage sensor (Tombola, et al., 2006). Since in a previous work we found that another S1 mutation, Y1245C in domain III of the protein (described in a patient with childhood periodic syndromes that evolved into HM) 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  $\alpha_{1A}$  ( $\alpha_{1A(T501M)}$ ) were significantly higher than current densities of wild-type (WT)  $\alpha_{1A}$  channels ( $P < 0.05$ ) in a physiological range of depolarized voltages (from -20 to +5 mV) (Fig. 6a, left panel). The potential for half-maximal activation ( $V_{1/2, \text{act}}$ ) was also significantly ( $P < 0.0001$ ) shifted to hyperpolarized potentials for p.Thr501Met channels (by  $\sim 9$  mV) (Fig. 6a, right panel). Consistently, the maximum current amplitude was elicited by depolarizing pulses to +15 mV or +5 mV for WT or p.Thr501Met channels, respectively (Fig. 6a). The half-maximal voltage for steady-state inactivation ( $V_{1/2, \text{inact}}$ ) induced by 30s conditioning prepulses between -80 and +5 mV was left-shifted ( $\sim 15$  mV) in p.Thr501Met channels ( $P < 0.0001$ ). (Fig. 6b).

## DISCUSSION

We have identified eight potentially disease-causing mutations in the *CACNA1A* and *ATP1A2* genes in a cohort of 19 unrelated probands with hemiplegic migraine (42.1%) from Spain and Greece. Seven of them are missense changes and another one is a putative splicing mutation. There is evidence supporting that the identified amino acid substitutions are indeed disease-causing mutations: 1) When family material was available, the mutations co-segregated 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, 3) no other molecular alterations

were identified within the studied genes after the analysis of the whole coding region (with the exception of exon 1 of *CACNA1A*) and the exon-intron boundaries, including splice sites and branch points, 4) 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* 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 performed by us (p.Thr501Met in *CACNA1A* and p.Glu825Lys in *ATP1A2*) or 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 the pathogenicity of six of the changes.

### *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). HeLa cells transfected with ouabain resistant wild-type *ATP1A2* thrived in ouabain, yet cells transfected with the mutant *ATP1A2* construct did not survive treatment with ouabaine, indicating that the mutation resulted in loss of function of the sodium-potassium pump (Jen, et al., 2007). In a more detailed functional study it was shown that the  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -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 of the protein, was identified in an individual with HM and seizures. Other mutations in this loop have been identified in other cohorts and functionally tested: p.Met829Arg, p.Arg384X and p.Arg834Gln (De Vries, et al., 2007; Tavraz, et al., 2008). p.Arg834X showed no cell survival in ouabain challenge assays, and electrophysiological analyses of



p.Arg834Gln displayed altered affinities for extracellular cations or reduced enzyme turnover, and other voltage modifications. It was suggested that negatively charged residues in loop L6/7 contribute to the initial recognition of Na<sup>+</sup> or K<sup>+</sup> ions and constitute the cytoplasmic cation entry port (Jorgensen, et al., 2003; Shainskaya, et al., 2000). 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, and the authors suggested that the loop may be a structural component of the mechanism connecting ion binding sites to the phosphorylation site (Xu, et al., 2003). These experiments included a Glu to Ala mutation in a Ca<sup>2+</sup>-ATPase, equivalent to the p.Glu825Lys identified in our patient.

### CACNA1A screening

Five patients had missense mutations in the *CACNA1A* gene, all of them described in previous screenings by other authors: p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln, p.Thr666Met and p.Tyr1387Cys. A novel mutation, c.2175+9G>A, potentially affecting splicing, was also found.

*p.Ser218Leu*: This change was identified as a *de novo* mutation in a SHM patient with aphasia, transient cerebral edema and generalized seizures. This mutation had been described in eight HM patients (Chan, et al., 2008; Curtain, et al., 2006; Debiais, et al., 2009; Kors, et al., 2001; Stam, et al., 2009; Zangaladze, et al., 2010), having appeared *de novo* in two of them (Stam, et al., 2009).

*p.Arg583Gln*: This prevalent mutation has been previously identified in FHM families or in sporadic patients (Alonso, et al., 2003; Battistini, et al., 1999; Ducros, et al., 2001; Riant, et al., 2010; Terwindt, et al., 2002; Thomsen, et al., 2007). In family #A00\_100 only the probandus has HM (Fig. 1) 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 towards more negative potentials due to the neutralization of residue 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 (Ducros, et al., 1999; Freilinger, et al., 2008; Friend, et al., 1999; Kors, et al., 2003; Ophoff, et al., 1996; Riant, et al., 2010; Terwindt, et al., 2002; Thomsen, et al., 2007; Wada, et al., 2002; Yabe, et al., 2008). Functional studies in heterologous systems show a gain of function through the following mechanisms: a decrease in the recovery after inactivation (Kraus, et al., 1998), increased Ca<sup>2+</sup> influx through the channel and a decreased maximum current density (Tottene, et al., 2002).

*p.Tyr1387Cys*: We have previously reported this mutation in patient #336 (Carreño et al., in press). The case presented a severe phenotype with pyramidal syndrome, visual problems, cerebellar atrophy, psychomotor retardation and acute unilateral striatal necrosis. Two SHM patients with this mutation have been described: a woman with mental retardation, HM, coma, seizures, chronic ataxia and cerebellar atrophy (Vahedi, et al., 2000) and another woman with cognitive and motor disabilities who developed auras featuring loss of consciousness (Riant, et al., 2010). Interestingly, both of them have a *de novo* origin.

*c.2175+9G>A*: This variation, located at position +9 in intron 17 of the gene, may potentially give rise to abnormal splicing, as shown by bioinformatic calculations, although functional experiments are needed to confirm this prediction. The ESEfinder software (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/ESEbkgr.html>) provided a motif score for the 5' splice site U2-type, involved in the recognition of the RNA precursor by the U2 splicing complex, that decreased from 7.05 in the WT species to 0.00 in the mutated RNA (Fig. 4).

*p.Thr501Met*: This change, found in patient #A03\_044 with FHM, nystagmus and episodic and progressive ataxia, has recently 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  $\alpha_{1A}$  subunit in patients with hemiplegic migraine. In order to properly establish the pathogenicity of the p.Thr501Met mutation, we have studied its functional consequences on human  $Ca_v2.1$  channels containing  $\beta_3$  and  $\alpha_2\delta$  subunits heterologously expressed in HEK 293 cells. Our data show that mutation p.Thr501Met promotes channel activity by shifting the current activation curve to lower voltages ( $\sim 9$  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 ( $\sim 15$  mV). These results are similar to those previously reported for rabbit  $Ca_v2.1$  channels carrying the other S1 mutation described in a context of HM, mutation p.Tyr1245Cys, and containing  $\beta_{2a}$  and  $\alpha_2\delta$  subunits (Serra, et al., 2009). Thus, our results for the p.Thr501Met mutation further support an important role of the S1 segments in channel gating by voltage, irrespective of the  $\alpha_{1A}$  nature (rabbit or human) or the  $\beta$  subunit conforming the channel ( $\beta_{2a}$  or  $\beta_3$ ). Indeed, it has been proposed that residues in the S1 segment may form part of a hydrophobic plug which constitutes the main energy barrier encountered by positively charged residues in S4 when they translocate during voltage sensing (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  $\sim 10$  mV is a trait shared by all FHM-causing mutations in *CACNA1A* (Tottene, et al., 2005; van den Maagdenberg, et al., 2004). Such gain of channel function specifically promotes cortical excitatory neurotransmission and favours CSD initiation and propagation in FHM knock-in mouse models (Tottene, et al., 2009). CSD, an abnormal increase of cortical activity -followed by a long-lasting neuronal suppression wave- that propagates

across the cortex, is thought to play a major pathophysiological role in migraine: it causes the aura and activates the trigeminovascular system evoking alterations in the meningeal blood vessels and brainstem nuclei that lead to the development of headache (Bolay, et al., 2002). Although the molecular mechanisms initiating CSD are not fully understood, a positive feedback mechanism involving increased depolarization, extracellular  $K^+$  concentration and glutamatergic neurotransmission in which  $Ca_v2.1$  channels play a pivotal role, appears crucial for triggering CSD (Pietrobon, 2007).

Voltage-dependent inactivation of  $Ca^{2+}$  channels is also an important physiological mechanism regulating neurosecretion (Branchaw, et al., 1997; Forsythe, et al., 1998). Many FHM-causing *CACNA1A* mutations alter  $Ca_v2.1$  calcium channel inactivation (Hans, et al., 1999; Kraus, et al., 1998; Kraus, et al., 2000; Mullner, et al., 2004; Serra, et al., 2009; Tottene, et al., 2005); this report), underlining its physiological relevance. However, these changes are highly heterogeneous, involving both gain- and loss-of-function, and their contribution to the pathophysiology of the disease remains to be elucidated. Only for the FHM-causing p.Ser218Leu mutation it has been suggested that the reduced extent of inactivation contributes to the severity of the associated clinical phenotype (Tottene, et al., 2005).

Mutations in *CACNA1A* are also associated to few autosomal dominant neurological disorders characterized by cerebellar dysfunction, such as episodic ataxia type 2 (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 unclear 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, further understanding of the mechanisms leading to this variation

in phenotypes may arise from the study of p.Arg192Gln and p.Ser218Leu knock-in animals. In humans, whereas mutation p.Arg192Gln causes pure FHM, mutation p.Ser218Leu causes a particularly dramatic clinical syndrome, that may consist of, in addition to attacks of hemiplegic migraine, slowly progressive cerebellar ataxia and atrophy, epileptic seizures, coma or profound stupor and severe, sometimes fatal, cerebral oedema which can be triggered by only a trivial head trauma (Kors, et al., 2001). In mice, while homozygous p.Arg192Gln (RQ/RQ) and heterozygous p.Ser218Leu (SL/WT) KI models did not exhibit an overt phenotype, homozygous p.Ser218Leu (SL/SL) KI model exhibited mild permanent cerebellar ataxia, spontaneous attacks of hemiparesis and/or (sometimes fatal) generalized seizures, and brain oedema after only a mild head impact, thus modelling the main features of the severe p.Ser218Leu clinical syndrome (van den Maagdenberg, et al., 2004; van den Maagdenberg, et al., 2010). Therefore, detailed analysis of cerebellar function in these knock-in animals may help us to unveil the role of FHM *CACNA1A* mutations in EA2.

#### Unidentified mutations/genes

It might be that a few pathogenic mutations have remained unidentified in the two genes studied, including changes in introns or in regulatory regions, gross alterations that may be undetectable by PCR, or mutations in exon 1 of *CACNA1A*. In the present study, based on PCR amplification of short coding DNA segments followed by sequencing, such changes cannot be formally ruled out. Recently, large rearrangements in the *CACNA1A* gene have been described in HM patients (Labrum, et al., 2009), and so it is conceivable that deletions or duplications in *ATP1A2* could also be responsible for HM. Also, changes in the 5' and 3' regions have been described in the *CACNA1A* gene in HM patients (Veneziano, et al., 2009), and thus future mutation analyses may be extended to these flanking segments.

Mutations in *SCN1A*, the third gene linked to FHM and involved in several forms of epilepsy, would appear to be as a rather unusual cause of FHM. Indeed, more

than 700 mutations have been identified in *SCN1A* with SMEI compared to just five in FHM (<http://www.molgen.ua.ac.be/SCN1-AMutations/Home/Default.cfm>) (Claes, et al., 2009). This gene was not considered in the present study.

Finally, at least one other FHM gene 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 11 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.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr. Casari, who kindly provided us with the *ATP1A2* cDNA ouabain resistant construct with the myc tag. We also thank Dr. J Striessnig (University of Innsbruck) for the gift of human *CACNA1A* cDNA and Dr. Harkins for making available the MPC cell line 9/3L-AH. The work was funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation, Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) Funds, and Plan E (Grants SAF2009-13182-C03-01, SAF2009-13182-C03-02, SAF2009-13182-C03-03, SAF2003-04704, SAF2006-04973 and SAF2009-09848), Fondo de Investigación Sanitaria (red HERACLES RD06/0009) and Generalitat de Catalunya (grants 2009SGR0971 and 2009SGR1369). MAV is the recipient of an ICREA Academia Award (Generalitat de Catalunya).

#### REFERENCES

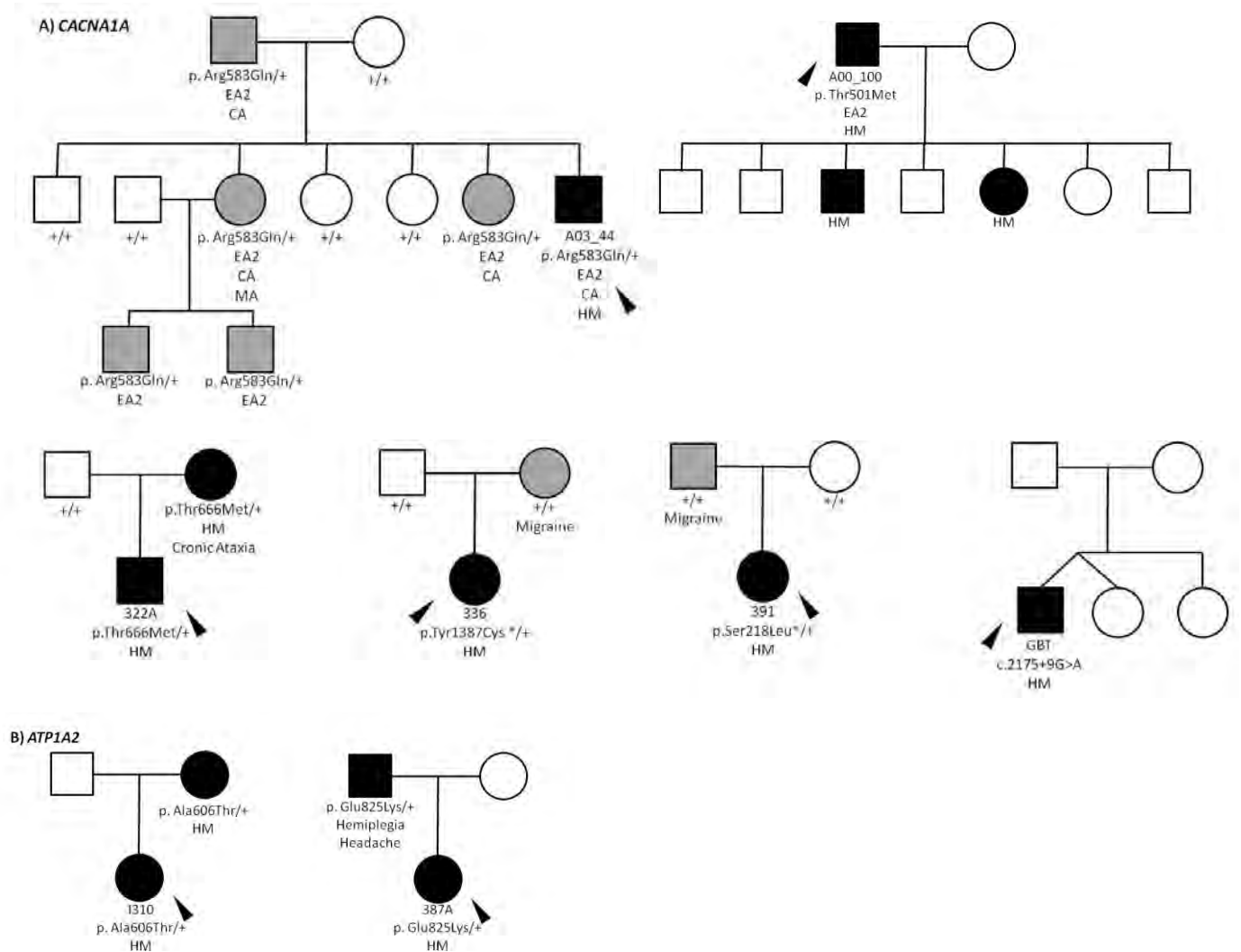
- Adams PJ, Rungta RL, Garcia E, van den Maagdenberg AM, MacVicar BA, Snutch TP. 2010. Contribution of calcium-dependent facilitation to synaptic plasticity revealed by migraine mutations in the P/Q-type calcium channel. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107:18694-9.
- Alonso I, Barros J, Tuna A, Coelho J, Sequeiros J, Silveira I, Coutinho P. 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.

- Battistini S, Stenirri S, Piatti M, Gelfi C, Righetti PG, Rocchi R, Giannini F, Battistini N, Guazzi GC, Ferrari M and others. 1999. A new CACNA1A gene mutation in acetazolamide-responsive familial hemiplegic migraine and ataxia. *Neurology* 53:38-43.
- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA, Moskowitz MA. 2002. Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8:136-42.
- Branchaw JL, Banks MI, Jackson MB. 1997. Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent inactivation of Ca<sup>2+</sup> channels in nerve terminals of the neurohypophysis. *J Neurosci* 17:5772-81.
- 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. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104:7904-9.
- Chan YC, Burgunder JM, Wilder-Smith E, Chew SE, Lam-Mok-Sing KM, Sharma V, Ong BK. 2008. Electroencephalographic changes and seizures in familial hemiplegic migraine patients with the CACNA1A gene S218L mutation. *J Clin Neurosci* 15:891-4.
- Chenna R, Sugawara H, Koike T, Lopez R, Gibson TJ, Higgins DG, Thompson JD. 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nucleic Acids Res* 31:3497-500.
- Claes LR, Deprez L, Suls A, Baets J, Smets K, Van Dyck T, Deconinck T, Jordanova A, De Jonghe P. 2009. The SCN1A variant database: a novel research and diagnostic tool. *Hum Mutat* 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* 30:740-3.
- 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* 28:1039-47.
- Cuenca-Leon E, Corominas R, Montfort M, Artigas J, Roig M, Bayes M, Cormand B, Macaya A. 2009. Familial hemiplegic migraine: linkage to chromosome 14q32 in a Spanish kindred. *Neurogenetics* 10:191-8.
- Curtain RP, Smith RL, Ovcaric M, Griffiths LR. 2006. Minor head trauma-induced sporadic hemiplegic migraine coma. *Pediatr Neurol* 34:329-32.
- De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, Ballabio A, Aridon P, Casari G. 2003. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 33:192-6.
- de Vries B, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM. 2009. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet* 126:115-32.
- De Vries DR, Van Herwaarden MA, Baron A, Smout AJ, Samsom M. 2007. Concomitant functional dyspepsia and irritable bowel syndrome decrease health-related quality of life in gastroesophageal reflux disease. *Scand J Gastroenterol* 42:951-6.
- Debiais S, Hommet C, Bonnaud I, Barthez MA, Rimbaux S, Riant F, Autret A. 2009. The FHM1 mutation S218L: a severe clinical phenotype? A case report and review of the literature. *Cephalalgia* 29:1337-9.
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, Ferrari MD, Herzog J, van den Maagdenberg AM, Pusch M and others. 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, Vahedi K, Darcel F, Vicaut E, Bousser MG, Tournier-Lasserre E. 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, Darcel F, Madigand M, Guerouaou D, Tison F, Julien J and others. 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.
- Fernandez-Fernandez JM, Tomas M, Vazquez E, Orio P, Latorre R, Senti M, Marrugat J, Valverde MA. 2004. Gain-of-function mutation in the KCNM1 potassium channel subunit is associated with low prevalence of diastolic hypertension. *J Clin Invest* 113:1032-9.
- Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Cuttle MF, Takahashi T. 1998. Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron* 20:797-807.
- Freilinger T, Ackl N, Ebert A, Schmidt C, Rautenstrauss B, Dichgans M, Danek A. 2011. A novel mutation in CACNA1A associated with hemiplegic migraine, cerebellar dysfunction and late-onset cognitive decline. *J Neurol Sci* 300:160-3.
- 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* 28:403-7.
- Friend KL, Crimmins D, Phan TG, Sue CM, Colley A, Fung VS, Morris JG, Sutherland GR, Richards RI. 1999. Detection of a novel missense mutation and second recurrent mutation in the CACNA1A

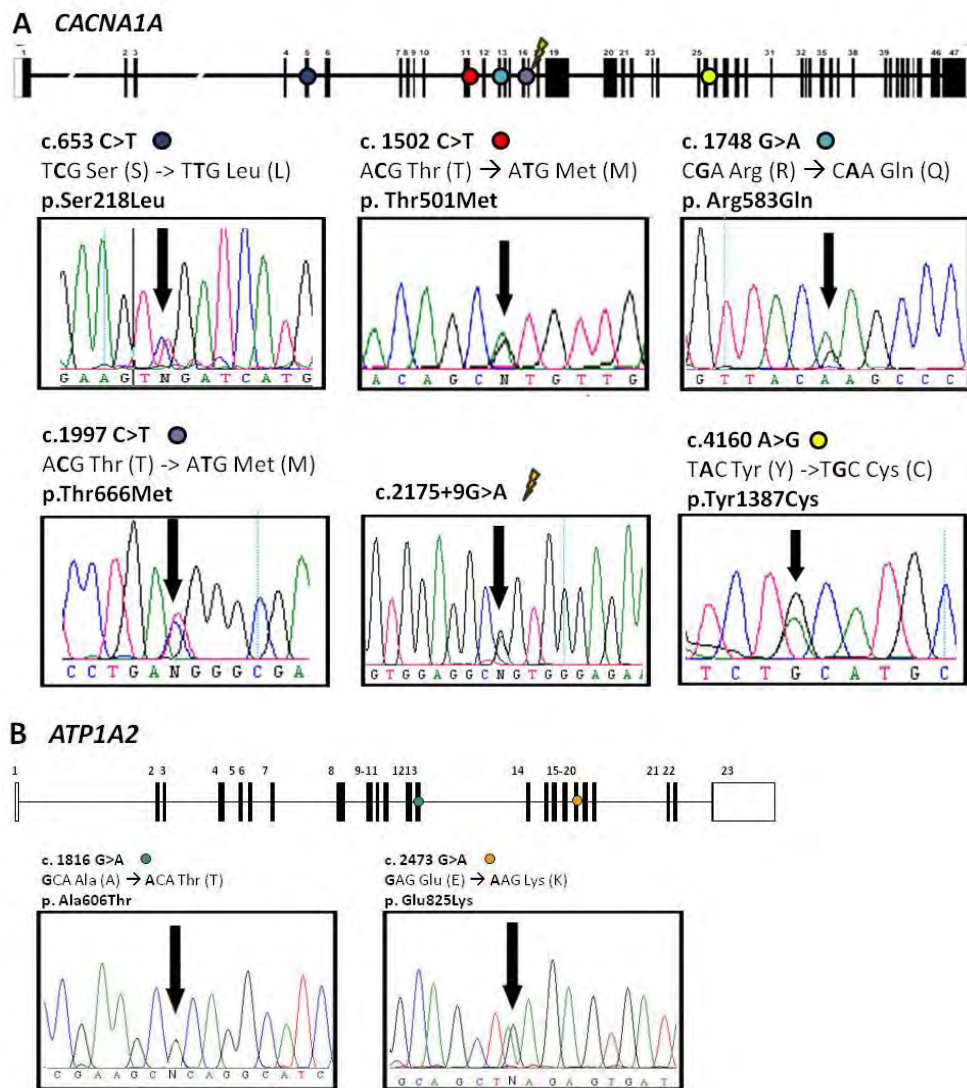
- gene in individuals with EA-2 and FHM. *Hum Genet* 105:261-5.
- Gardner K, Barmada MM, Ptacek LJ, Hoffman EP. 1997. A new locus for hemiplegic migraine maps to chromosome 1q31. *Neurology* 49:1231-8.
- Hamill OP, Marty A, Neher E, Sakmann B, Sigworth FJ. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch* 391:85-100.
- Hans M, Luvisetto S, Williams ME, Spagnolo M, Urrutia A, Tottene A, Brust PF, Johnson EC, Harpold MM, Stauderman KA and others. 1999. Functional consequences of mutations in the human alpha1A calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* 19:1610-9.
- International Headache Society (IHS) HCS. 2004. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24 Suppl 1:9-160.
- Jen JC, Klein A, Boltshauser E, Cartwright MS, Roach ES, Mamsa H, Baloh RW. 2007. Prolonged hemiplegic episodes in children due to mutations in ATP1A2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 78:523-6.
- Jorgensen PL, Hakansson KO, Karlsh SJ. 2003. Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions. *Annu Rev Physiol* 65:817-49.
- 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:e14-e17.
- Kors EE, Haan J, Giffin NJ, Pazdera L, Schnittger C, Lennox GG, Terwindt GM, Vermeulen FL, Van den Maagdenberg AM, Frants RR and others. 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.
- Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FL, Fitzsimons RB, Jardine PE, Heywood P, Love S, van den Maagdenberg AM, Haan J, Frants RR and others. 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* 49:753-60.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Glossmann H, Hering S, Striessnig J. 1998. Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem* 273:5586-90.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Koschak A, Glossmann H, Stenirri S, Carrera P, Striessnig J. 2000. Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca(2+) channel kinetics. *J Biol Chem* 275:9239-43.
- Labrum RW, Rajakulendran S, Graves TD, Eunson LH, Bevan R, Sweeney MG, Hammans SR, Tubridy N, Britton T, Carr LJ and others. 2009. Large scale calcium channel gene rearrangements in episodic ataxia and hemiplegic migraine: implications for diagnostic testing. *J Med Genet* 46:786-91.
- Mantuano E, Romano S, Veneziano L, Gellera C, Castellotti B, Caimi S, Testa D, Estienne M, Zorzi G, Bugiani M and others. 2010. Identification of novel and recurrent CACNA1A gene mutations in fifteen patients with episodic ataxia type 2. *J Neurol Sci* 291:30-6.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215.
- Mullner C, Broos LA, van den Maagdenberg AM, Striessnig J. 2004. Familial hemiplegic migraine type 1 mutations K1336E, W1684R, and V1696I alter Cav2.1 Ca<sup>2+</sup> channel gating: evidence for beta-subunit isoform-specific effects. *J Biol Chem* 279:51844-50.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE, Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M and others. 1996. Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543-52.
- Pietrobon D. 2007. Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* 4:274-84.
- Riant F, De Fusco M, Aridon P, Ducros A, Ploton C, Marchelli F, Maciazek J, Bousser MG, Casari G, Tournier-Lasserre E. 2005. ATP1A2 mutations in 11 families with familial hemiplegic migraine. *Hum Mutat* 26:281.
- Riant F, Ducros A, Ploton C, Barbance C, Depienne C, Tournier-Lasserre E. 2010. De novo mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine. *Neurology* 75:967-72.
- Serra SA, Fernandez-Castillo N, Macaya A, Cormand B, Valverde MA, Fernandez-Fernandez JM. 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.
- Shainskaya A, Schneeberger A, Apell HJ, Karlsh SJ. 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* 275:2019-28.

- Stam AH, Luijckx GJ, Poll-The BT, Ginjaar IB, Frants RR, Haan J, Ferrari MD, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM. 2009. Early seizures and cerebral oedema after trivial head trauma associated with the CACNA1A S218L mutation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 80:1125-9.
- Strupp M, Zwergal A, Brandt T. 2007. Episodic ataxia type 2. *Neurotherapeutics* 4:267-73.
- Tavraz NN, Friedrich T, Durr KL, Koenderink JB, Bamberg E, Freilinger T, Dichgans M. 2008. Diverse functional consequences of mutations in the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase alpha2-subunit causing familial hemiplegic migraine type 2. *J Biol Chem* 283:31097-106.
- Terwindt G, Kors E, Haan J, Vermeulen F, Van den Maagdenberg A, Frants R, Ferrari M. 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, Fasquel AC, Petursson H, Stefansson M, Frigge ML, Kong A and others. 2007. The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine. *Brain* 130:346-56.
- Tombola F, Pathak MM, Isacoff EY. 2006. How does voltage open an ion channel? *Annu Rev Cell Dev Biol* 22:23-52.
- Tottene A, Conti R, Fabbro A, Vecchia D, Shapovalova M, Santello M, van den Maagdenberg AM, Ferrari MD, Pietrobon D. 2009. Enhanced excitatory transmission at cortical synapses as the basis for facilitated spreading depression in Ca(v)2.1 knockin migraine mice. *Neuron* 61:762-73.
- Tottene A, Fellin T, Pagnutti S, Luvisetto S, Striessnig J, Fletcher C, Pietrobon D. 2002. Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca(2+) influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 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. *J Biol Chem* 280:17678-86.
- Vahedi K, Denier C, Ducros A, Bousson V, Levy C, Chabriat H, Haguenu M, Tournier-Lasserre E, Boussier MG. 2000. CACNA1A gene de novo mutation causing hemiplegic migraine, coma, and cerebellar atrophy. *Neurology* 55:1040-2.
- van den Maagdenberg AM, Pietrobon D, Pizzorusso T, Kaja S, Broos LA, Cesetti T, van de Ven RC, Tottene A, van der Kaa J, Plomp JJ and others. 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, Hoebeek FE, Barrett CF, Gherardini L, van de Ven RC, Todorov B and others. 2010. High cortical spreading depression susceptibility and migraine-associated symptoms in Ca(v)2.1 S218L mice. *Ann Neurol* 67:85-98.
- Vanmolkot KR, Kors EE, Hottenga JJ, Terwindt GM, Haan J, Hoefnagels WA, Black DF, Sandkuijl LA, Frants RR, Ferrari MD and others. 2003. Novel mutations in the Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>-ATPase pump gene ATP1A2 associated with familial hemiplegic migraine and benign familial infantile convulsions. *Ann Neurol* 54:360-6.
- Veneziano L, Guida S, Mantuano E, Bernard P, Tarantino P, Boccone L, Hisama FM, Carrera P, Jodice C, Frontali M. 2009. Newly characterised 5' and 3' regions of CACNA1A gene harbour mutations associated with Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia. *J Neurol Sci* 276:31-7.
- 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. *Pediatr Neurol* 26:47-50.
- Weiss N, Sandoval A, Felix R, Van den Maagdenberg A, De Waard M. 2008. The S218L familial hemiplegic migraine mutation promotes de/inhibition 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. *Lancet Neurol* 6:521-32.
- Xu G, Farley RA, Kane DJ, Faller LD. 2003. Site-directed mutagenesis of amino acids in the cytoplasmic loop 6/7 of Na,K-ATPase. *Ann N Y Acad Sci* 986:96-100.
- Yabe I, Kitagawa M, Suzuki Y, Fujiwara K, Wada T, Tsubuku T, Takeichi N, Sakushima K, Soma H, Tsuji S and others. 2008. Downbeat positioning nystagmus is a common clinical feature despite variable phenotypes in an FHM1 family. *J Neurol* 255:1541-4.
- Zangaladze A, Asadi-Pooya AA, Ashkenazi A, Sperling MR. 2010. Sporadic hemiplegic migraine and epilepsy associated with CACNA1A gene mutation. *Epilepsy Behav* 17:293-5.

FIGURES

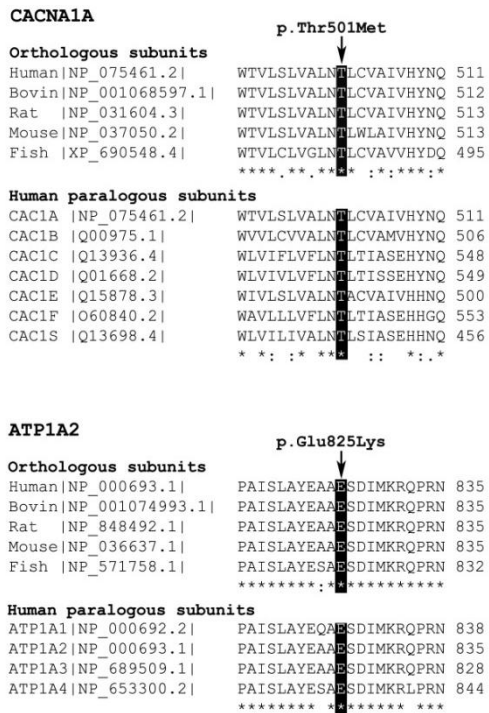


**Figure 1.** Structure of pedigrees of patients with the identified gene variants. A) Pedigrees with mutations in the *CACNA1A* gene B) Pedigrees with mutations in the *ATP1A2* gene. Affected individuals are denoted by solid symbols; hemiplegic migraine in black and other phenotypes in grey; squares indicate males and circles females. Proband is 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. \* symbol indicates *de novo* mutation.

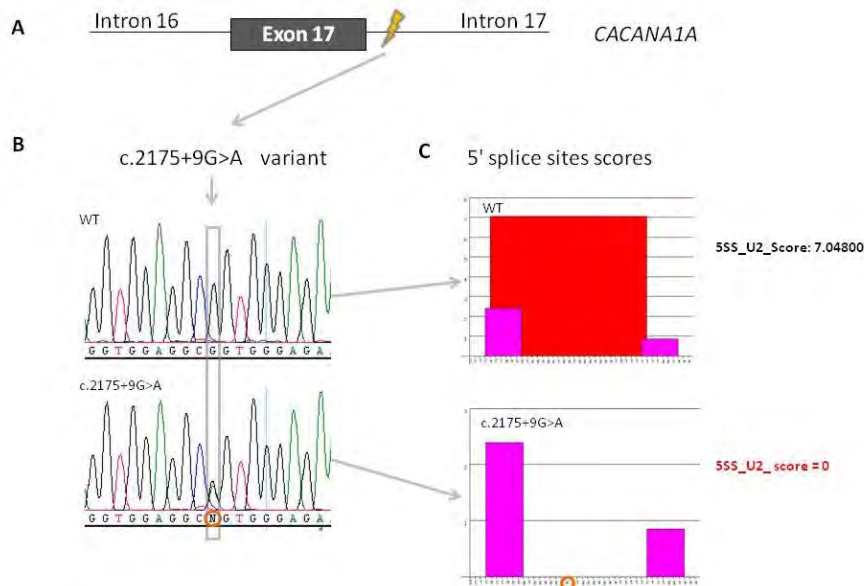


**Figure 2.** Gene structure and detection of the mutations. A) *CACNA1A* gene structure, with black boxes indicating exons. The identified mutations causing hemiplegic migraine are indicated by coloured dots p.Ser218Leu ●, p.Thr501Met ●, p.Arg583Gln ●, p.Thr666Met ●, p.Tyr1387Cys ● and the novel splice site variant c.2175+9G>A with a thunderbolt ⚡. B) *ATP1A2* gene structure, with black boxes indicating exons. The newly identified mutation p.Glu825Lys causing hemiplegic migraine is indicated by an orange dot ● and p. Ala606Thr with a green dot ●. Detection of the mutations by direct sequencing of PCR products: electropherograms.

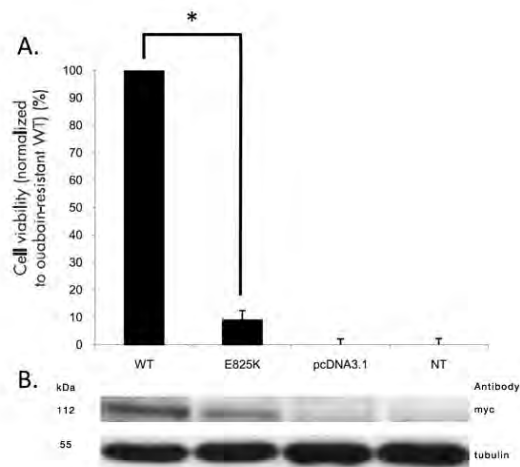




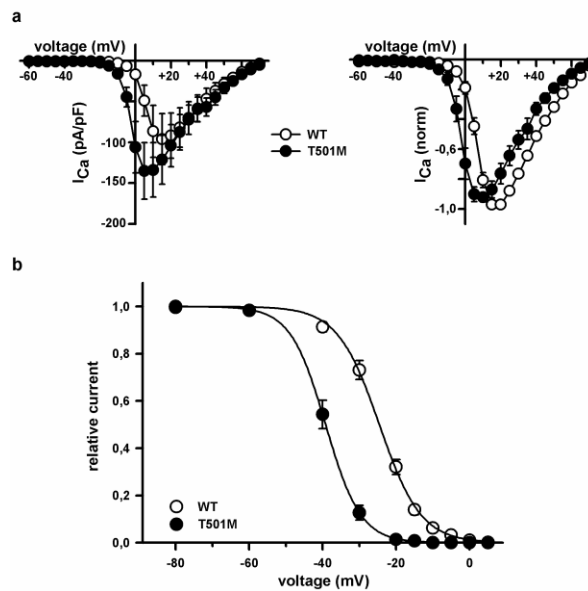
**Figure 3.** Protein alignment performed with ClustalW ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)) (Chenna, et al., 2003). On top, the CACNA1A Thr<sup>501</sup> residue is conserved in all the human calcium channel  $\alpha$ 1 subunits studied (CACNA1A, B, C, D, E, F and S) and in the orthologous CACNA1A proteins of several organisms. Bottom, the ATP1A2 Glu<sup>825</sup> 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).



**Figure 4.** A) Diagram of exon 17 (grey box) and introns 16 and 17 (black line) of the *CACNA1A* gene. The position of the heterozygous variant c.2175+9G>A identified in patient #GBT is indicated with a thunderbolt (⚡) in the vicinity of the 5' splice site (donor) of intron 17. B) Detection of the mutation by direct sequencing: electropherograms of a healthy individual (top) and the patient (bottom). C) Graphic representation of the 5' splice site score obtained for sequences containing the WT and the c.2175+9G>A alleles. The analyzed sequence is reproduced along the X-axis (a circle marks the A allele). The bars correspond to the motif scores for the 5' splice site U2 type (in red) and for the U2 branch site (pink). The height of the bars represents the quality score and the width indicates the length of the motif (nucleotides). Data obtained with ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/index.html>).



**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. B) *Western Blot* assay of the different protein extracts using anti-myc and anti-tubulin antibodies. The molecular weight of the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-ATPase  $\alpha$ 2 subunit and tubulin are indicated. The constructs with the *ATP1A2* ouabain-resistant cDNA carry the myc tag. The clone with the mutation displayed a diminished band intensity.



**Figure 6.** p.Thr501Met affects activation and inactivation properties of heterologously expressed P/Q channels. a) 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. b) 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 s prepulse to -80 mV and fitted by a single Boltzmann function (see Materials and Methods, Equation 2).

**Table 1.** Clinical features of 19 patients with hemiplegic migraine (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.T501M (CACNA1A)
A00_100	F	31	adolescent	-	FHM	Episodic ataxia	Progressive ataxia, cerebellar atrophy	HM, MA, EA2	Spain	p.R583Q (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	-
GBT	M	8	5	Exercise	SHM	MA (basilar-type)	Seizure during a HM attack, ADHD	-	Spain	c.2175+9G>A (CACNA1A)
322B	F	47	<10	-	FHM	MA	Interictal cerebellar signs	HM, interictal nystagmus	Spain	p.T666M (CACNA1A)
336	F	13	3	-	SHM	-	Pyramidal syndrome, visual problems, cerebellar atrophy, psychomotor retardation. Unilateral striatal necrosis.	Migraine	Spain	p.Y1387C (CACNA1A, de novo)
388A	F	15	11	-	FHM	-	-	HM	Spain	-
391A	F	11	5	Stress	SHM	Generalized seizure	Transient left hemisphere edema on MRI	MO	Greece	p.S218L (CACNA1A, de novo)
431	F	42	38	Stress	SHM	-	-	MO	Spain	-
475	F	50	14	-	FHM	-	-	HM	Spain	-
1713	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	-
1310	F	47	15	Stress, strong odors	FHM	Partial epileptic seizures	-	HM	Spain	p.A606T (ATP1A2)
387A	M	10	5	Head injury	FHM	Febrile seizures	Tension-type headache	HM	Greece	p.E825K (ATP1A2)

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

**Table 2.** Hemiplegic migraine patients and disease-causing mutations in the *CACNA1A* and *ATP1A2* genes.

Patient	Gene	Mutation			Position			Detection method	Phenotype	Reported in other patients	Reference
		Protein	cDNA	Exon	Protein domain	Exon	Protein domain				
391A	<i>CACNA1A</i>	p.Ser218Leu	c.653C>T	exon 5	cytoplasmatic, IS4-5		- <i>TaqI</i>	SHM and generalized seizures	HM	(Kors, et al., 2001)	
A03_44	<i>CACNA1A</i>	p.Thr501Met	c.1502C>T	exon 11	transmembrane, S1 DII		SSCP	FHM, progressive ataxia	EA2	(Mantuano, et al., 2010)	
A00_100	<i>CACNA1A</i>	p.Arg583Gln	c.1748G>A	exon 13	transmembrane, S4 DII		- <i>BanII</i>	FHM, EA2, progressive ataxia	HM	(Ducros, et al., 2001)	
322B	<i>CACNA1A</i>	p.Thr666Met	c.1997C>T	exon 17	transmembrane, hairpin loop DII		+ <i>BccI</i>	FHM, MA	HM	(Ophoff, et al., 1996)	
GBT	<i>CACNA1A</i>	splicing?	c.2175+9G>A	intron 17	unknown		- <i>AclI</i>	SHM, MA	no	-	
336	<i>CACNA1A</i>	p.Tyr1387Cys	c.4160A>G	exon 26	transmembrane, S5 DIII		- <i>HaeIII</i>	SHM, cerebellar atrophy, pyramidal syndrome, striatal necrosis	Similar phenotype	(Vahedi, et al., 2000)	
387A	<i>ATP1A2</i>	p.Glu825Lys	c.2473G>A	exon 18	intracellular loop, L6/7		- <i>PvuII</i>	FHM	no	-	
19_1310	<i>ATP1A2</i>	p.Ala606Thr	c.1816G>A	exon 13	cytoplasmatic loop, M4/5		+ <i>HhaI</i>	FHM, partial epileptic seizures	HM	(Riant, et al., 2005)	

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

## **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.



## Formes monogèniques de migranya

### Article 2:

### **Necrosi estriada aguda en migranya hemiplègica amb una mutació *de novo* al gen *CACNA1A*.**

#### **Resum**

Es descriu una nena de 9 anys amb un retard en el desenvolupament primerenc, atàxia crònica i episodis prolongats de migranya hemiplègica causants de deterioració progressiva. El segon dia d'un episodi una ressonància magnètica de difusió revela un senyal unilateral anormal al nucli estriat consistent en un edema citotòxic, que evoluciona a atròfia en escaneigs consecutius. En el cribratge mutacional del gen *CACNA1A* s'identifica la mutació *de novo* p.Tyr1387Cys.

#### **Referència**

Carreño O, García-Silva MT, García-Campos O, Martínez-de Aragón A, Cormand B, Macaya A. Acute striatal necrosis in hemiplegic migraine with *de novo* CACNA1A mutation. **Headache** [en premsa]





## Clinical Note

# Acute Striatal Necrosis in Hemiplegic Migraine With *De Novo* CACNA1A Mutation

Oriel Carreño, BS; María Teresa García-Silva, MD; Óscar García-Campos, MD;  
Ana Martínez-de Aragón, MD; Bru Cormand, PhD; Alfons Macaya, MD, PhD

We report the case of a 9-year-old girl with early-onset developmental delay, chronic ataxia and prolonged hemiplegic migraine episodes bringing about progressive deterioration. Two days into one episode, diffusion-weighted magnetic resonance imaging disclosed unilateral striatal abnormal signal consistent with cytotoxic edema, which evolved into atrophy on follow-up scans. Mutational screen of *CACNA1A* gene identified a *de novo* p.Tyr1387Cys mutation. 4

**Key words:** hemiplegic migraine, striatal necrosis, *CACNA1A*, migraine genetics

**Abbreviations:** ADC apparent diffusion coefficient, DW diffusion-weighted, ESCEATHT early seizures and cerebral edema after trivial head trauma, FHM familial hemiplegic migraine, HM hemiplegic migraine, MRI magnetic resonance imaging, PCR polymerase chain reaction, SHM sporadic hemiplegic migraine

(*Headache* 2011;••:••-••)

From the Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain (O. Carreño and B. Cormand); CIBER Enfermedades Raras, Instituto de Salud Carlos III, Spain (O. Carreño and B. Cormand); Unidad Pediátrica de Enfermedades Raras, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (M.T. García-Silva); Servicio de Neuropediatría, Hospital Virgen de la Salud, Toledo, Spain (O. García-Campos); Servicio de Radiología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid, Spain (A. Martínez-de Aragón); Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Barcelona, Spain (B. Cormand); Grup de Recerca en Neurologia Pediàtrica, Vall d'Hebron Institut de Recerca, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain (A. Macaya).

**Financial support:** Supported by grants from AGAUR (2009SGR0078, 2009SGR0971) and MICINN (SAF2009-1382-C03), Spain. 44

**Address all correspondence to A. Macaya, Department of Neurologia Pediàtrica, Vall d'Hebron Research Institute, Pg Pg Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain.** 45

Accepted for publication July 9, 2011. 46

Familial hemiplegic migraine (FHM; *International Classification of Headache Disorders-II* 1.2.4) is a rare, dominantly inherited variant of migraine with aura featuring motor weakness during the attacks. Additional paroxysmal features include epileptic seizures, dysphasia, and variable impairment of consciousness, whereas chronic neurological dysfunction occurs as a result of progressive cerebellar atrophy. FHM has been linked to mutations in any of 3 genes, *CACNA1A*, *ATPIA2*, and *SCN1A* (reviewed in Pietrobon<sup>1</sup>). Recently, homozygous mutations in *SLC4A4*, encoding a electrogenic Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter, were reported to cause hemiplegic migraine (HM) in addition to proximal renal tubular acidosis.<sup>2</sup> Sporadic hemiplegic migraine (SHM; *International Classification of Headache Disorders-II* 1.2.5), in turn, has been associated with *de novo* 47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60  
61  
62  
63

*Conflict of Interest:* The authors report no conflict of interest

1 mutations in either *CACNA1A* or *ATP1A2*, the  
2 former producing the most severe phenotypes,<sup>3</sup>  
3 although prolonged hemiplegia may also occur with  
4 the latter.<sup>4,5</sup>

5 In SHM, gain-of-function mutations in  
6 *CACNA1A* may produce attacks triggered by fever or  
7 mild head trauma. For one of them, p.Ser218Leu, the  
8 label “early seizures and cerebral edema after trivial  
9 head trauma (ESCEATHHT)” has been used to  
10 designate an early-onset and particularly severe  
11 phenotype.<sup>6</sup> Similar phenotypes have been rarely  
12 reported with the p.Arg1347Glu<sup>7</sup> and p.Tyr1384Cys<sup>8</sup>  
13 *CACNA1A* mutations and at least for 1 mutation,  
14 p.Gly615Arg, in the *ATP1A2* gene.<sup>9</sup> In these severe  
15 HM forms, magnetic resonance imaging (MRI) at the  
16 time of the attack may document cerebral cortical  
17 edema contralateral to the hemiplegia, in keeping  
18 with the presumed cortical spreading depression  
19 mechanism that is hypothesized to underlie the aura.

20 We describe a novel FHM neuroradiological  
21 pattern, featuring acute unilateral involvement of the  
22 striatum, in a patient with developmental delay and  
23 progressive neurological deterioration, who harbored  
24 a *de novo* p.Tyr1387Cys *CACNA1A* mutation.

## 25 CASE REPORT

26 The patient is the only daughter of healthy, unre-  
27 lated parents. Gestation and delivery were unremark-  
28 able. The mother and maternal grandmother suffered  
29 migraineous headaches in their youth, but direct  
30 interview did not disclose any aura symptoms.

31 At age 3, the patient was referred for an assess-  
32 ment for global developmental delay and occasional  
33 episodes during which she remained lethargic and  
34 hypotonic. At that time, examination showed mild  
35 ataxia, clumsiness, and poor language skills. A brain  
36 MRI, including spectroscopy, was normal. However, a  
37 cranial computerized tomography scan at age 5, fol-  
38 lowing minor head trauma with impaired conscious-  
39 ness, revealed cerebellar atrophy. After a viral  
40 infection at age 6, the patient became stuporous and  
41 developed acute left hemianopsia and prolonged left  
42 hemiparesis. After the episode, her cognitive and  
43 motor status had deteriorated. She showed dysarthric  
44 speech, nystagmus, central visual impairment, and  
45 global weakness with both ataxic and pyramidal signs  
46

47 of crural predominance. The patient could walk if  
48 aided or holding onto parallel bars.

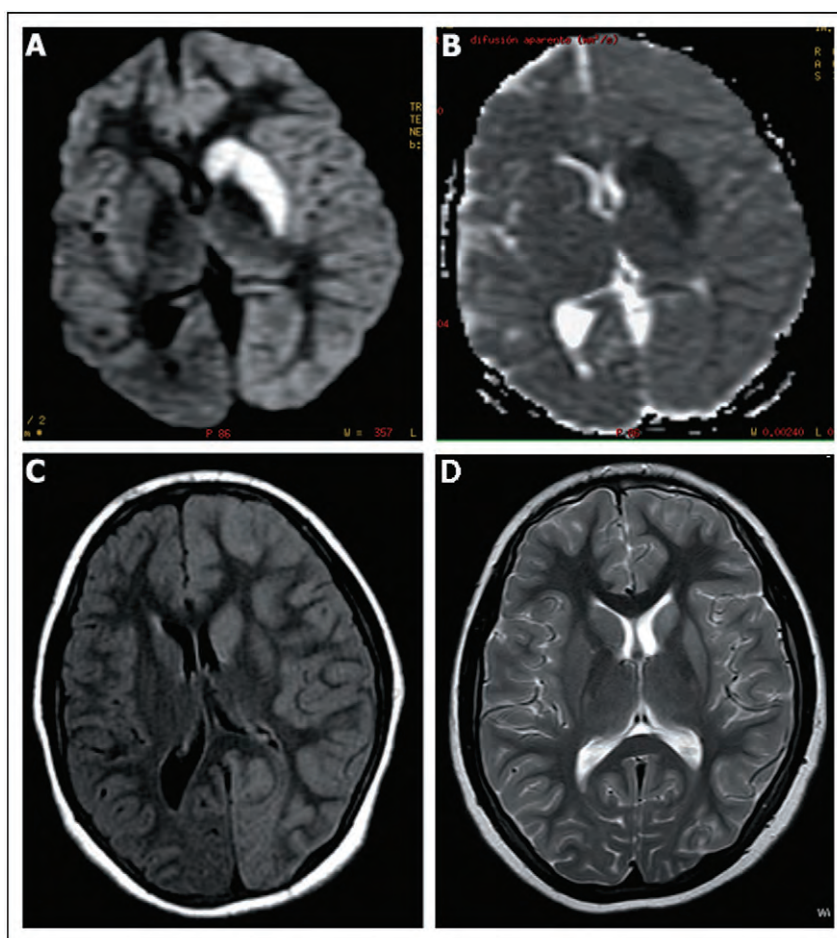
49 At age 9, the patient developed fever, throbbing  
50 headache, obtundation, aphasia and right hemipare-  
51 sis. Diffusion-weighted-MRI on day 2 disclosed  
52 changes suggesting cytotoxic edema in the left neo-  
53 striatum and a swollen overlying cortex (Fig. 1A–C).  
54 The striatal involvement prompted a metabolic  
55 screen, including serum amino acids, lactate and bio-  
56 tinidase, urine organic acids, purines and pyrimidines,  
57 and cerebrospinal investigations, including lactate,  
58 all with normal results. A muscle biopsy revealed  
59 normal histochemistry and respiratory chain enzyme  
60 activities.

61 The patient’s condition has remained unchanged  
62 and her current neurological status at age 12 contin-  
63 ues to show mental retardation, visual deficit, ataxia,  
64 and spastic tetraparesis. Less severe attacks, with  
65 headache and brief hemiplegia, have recurred despite  
66 therapeutic trials with acetazolamide, topiramate  
67 or flunarizine. Follow-up MRI at age 11 revealed  
68 atrophy of the left caudate and putamen (Fig. 1D)  
69 and cerebellar atrophy.

70 Genomic DNA was isolated from peripheral  
71 blood and the 47 exons of the *CACNA1A* gene and  
72 their corresponding exon/intron junctions, including  
73 splice sites and branch points, were polymerase chain  
74 reaction-amplified and sequenced as we previously  
75 described.<sup>10</sup> The c.4160A>G variant (RefSeq  
76 NM\_023035.2) in exon 26 of the gene, leading to a  
77 p.Tyr1387Cys amino acid substitution (RefSeq  
78 NP\_075461.2), was identified in the probandus but  
79 not in her parents (Fig. 2A,B). False paternity was  
80 excluded by genotyping 16 polymorphic microsatel-  
81 lite markers, confirming that the mutation occurred  
82 *de novo* (Fig. 2C). The change was absent in 200 chro-  
83 mosomes from unrelated, healthy Spanish subjects.

## 84 DISCUSSION

85 This is the third instance where a devastating  
86 phenotype is described in association with the  
87 *de novo* p.Tyr1387Cys mutation. The previous  
88 cases (with mutation designated p.Tyr1385Cys or  
89 p.Tyr1384Cys), were a young woman with SHM,  
90 chronic ataxia, and mental retardation, who showed  
91 unilateral cerebral cortical edema on day 7 of an epi-  
92



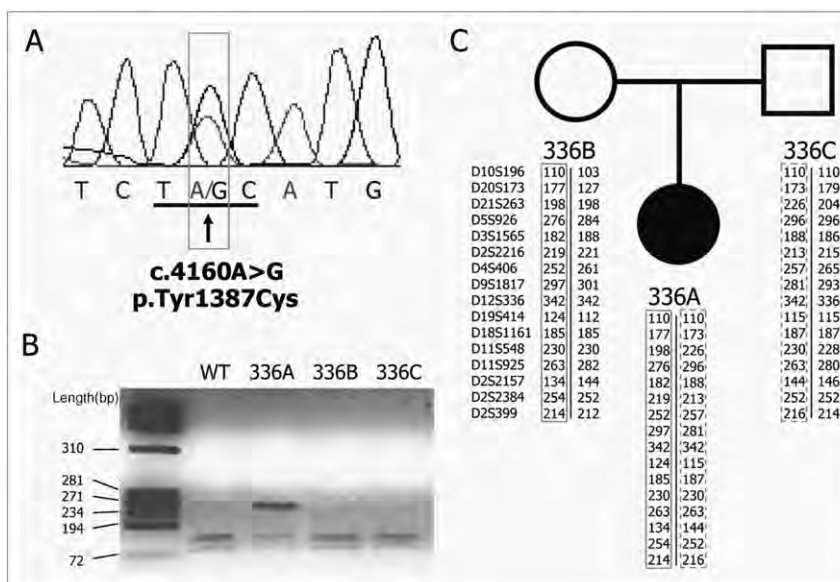
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36

Fig 1.—Neostriatal involvement in hemiplegic migraine. On day 2 of the attack, DW-MRI showing restricted water mobility (A) and corresponding low signal on ADC map (B) in the left striatum, plus ipsilateral gyral hyperintensity on FLAIR-T2 sequence (C). T2-weighted image 2 years later, showing left neostriatal atrophy (D).

sode<sup>8</sup> and a 17-year-old man with cognitive and motor delay, chronic ataxia, and loss of consciousness during the migraine attacks, whose postictal neuroimaging was not reported (case 18 in Riant et al.<sup>3</sup>). Our patient showed, in addition to subtle changes in the ipsilateral cortex, striking unilateral striatal high signal intensity on diffusion-weighted-MRI images and a corresponding low apparent diffusion coefficient values, consistent with cytotoxic edema. That this acute event led to focal necrosis was confirmed by the ipsilateral atrophy found in the follow-up MRI. Striatal necrosis is the hallmark of various metabolic, infectious, toxic, or vascular insults, mitochondrial encephalopathies being one of the most frequent causes in childhood. Altered calcium homeostasis caused by dysfunctional Ca<sub>v</sub>2.1 channels has been shown to severely affect

mitochondrial function, leading to cerebellar granule cell death in the leaner mouse model.<sup>11</sup> Our patient's muscle, however, did not show morphological or biochemical changes to suggest mitochondrial dysfunction.

Although acute basal ganglia involvement has not been recognized in HM, a FHM neuropathological study showed neostriatal cystic and granular infarcts with differing appearances, indicating the existence of long-standing striatal lesions.<sup>12</sup> Recently, a further SHM case carrying the *de novo* p.Arg349Gln *CACNA1A* mutation developed the ESCEATHHT phenotype after presenting with early-onset developmental delay.<sup>13</sup> In this 5-year-old girl, MRI at the time of the attack revealed left-sided cerebral edema, but 7 months later T2-weighted hypersig-



**Fig 2.—**Identification of the *de novo* missense mutation in the *CACNA1A* gene. (A) Sequence analysis of exon 26 in the affected sib (336A). The arrow indicates the heterozygous A-to-G transition at position 4160 of the cDNA (c.4160A>G). (B) Assessment of the presence of the mutation in all the family members by digestion with the *AccI* restriction enzyme: the c.4160A>G mutation abolishes the restriction site in the affected sib (336A). (C) Pedigree and polymorphic microsatellite markers used to rule out false paternity: the father (336C) and the mother (336B) transmit alleles at all studied polymorphic sites (n = 16) to their daughter (336A).

nal was noted over the left striatum. It is conceivable that excitotoxicity, resulting from FHM-increased synaptic glutamate, could target the selectively vulnerable neostriatum.

Of note, psychomotor retardation preceded the onset of migraine episodes in our patient and the others with the p.Tyr1387Cys variant<sup>3,8</sup> and that with the p.Arg349Gln variant,<sup>13</sup> thus suggesting that these *de novo* mutations result in dysfunctional neuronal P/Q calcium channels that may alter neurotransmission or other critical processes during brain development. This is also reflected in the series reported by Riant et al.<sup>3</sup> where 3 out of 8 patients bearing *de novo* *CACNA1A* mutations developed severe mental retardation years before they were diagnosed with SHM.

The clinical features of our patient also raise the issue of the clinical overlap between HM and alternating hemiplegia of childhood (AHC). Although in AHC the attacks of hemiplegia are the harbinger of neurological deterioration, long-term outcome is quite similar to the one seen in our SHM patient. Indeed, intermediate FHM/AHC phenotypes were associated with another *de novo* *CACNA1A* mutation.<sup>14</sup>

## CONCLUSIONS

The severe end of the HM clinical spectrum is characterized by a complex, progressive syndrome featuring developmental delay, prolonged migraine attacks and neurological deterioration. The p.Tyr1387Cys mutation at the *CACNA1A* gene appears as a recurrent cause of this devastating phenotype. The present findings suggest that HM is a diagnostic consideration when evaluating unilateral acute striatal lesions in childhood.

## REFERENCES

- Pietrobon D. Familial hemiplegic migraine. *Neurother.* 2007;4:274-284.
- Suzuki M, Van Paesschen W, Stalmans I, et al. Defective membrane expression of the Na<sup>+</sup>-HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. *PNAS.* 2010;107:15963-15968.
- Riant F, Ducros A, Ploton C, et al. *De novo* mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine. *Neurology.* 2010;75:967-972.

- 1 4. Jen JC, Klein A, Boltshauser E, et al. Prolonged  
2 hemiplegic episodes in children due to mutations  
3 in ATP1A2. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2007;  
4 78:523-526. 24
- 5 5. De Sanctis S, Grieco GS, Breda L, et al. Prolonged  
6 sporadic hemiplegic migraine associated with a  
7 novel de novo missense ATP1A2 gene mutation.  
8 *Headache*. 2011;51:447-450. 25
- 9 6. Stam AH, Luijckx GJ, Poll-Thé BT, et al. Early sei-  
10 zures and cerebral oedema after trivial head trauma  
11 associated with the CACNA1A S218L mutation. *J*  
12 *Neurol Neurosurg Psychiatry*. 2009;80:1125-1129. 26
- 13 7. Stam AH, Vanmolkot KRJ, Kremer HPH, et al.  
14 CACNA1A R1347Q: A frequent recurrent mutation  
15 in hemiplegic migraine. *Clin Genet*. 2008;74:481-485. 27
- 16 8. Vahedi K, Denier C, Ducros A, et al. CACNA1A  
17 gene de novo mutation causing hemiplegic migraine,  
18 coma, and cerebellar atrophy. *Neurology*. 2000;55:  
19 1040-1042. 28
- 20 9. Vanmolkot KR, Stroink H, Koenderink JB, et al.  
21 Severe episodic neurological deficits and permanent  
22 mental retardation in a child with a novel FHM2  
23 ATP1A2 mutation. *Ann Neurol*. 2006;59:310-314. 29
- 30 10. Cuenca-León E, Corominas R, Fernández-Castillo  
31 N, et al. Genetic analysis of 27 Spanish patients  
32 with hemiplegic migraine, basilar-type migraine and  
33 childhood periodic syndromes. *Cephalalgia*. 2008;  
34 28:1039-1047. 30
- 35 11. Bawa B, Abbott LC. Analysis of calcium ion homeo-  
36 stasis and mitochondrial function in cerebellar  
37 granule cells of adult CaV 2.1 calcium ion channel  
38 mutant mice. *Neurotox Res*. 2008;13:1-18. 31
- 39 12. Neligan P, Harriman DG, Pearce J. Respiratory  
40 arrest in familial hemiplegic migraine: A clinical and  
41 neuropathological study. *Br Med J*. 1977;2:732-734. 32
- 42 13. Malpas TJ, Riant F, Tournier-Lasserre E, et al.  
43 Sporadic hemiplegic migraine and delayed cerebral  
44 oedema after minor head trauma: A novel de novo  
CACNA1A gene mutation. *Dev Med Child Neurol*.  
2010;52:103-104. 33
- de Vries B, Stam AH, Beker F, et al. CACNA1A  
mutation linking hemiplegic migraine and alter-  
nating hemiplegia of childhood. *Cephalalgia*.  
2008;28:887-891. 34



## Formes monogèniques de migranya

### Article 3:

**Una mutació al primer llaç intracel·lular del canal CACNA1A evita la modulació per proteïnes SNARE i disminueix l'exocitosi.**

### Resum

Les mutacions responsables de migranya hemiplègica familiar (FHM) en el gen que codifica la subunitat  $\alpha_{1A}$  del canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipus P/Q (*CACNA1A*) estan situades a les regions del porus i el sensor de voltatge i normalment comporten un guany de funció del canal. Hem identificat una mutació al primer llaç intracel·lular de la proteïna CACNA1A ( $\alpha_{1A(A454T)}$ ) que no causa FHM però que està associada a l'absència de símptomes sensorials i motors en una família amb migranya amb aura. Els canals  $\alpha_{1A(A454T)}$  mostren una regulació debilitada de la inactivació per subunitats  $\text{Ca}_v\beta$  en estat estacionari dependent de voltatge. La mutació A454T suprimeix la modulació de la sintaxina 1A o SNAP-25 sobre el canal P/Q i disminueix l'exocitosi. Els nostres resultats revelen la importància de la integritat estructural del llaç I-II en la interacció funcional dels canals P/Q amb proteïnes de la maquinària d'acoblament i fusió de vesícules sinàptiques, i també que la variació genètica en el canal CACNA1A pot ser no només causa de la migranya, sinó també moduladora del fenotip.

### Referència

Serra SA, Cuenca-León E, Llobet A, Rubio-Moscardó F, Plata C, Carreño O, Fernández-Castillo N, Corominas R, Valverde MA, Macaya A, Cormand B, Fernández-Fernández JM. 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* 107:1672-7, 2010.





# A mutation in the first intracellular loop of CACNA1A prevents P/Q channel modulation by SNARE proteins and lowers exocytosis

Selma A. Serra<sup>a</sup>, Ester Cuenca-León<sup>b</sup>, Artur Llobet<sup>c</sup>, Francisca Rubio-Moscardo<sup>a</sup>, Cristina Plata<sup>a</sup>, Oriol Carreño<sup>d</sup>, Noèlia Fernández-Castillo<sup>d</sup>, Roser Corominas<sup>b,d</sup>, Miguel A. Valverde<sup>a</sup>, Alfons Macaya<sup>b</sup>, Bru Cormand<sup>d</sup>, and José M. Fernández-Fernández<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Laboratory of Molecular Physiology and Channelopathies, Department of Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, 08003 Barcelona, Spain; <sup>b</sup>Grup de Recerca en Neurologia Infantil, Hospital Universitari Vall d'Hebron, 08035 Barcelona, Spain; <sup>c</sup>Laboratori de Neurobiologia, Bellvitge Institute for Biomedical Research (IDIBELL)-Centro de Investigación Biomédica en Red Enfermedades Neurodegenerativas (CIBERNED), L'Hospitalet de Llobregat, 08907 Barcelona, Spain; and <sup>d</sup>Departament de Genètica, Universitat de Barcelona, Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Raras, Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona, 08028 Barcelona, Spain

Edited by Ramón Latorre, Centro de Neurociencias, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile, and approved December 11, 2009 (received for review July 24, 2009)

**Familial hemiplegic migraine (FHM)-causing mutations in the gene encoding the P/Q Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_{1A}$  subunit (CACNA1A) locate to the pore and voltage sensor regions and normally involve gain-of-channel function. We now report on a mutation identified in the first intracellular loop of CACNA1A ( $\alpha_{1A(A454T)}$ ) that does not cause FHM but is associated with the absence of sensorimotor symptoms in a migraine with aura pedigree.  $\alpha_{1A(A454T)}$  channels showed weakened regulation of voltage-dependent steady-state inactivation by Ca<sub>v</sub> $\beta$  subunits. More interestingly, A454T mutation suppressed P/Q channel modulation by syntaxin 1A or SNAP-25 and decreased exocytosis. Our findings reveal the importance of I-II loop structural integrity in the functional interaction between P/Q channel and proteins of the vesicle-docking/fusion machinery, and that genetic variation in CACNA1A may be not only a cause but also a modifier of migraine phenotype.**

Ca<sub>v</sub> 2.1 (P/Q) channels | SNARE proteins | migraine with aura

Familial hemiplegic migraine (FHM) is an autosomal dominantly inherited subtype of migraine with aura that features some degree of hemiparesis during attacks (1, 2). The generally accepted view on migraine pathophysiology points to cortical spreading depression (CSD), an abnormal increase of cortical activity—followed by a long-lasting neuronal suppression wave—that propagates across the cortex, as the cause of the aura and migraine itself (1, 3). FHM-causing mutations have been reported in the *CACNA1A* gene (encoding the P/Q Ca<sup>2+</sup> channel  $\alpha_1$  subunit) (4), resulting in a gain of P/Q channel function, mainly due to a reduction in the voltage threshold of channel activation favoring CSD initiation and propagation (1, 5–11). Other genetic and environmental factors may also play a role in shaping the phenotype, as identical mutations show different clinical characteristics (2).

The P/Q Ca<sup>2+</sup> channel contains a pore-forming  $\alpha_{1A}$  subunit and several regulatory subunits, including intracellular  $\beta$  subunits (Ca<sub>v</sub> $\beta_{1-4}$ ) that bind to the intracellular loop between transmembrane domains I and II of  $\alpha_{1A}$  (see Fig. 1B for an illustration of the channel complex). The effect of the regulatory subunits is essential for increasing the expression levels and modulating the voltage-dependent activation and inactivation of P/Q channels (12–15).

Presynaptic proteins of the vesicle-docking/fusion machinery, including plasma membrane SNARE proteins (syntaxin 1A and SNAP-25) and synaptotagmin, bind to a specific site (synprint) in the large intracellular loop connecting domains II and III of the P/Q channel  $\alpha_{1A}$  subunit (Fig. 1B). This interaction allows secretory vesicles docking to the plasma membrane near the pathway for Ca<sup>2+</sup> entry, optimizing neurotransmitter release.

Syntaxin 1A and SNAP-25 also exert an inhibitory effect on P/Q channel activity by left-shifting the voltage dependence of steady-state inactivation (12, 16, 17). The synprint site serves an important anchoring function that may facilitate SNARE's modulation of channel gating, but the involvement of other still-unknown sites has been proposed (18). Disruption of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channel-SNAREs interaction compromises vesicle exocytosis (19–22), as well as the inhibitory modulation of P/Q channels (23).

We next describe a CACNA1A mutation (A454T) that disturbs the functional interaction between SNAREs and the pore-forming  $\alpha_{1A}$  subunit, resulting in mutant P/Q channels that are less efficiently coupled to secretion. This mutation, identified in a Spanish migraineur family, was not responsible for the disease but segregated with a different migraine phenotype lacking sensorimotor symptoms in their aura.

## Results

**Clinical and Genetic Spectrum of a Spanish Migraine Pedigree.** Clinical analysis of the pedigree classified affected individuals as migraine with aura (MA) of the familial hemiplegic type (FHM), fulfilling all of the International Headache Society (IHS-II) criteria (II.3, II.5, III.2), nonhemiplegic MA displaying combinations of visual and sensory symptoms that include tongue and facial paresthesia (visual + sensory; II.6, III.1) and MA without sensorimotor—tongue/facial paresthesia or hemiplegia—symptoms (visual; I.2, II.1; Fig. 1A). Linkage analysis (and selected gene sequencing) of 11 polymorphic markers located within or flanking the four genes (*ATPIA2*, *SCN1A*, *SLC1A3*, and *CACNA1A*) previously involved in monogenic forms of migraine (1, 24) failed in the identification of the genetic cause of migraine in this pedigree (see Fig. S1A and SI Methods for details). However, we isolated a missense variation in exon 11 (c.1360G>A; Fig. S1C) of the *CACNA1A* gene (GenBank accession no. NM\_001127221) in patients I.2 and II.1, which is not present in the rest of the probands nor in 300 chromosomes from unrelated Spanish nonmigraineurs. Genetic and clinical analysis suggested that 1360G>A mutation, resulting in an alanine-to-threonine

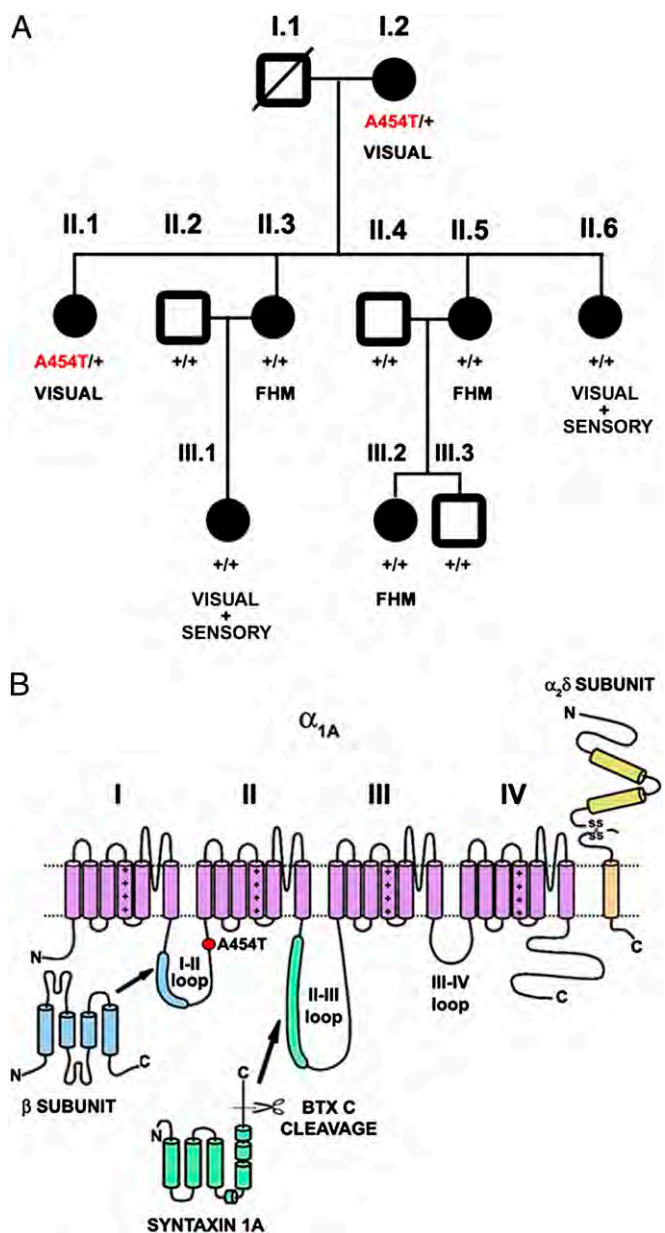
Author contributions: S.A.S., E.C.-L., A.L., M.A.V., A.M., B.C., and J.M.F.-F. designed research; S.A.S., E.C.-L., A.L., F.R.-M., C.P., and J.M.F.-F. performed research; S.A.S., F.R.-M., C.P., O.C., and N.F.-C. contributed new reagents/analytic tools; S.A.S., E.C.-L., A.L., R.C., and J.M.F.-F. analyzed data; and M.A.V., A.M., B.C., and J.M.F.-F. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

This article is a PNAS Direct Submission.

<sup>1</sup>To whom correspondence should be addressed. E-mail: jmanuel.fernandez@upf.edu.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0908359107/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0908359107/DCSupplemental).

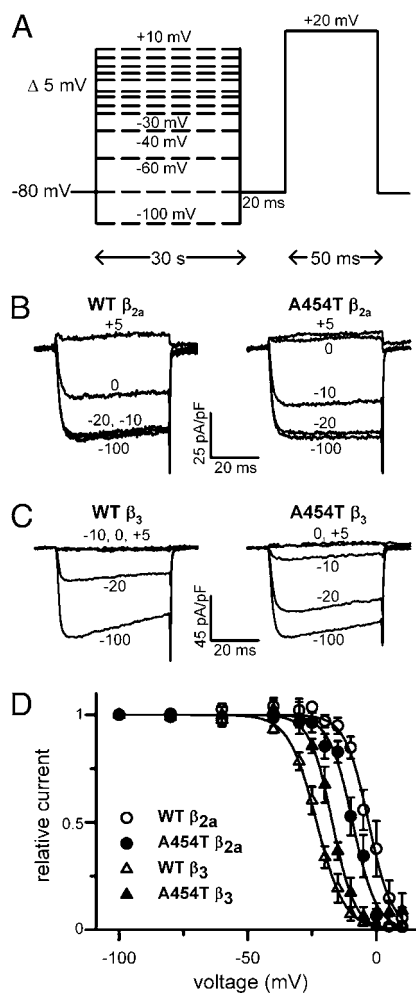


**Fig. 1.** Pedigree segregating the A454T mutation and protein location of the amino acid change. (A) Clinical and *CACNA1A* genetic characterization of a three-generation migraine with aura pedigree. Affected individuals are denoted by solid symbols (squares indicate male family members; circles, female family members; symbols with a slash, members who had died). The type of aura experienced is indicated below. (B) Location of the alanine-to-threonine mutation at position 454 (A454T) in the I-II intracellular loop of the P/Q channel  $\alpha_{1A}$  subunit.

mutation at the highly conserved position 454 (A454T; Fig. 1B and Fig. S1B), was not the cause of migraine in the family under study. Instead, it appeared to modify the disease phenotype, because A454T carriers are the only migraineurs of the pedigree lacking tongue/ facial paresthesic or hemiplegic symptoms. Therefore, we set up to analyze whether A454T *CACNA1A* mutation had any consequence on P/Q channel function.

**Activation and Inactivation Properties of A454T Mutant P/Q Channels.** Wild-type (WT) and mutant A454T  $\alpha_{1A}$  ( $\alpha_{1A(A454T)}$ ) rabbit subunits, together with accessory rat  $\text{Ca}_v\beta$  and rabbit  $\alpha_2\delta$  subunits, were expressed in HEK 293 cells and analyzed using the

standard whole-cell patch-clamp technique. Mutation A454T had no effect on current density, activation parameters, deactivation and inactivation kinetics, and rate of recovery from inactivation of heterologously expressed P/Q channels (see Fig. S2 and *SI Methods* for details). The voltage dependence of inactivation was studied in WT and A454T P/Q channels. As expected (15), the voltage at which 50% of channels were inactivated ( $V_{1/2, \text{inact}}$ ) shifted to more depolarized potentials for  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ -containing than for  $\text{Ca}_v\beta_3$ -containing WT P/Q channels ( $-3.05 \pm 0.64$  mV,  $n = 11$  and  $-23.19 \pm 0.45$  mV,  $n = 10$ , respectively;  $P < 0.001$ ) without changes in steepness (Fig. 2B–D). A454T mutation produced a  $\sim 6$  mV hyperpolarizing shift on  $V_{1/2, \text{inact}}$  of channels containing  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$  ( $-9.23 \pm 0.58$  mV,  $n = 14$ ;  $P < 0.001$  vs. WT) and a  $\sim 6$  mV depolarizing shift on  $\text{Ca}_v\beta_3$ -containing channels ( $-17.09 \pm 0.55$  mV,  $n = 9$ ;  $P < 0.001$  vs. WT). Differences between A454T channels containing  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$  or  $\text{Ca}_v\beta_3$  subunits were still significant ( $P < 0.001$ ). No changes were found in the slope factors for voltage-dependent inactivation between WT and A454T channels (Fig. 2D). These findings suggest that mutation A454T uncouples the effect of  $\text{Ca}_v\beta$



**Fig. 2.** A454T lessens modulation of P/Q channel activity by  $\text{Ca}_v\beta$  subunits. Steady-state inactivation was studied with the voltage protocol shown (A). Typical traces obtained from cells expressing WT or A454T P/Q channels including either the  $\beta_{2a}$  (B) or the  $\beta_3$  subunit (C). (D) Steady-state inactivation curves. WT $\beta_{2a}$  (O,  $n = 11$ ); A454T $\beta_{2a}$  (●,  $n = 14$ ); WT $\beta_3$  ( $\Delta$ ,  $n = 10$ ), and A454T $\beta_3$  ( $\blacktriangle$ ,  $n = 9$ ). Average  $k_{\text{inact}}$  for all four channel combinations were between  $-4.38$  and  $-5.42$  mV and did not differ statistically (ANOVA,  $P = 0.55$ ).

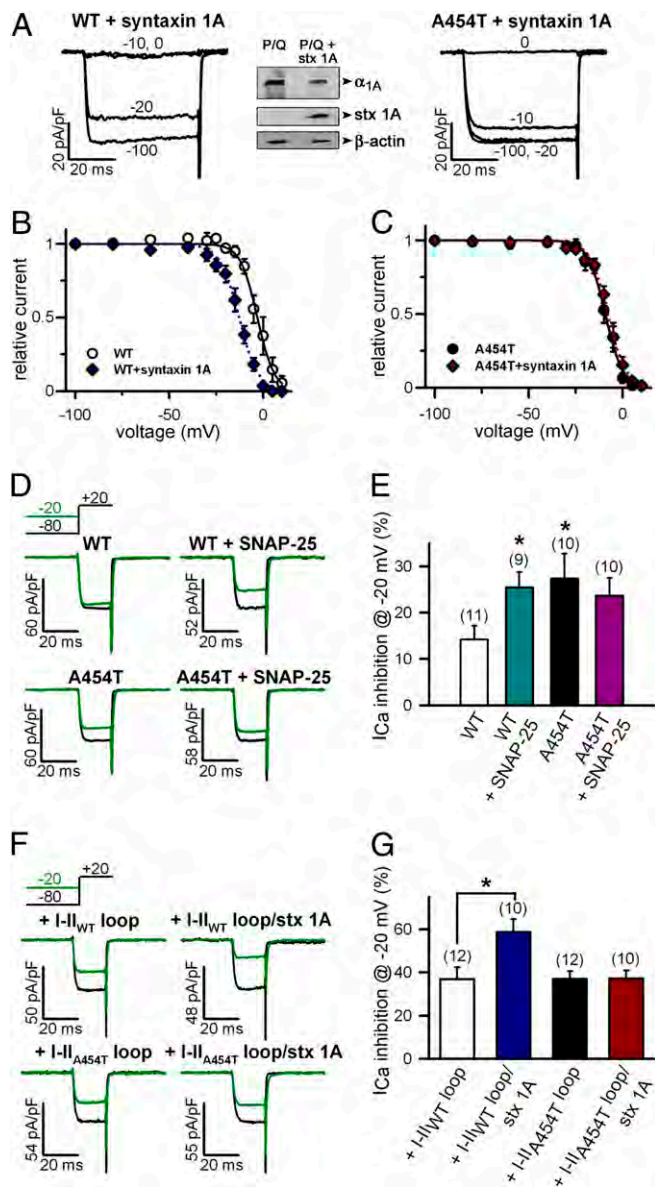
subunits on the voltage dependence of steady-state inactivation, placing the inactivation curves closer to the expected values for P/Q channels lacking regulatory  $\text{Ca}_v\beta_s$ . We could not evaluate whether A454T affects  $V_{1/2, \text{inact}}$  in the absence of  $\text{Ca}_v\beta_s$ , because P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  currents were negligible (Fig. S3).

**A454T Affects Channel Regulation by Plasma Membrane SNAREs.**

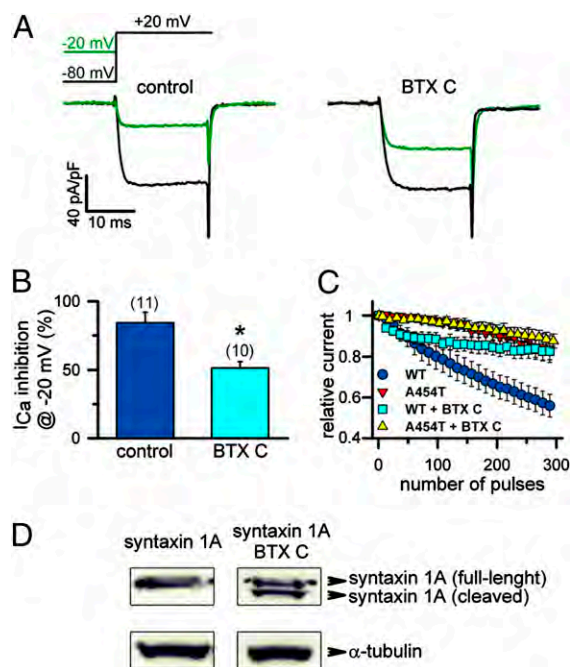
Syntaxin 1A expression induced a significant  $\sim 10$  mV left shift in the  $V_{1/2, \text{inact}}$  of WT channels (Fig. 3 A and B;  $P < 0.001$ ), whereas  $V_{1/2, \text{inact}}$  was not altered by syntaxin 1A in A454T channels (Fig. 3 A and C;  $P = 0.12$ ). Similarly, SNAP-25 promoted voltage-dependent inhibition of WT P/Q channels, as indicated by a significant ( $P < 0.05$ ) decrease in the test pulse current following a prepulse to  $-20$  mV, but had no effect on A454T P/Q channels (Fig. 3 D and E). Note that as A454T left-shifts the  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ -mediated steady-state inactivation, mutant channels showed higher inactivation than WT channels following a prepulse to  $-20$  mV. Interestingly, the negative shift in the voltage-dependent steady-state inactivation induced by syntaxin 1A on WT P/Q channels was prevented by coexpression of the A454T but not WT I-II loop (Fig. 3 F and G). It is also worth noting the increased steady-state inactivation observed in the absence of syntaxin 1A regardless of the loop expressed (compared with the white bar of Fig. 3E), consistent with a functional uncoupling of  $\text{Ca}_v\beta$  subunits due to binding competition with the I-II loops.

We also evaluated A454T P/Q channels in mouse pheochromocytoma cells (MPC 9/3L-AH) that present little or no endogenous voltage-gated  $\text{Ca}^{2+}$  current but contain vesicles and proteins involved in vesicle fusion, including syntaxin 1A and SNAP-25 (25). Electrophysiological properties of WT and A454T P/Q channels expressed in MPC 9/3L-AH cells were similar to those observed in HEK 293 cells in the presence of the  $\text{Ca}_v\beta_3$  subunit, most probably due to preferred association of  $\alpha_{1A}$  subunits with MPC endogenous  $\text{Ca}_v\beta_3$  or  $\beta_1$  rather than with expressed  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$  subunits (Fig. S4). Cleavage of syntaxin 1A by expressing botulinum toxin C (BTX C) (26) in MPC 9/3L-AH cells induced a significant increase in the test pulse current of WT P/Q channels following a prepulse to  $-20$  mV (Fig. 4 A and B) or after stimulation with a train of short (2 ms) depolarizations at 200 Hz for 1.5 s (Fig. 4C). As previously reported by Zhong et al. (17) using this protocol, current remaining at the end of the train showed steady-state inactivation. In the case of MPC 9/3L-AH cells expressing WT P/Q channels, inactivation reached a  $44.7 \pm 5.5\%$  ( $n = 9$ ) or  $17.8 \pm 4.7\%$  ( $n = 5$ ) in the absence or presence of BTX C, respectively ( $P < 0.01$ ). Expression of the neurotoxin had no significant effect on A454T channel inactivation; current remaining for A454T P/Q channels at the end of the train was inactivated by  $17.9 \pm 6.7\%$  ( $n = 6$ ) or  $11.9 \pm 3.6\%$  ( $n = 5$ ) in the absence or presence of BTX C, respectively (Fig. 4C). Cleavage of syntaxin 1A by BTX C was tested in HEK 293 cells overexpressing both proteins (Fig. 4D). These findings indicate that endogenous MPC syntaxin 1A can modulate the activity of heterologously expressed WT but not A454T P/Q channels, in agreement with the data obtained from HEK 293 cells (see Fig. 3).

**A454T Reduces Exocytosis.** MPC 9/3L-AH cells transiently transfected with rabbit  $\alpha_{1A\text{WT}}$  or  $\alpha_{1A\text{A454T}}$  showed similar P/Q currents (Fig. 5A) and  $\text{Ca}^{2+}$  charge density (calculated by integrating the area under the current traces and normalizing by cell size; Fig. 5D) following stimulation with a train of five depolarizations. Despite similar  $\text{Ca}^{2+}$  entry, MPC 9/3L-AH cells expressing A454T channels showed reduced exocytosis (evaluated by measuring membrane capacitance changes; Fig. 5B and E). The gaps in the capacitance recordings represent stimulation times. The induced changes in capacitance are indicative of vesicle fusion and catecholamine release, because depolarizing stimulus triggered amperometric events from MPC 9/3L-AH



**Fig. 3.** A454T prevents modulation of P/Q channel activity by syntaxin 1A and SNAP-25. (A) Representative current traces from cells expressing WT (Left) or A454T (Right) P/Q channels in the presence of syntaxin 1A (to compare in the absence of syntaxin 1A see Fig. 2B). Western blot of plasma membrane proteins obtained from HEK 293 cells transfected with CFP- $\alpha_{1A}$ ,  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ , and  $\alpha_2\delta$  P/Q channel subunits in the absence or presence of syntaxin 1A and probed with anti-GFP, syntaxin 1A, and  $\beta$ -actin antibodies. Heterologous expression of P/Q channel subunits does not induce the expression of endogenous syntaxin 1A. Methodological details can be found in *SI Methods*. (B and C) Steady-state inactivation curves.  $V_{1/2, \text{inact}}$  and  $k_{\text{inact}}$  values were (in mV): WT ( $\circ$ ,  $n = 11$ )  $-3 \pm 0.6$  and  $-4.5 \pm 0.5$ ; WT + syntaxin 1A ( $\blacklozenge$ ,  $n = 22$ )  $-12.8 \pm 0.5$  and  $-5.1 \pm 0.4$ ; A454T ( $\bullet$ ,  $n = 14$ )  $-9.2 \pm 0.5$  and  $-4.6 \pm 0.5$ ; A454T + syntaxin 1A ( $\blacklozenge$ ,  $n = 15$ )  $-7.8 \pm 0.5$  and  $-4.8 \pm 0.5$ . (D) Inhibition of WT and A454T P/Q channels alone (Left) or coexpressed with SNAP-25 (Right) evoked by a 20-ms test pulse to  $+20$  mV following a 30-s prepulse to  $-80$  mV (black trace) or  $-20$  mV (green trace). (E) Average percentage  $I_{\text{Ca}}$  inhibition of WT and A454T P/Q channels in the absence or presence of SNAP-25.  $\text{Ca}^{2+}$  currents obtained as indicated in D were normalized to the current following the  $-80$  mV prepulse.  $*P < 0.05$  vs. WT. (F) Representative current traces from HEK 293 cells expressing WT P/Q channels coexpressed with WT (I-II<sub>WT</sub> loop) or A454T (I-II<sub>A454T</sub> loop) intracellular subunits connecting domains I and II in the absence or presence of syntaxin 1A (stx 1A).  $\text{Ca}^{2+}$  currents were evoked by a 20-ms test pulse to  $+20$  mV following a 30-s prepulse to  $-80$  mV (black trace) or  $-20$  mV (green trace). (G) Average percentage of WT P/Q  $I_{\text{Ca}}$  inhibition obtained under the experimental conditions shown in F ( $*P < 0.01$ ).



**Fig. 4.** Mutation A454T prevents P/Q channel regulation by MPC endogenous syntaxin 1A. (A) Inhibition of WT P/Q channels alone (Left, control) or coexpressed with BTX C (Right) in mouse pheochromocytoma (MPC 9/3L-AH) cells, evaluated as described in Fig. 3. (B) Average percentage  $I_{Ca}$  inhibition for WT P/Q channels expressed alone (control) or with BTX C in MPC 9/3L-AH cells.  $Ca^{2+}$  currents were normalized to the current following the  $-80$ -mV prepulse. \* $P < 0.01$ . (C) Average current evoked by every 10th pulse of a 200-Hz train of 2-ms depolarizations from  $-80$  mV to  $+20$  mV, normalized to the current evoked by the first pulse of the train, obtained from MPC 9/3L-AH cells expressing WT or A454T P/Q channels alone or coexpressed with BTX C, as indicated. (D) Western blot of cell lysates obtained from HEK 293 cells expressing syntaxin 1A alone or with botulinum toxin C (BTX C) and probed with anti-syntaxin 1A and  $\alpha$ -tubulin antibodies. Full-length and cleaved syntaxin 1A are detected in the presence of BTX C. Methodological details can be found in *SI Methods*.

cells expressing P/Q channels loaded with dopamine (Fig. 5C). At intermediate intracellular calcium buffering (1 mM EGTA), expression of rabbit  $\alpha_{1A(A454T)}$  subunit significantly reduced secretion efficiency, estimated by normalizing capacitance changes by  $Ca^{2+}$  charge density (as exocytosis is a steep function of  $Ca^{2+}$  influx). Such reduction was patent from the first depolarizing pulse, which mainly mobilized those vesicles located physically closer to release sites, i.e., vesicles defining the readily releasable pool (RRP), suggesting that A454T uncouples P/Q channels from secretory vesicles (Fig. 5E). Previous studies have shown that disruption of the interaction between voltage-gated calcium channels and SNARE proteins by a synprint peptide make less probable synaptic transmission by shifting its  $Ca^{2+}$  dependence to higher values (20). Therefore, we evaluated the effect of A454T on secretion efficiency under different calcium buffering conditions. This maneuver impacts the magnitude of cytoplasmic  $Ca^{2+}$  domains and modifies the amount of vesicles capable of sensing such  $Ca^{2+}$  signals, depending on its proximity to the calcium entry pathway (20, 27). As expected, secretion efficiency was inversely proportional to EGTA concentration (Fig. 5E). Addition of an excess of exogenous calcium buffer (5 mM EGTA) to the cytoplasm, which restricts calcium signals, reduced the secretion evoked by a train of stimuli in both  $\alpha_{1AWT}$ - and  $\alpha_{1A(A454T)}$ -expressing cells (Fig. 5E), whereas a decrease in cytosolic EGTA (0.1 mM) rescued the effect of the A454T mutation on exocytosis (Fig. 5E).

Finally, a similar decrease in the efficiency of P/Q channel coupling to exocytosis at intermediate intracellular calcium buffering (1 mM EGTA) was observed when introducing the A454T mutation in the human  $\alpha_{1A}$  subunit (Fig. 5F and G and Fig. S5).

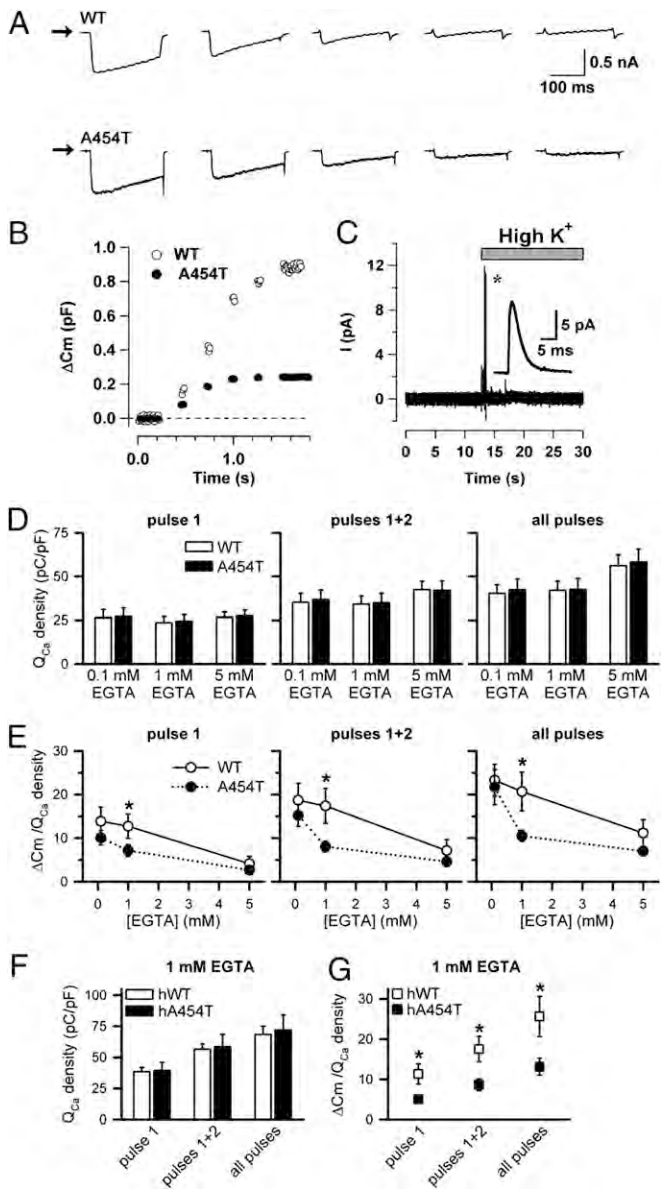
## Discussion

The A454T mutation was initially considered a polymorphic variant with a frequency of 0.02 (4), and more recently has been associated to early onset progressive ataxia (28). However, none of the two A454T carriers included in our study presented cerebellar symptoms despite their advanced ages (72 and 49 years). A454T does not cosegregate with migraine in our pedigree, but the two A454T migraineurs display a milder migraine phenotype with visual aura only and no sensorimotor symptoms. This clinical observation, together with the fact that the mutation was not present in 300 control chromosomes and involved a highly conserved amino acid within an important regulatory domain of the channel (the I-II intracellular loop of CACNA1A) prompted us to evaluate the impact of the A454T mutation on P/Q channel activity.

A454T P/Q channel presents a disrupted regulation of the voltage dependence of steady-state channel inactivation by auxiliary  $Ca_v\beta$  subunits. Voltage-dependent inactivation of  $Ca^{2+}$  channels is an important physiological mechanism that contributes to the short-term depression of neurosecretion (29, 30), but its contribution to migraine pathophysiology remains to be solved (5–8, 10, 11). Current density, inactivation kinetics, and voltage dependence of channel activation remained unaltered, suggesting that the effect of A454T mutation on steady-state channel inactivation is not due to the removal of  $Ca_v\beta$  binding to the  $\alpha_{1A}$  subunit (also supported by the fact that overexpression of either WT or A454T I-II loops antagonized the effect of  $Ca_v\beta_{2a}$  on channel activity). Instead, it may be explained by a structural alteration of the I-II loop due to the A454T mutation that affects the intramolecular transduction by which  $Ca_v\beta$ - $\alpha_{1A}$  interaction modulates channel inactivation. Although it has been suggested that alterations in the kinetics and voltage dependence of steady-state inactivation are linked (31), a report examining FHM-causing CACNA1A mutations has already shown that both parameters change independently (8).

Our data also suggests that A454T impairs the interaction between plasma membrane SNARE proteins (syntaxin 1A and SNAP-25) and P/Q channels. This is based on (i) loss of SNARE-dependent modulation of channel steady-state inactivation, (ii) removal of P/Q channel regulation by syntaxin 1A following expression *in trans* of the A454T but not WT I-II loop, and (iii) reduction in secretion efficiency of A454T P/Q channel.

Docking of the vesicle-releasing machinery to the source of  $Ca^{2+}$  in the presynaptic membrane is critical for the high efficiency of neurotransmitter release. SNARE proteins have a key role in this process by positioning docked vesicles near calcium entry channels (19–22) and by recruiting synaptic vesicles to presynaptic  $Ca^{2+}$  channel clusters during repetitive or long-lasting depolarizations (32). Although the molecular mechanisms underlying these processes are not unequivocally demonstrated, it has been postulated that SNARE proteins participate via their binding to the channel  $\alpha_1$  subunit (12, 18). Accordingly, impairment of the SNARE proteins interaction with calcium channels reduces the efficiency of synaptic transmission (19–22). A454T induces a  $\sim 49\%$  reduction in secretion following a depolarizing train, although a significant  $\sim 44\%$  decrease was already detected from the first pulse, thereby supporting the view that A454T-expressing cells present mislocalization of synaptic vesicles near  $Ca^{2+}$  channels. The magnitude of the fall in exocytosis induced by the A454T mutation is very close to that reported for a partial deletion of the synprint site that interferes in the interaction between SNAREs and voltage-gated N-type  $Ca^{2+}$  channel expressed in MPC 9/3L-AH cells (21). The mere removal of the inhibitory action of SNAREs on channel gating by the A454T



**Fig. 5.** Mutation A454T decreases secretion efficiency. (A) Currents from two MPC 9/3L-AH cells expressing either WT (*Upper*) or A454T channels (*Lower*) in response to a train of five successive 200-ms depolarizing voltage steps to +20 mV delivered at 20 Hz. Arrows indicate the 0 current level. (B) Capacitance traces, plotted as a function of time, from the same cells showed in A. WT (○) and A454T (●) P/Q-expressing cells were stimulated at 20 Hz as described. (C) Amperometric recording from a MPC 9/3L-AH cell loaded with dopamine during the application of a local puff of a depolarizing high-K<sup>+</sup> solution. Note the synchronous release of dopamine after the onset of the stimulus. (*Inset*) Higher time-scale resolution of the amperometric spike indicated with an asterisk. (D) Averaged data for Ca<sup>2+</sup> influx normalized by the whole-cell capacitance [Q<sub>Ca</sub> density (pC/pF)] elicited by the first depolarizing pulse, the first two depolarizing pulses, and all five depolarizing pulses (as indicated) under three different intracellular Ca<sup>2+</sup>-buffering conditions in WT (EGTA 0.1 mM, n = 8; EGTA 1 mM, n = 21; EGTA 5 mM, n = 7) and A454T MPC 9/3L-AH transfected cells (EGTA 0.1 mM, n = 10; EGTA 1 mM, n = 21; EGTA 5 mM, n = 7). (E) Exocytosis [ΔCm (fF)] normalized as a function of Ca<sup>2+</sup> entry [Q<sub>Ca</sub> density (pC/pF)] corresponding to the conditions described in D. \*P < 0.05. (F) Averaged data for Ca<sup>2+</sup> influx normalized by cell size [Q<sub>Ca</sub> density (pC/pF)] elicited by the first depolarizing pulse, the first two depolarizing pulses, and all five depolarizing pulses (as indicated) under intermediate intracellular Ca<sup>2+</sup>-buffering conditions (1 mM EGTA) in MPC 9/3L-AH cells transfected with either the human WT (hWT, n = 12) or human A454T (hA454T, n = 7) P/Q channel. (G) Exocytosis [ΔCm (fF)] normalized as a function of Ca<sup>2+</sup> entry [Q<sub>Ca</sub> density (pC/pF)] corresponding to the conditions described in F. \*P < 0.05.

mutation would not explain the reduced vesicle secretion (22). Also supporting the vesicle mislocalization hypothesis with A454T channels is our observation that the secretory response of α<sub>1A</sub>(A454T)-expressing cells is rescued when the intracellular concentration of EGTA is lowered, which increases Ca<sup>2+</sup> diffusion and promotes the release of vesicles away from the Ca<sup>2+</sup> entry pathway. Efficient secretion with A454T P/Q channels is shifted to higher Ca<sup>2+</sup> levels, an effect also reported for the action of a synprint peptide on synaptic release through the uncoupling of N-type calcium channels and SNARE proteins (20). However, the fact that the secretory response of cells expressing mutant A454T P/Q channels show lower sensitivity when increasing EGTA from 1 mM to 5 mM is inconsistent with the interpretation that the mutation disrupts the localization of synaptic vesicles near Ca<sup>2+</sup> channels. For this interpretation to be adequate we should expect a larger relative reduction of secretion in α<sub>1A</sub>(A454T)-expressing cells when increasing EGTA concentration to 5 mM, because an excess of calcium buffer impairs the buildup of intracellular Ca<sup>2+</sup> domains and will mainly reduce the fusion of those vesicles not linked to Ca<sup>2+</sup> channels. Therefore, we cannot discard the possibility that the mutation somehow would alter the sensitivity of the calcium sensor in the exocytotic machinery, without affecting vesicle localization. Moreover, as the negative effect of A454T mutation on exocytosis depends on cytosolic Ca<sup>2+</sup>-buffering conditions, its impact might vary at different synapses because presynaptic calcium microdomains can be modified by the particular endogenous calcium buffers (33), which differ from neuron to neuron.

The mechanisms underlying the effects of A454T could be explained by a modification in the structure of the I-II loop. This may spoil the three-dimensional arrangement of CACNA1A intracellular domains, which, in turn, alters the interaction pattern between α<sub>1A</sub> cytoplasmic domains (34). This is a unique description of a naturally occurring mutation that affects one of the most important specializations of the P/Q Ca<sup>2+</sup> channel: the modulation of exocytosis in concert with presynaptic SNARE proteins (22, 32). Our data highlights the importance of I-II loop structural integrity in the functional interaction of P/Q channel with proteins of the SNARE complex to maintain an optimal synaptic transmission. This observation agrees with recent reports that view cross-talks between cytosolic regions of α<sub>1A</sub> as important processes in channel function (14, 34), and supports the idea that regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels by SNARE proteins require the integrity of channel domains additional to the synprint (18).

In conclusion, three main points relevant to the molecular physiology and pathology of P/Q channel can be drawn from our study: (i) A454T-induced misregulation involves changes in voltage dependence of steady-state inactivation. The functional relevance of these changes builds up during and after high-frequency neuronal firing, such as those occurring during CSD in migraine patients (1, 35), although by now it is difficult to establish a correlation between these changes and the observed clinical phenotype in A454T carriers. (ii) The impairment of functional interaction between syntaxin 1A/SNAP-25 and A454T P/Q channels highlights the relevance of the I-II loop as an integrator of channel regulatory mechanisms that also include SNARE proteins. The negative effect of the mutation on P/Q channel coupling to secretion might result in decreased CSD propagation. This may be particularly relevant in sensorimotor cortical areas where CSD triggering is more reluctant than in the occipital visual area (36), thus explaining the absence of sensorimotor aura in A454T carriers. Furthermore, because CACNA1A genetic variations associated to ataxia involve loss of channel function (37), the reduced secretion efficiency of A454T P/Q channels may lie beneath the development of cerebellar symptoms in some patients (28). (iii) Finding how this mutation integrates into the physiology of native P/Q channel expressing neurons, as well as the confirmation of the putative effect of A454T preventing sensorimotor auras in larger migraine pedi-

greens, is essential to consider *CACNA1A* not only a disease-causing but a modifier gene as well.

## Methods

**DNA Constructs and Site-Directed Mutagenesis.** Rabbit  $\alpha_{1A}$  ( $Ca_v2.1$ ) and  $\alpha_{2\delta}$ ; rat  $Ca_v\beta_{2a}$ ,  $Ca_v\beta_3$ , and syntaxin 1A were all subcloned into pcDNA3 expression vector. Rabbit WT  $\alpha_{1A}$  was also subcloned into pcDNA3-NCFP vector, 3' from the fluorescent tag, between 5' BamHI and 3' XhoI restriction enzyme sites. Human SNAP-25 was cloned into pEGFP-C3 and botulinum toxin C (BTX C) into pIRES expression vector. The A454T mutation was introduced into rabbit  $\alpha_{1A}$  cDNA using the QuikChange Site-Directed Mutagenesis XL kit (Stratagene), forward (5'-GGGGTCTCCCTTACCCGAGCCAGCATTAA-3') and a reverse (5'-TTAATGCTGGCTGGGTAAGGGAGACCCC-3') primers. *CACNA1A* I-II intracellular loop was amplified by PCR (forward primer 5'-CGGAATTCGCCAC-CATGGGGGAGTTTGCCAAAGAAAG-3' and reverse primer 5'-CCGCTCGAGC-TAGGCTGAGTTTGACCATG-3') from rabbit WT and A454T pcDNA3- $\alpha_{1A}$  and cloned into pcDNA3 using 5' EcoRI and 3' XhoI restriction sites. Human  $\alpha_{1A}$  was originally cloned into pCMV vector, and mutation A454T was introduced by site-directed mutagenesis (GenScript Corp.). All cDNA clones used in this study were sequenced in full to confirm their integrity.

**Heterologous Expression, Electrophysiology, Capacitance, and Amperometric Measurements.** HEK 293 cells were transfected using polyethylenimine ExGen500 (Fermentas Inc.) per the manufacturer's instructions. Rabbit  $\alpha_{1AWT}$  OR  $\alpha_{1A(A454T)}$  constructs were coexpressed with rat  $Ca_v\beta$  subunits ( $\beta_{2a}$  or  $\beta_3$ ), rabbit  $\alpha_{2\delta}$ , and EGFP as a transfection marker, using the ratio for  $\alpha_{1A}$ ,  $Ca_v\beta$ ,  $\alpha_{2\delta}$ , and EGFP of 1:1:0.3. In some experiments, syntaxin 1A, SNAP-25, I-II WT loop, I-II A454T loop, and/or BTX C were also transfected at least at the same ratio as P/Q channel subunit cDNAs. MPC cell line 9/3L-AH was transfected using Lipofectamine Plus (Invitrogen) at the same constructs ratio applied for HEK 293 patch-clamp experiments. Recordings were done 48–72 h after transfection.

Whole-cell P/Q calcium currents ( $I_{Ca}$ ) were measured using pipettes (2–3 M $\Omega$ ) filled with a solution containing (in mM): 13 CsCl, 120 caesium acetate, 2.5 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, 1 EGTA, 4 Na<sub>2</sub>ATP, and 0.1 Na<sub>3</sub>GTP (pH 7.2–7.3 and 295–300 mosmoles/l). The external solution contained (in mM): 140 NaCl, 3 KCl,

2.5 CaCl<sub>2</sub>, 1.2 MgCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, and 10 glucose (pH 7.3–7.4 and 300–305 mosmoles/l) for HEK 293 cells, and 140 tetraethylammonium-Cl, 5 CaCl<sub>2</sub>, 10 Hepes, and 10 glucose (pH 7.3; 300 mosmol/L) for MPC 9/3L-AH cells. Full details about electrophysiology protocols are provided in *SI Methods*.

Capacitance measurements were performed using an EPC-9 patch-clamp amplifier (HEKA Electronics, Lambrecht/Pfalz, Germany) using the "sine + dc" software lock-in amplifier method implemented in PULSE software. Further details are provided in *SI Methods*.

Amperometric recordings were carried out on MPC 9/3L-AH cells loaded with dopamine triggered to secrete by local puffing of a high-K<sup>+</sup> extracellular solution. Further details are provided in *SI Methods*.

All experiments were carried out at room temperature (22–24 °C).

**Statistics.** Data are presented as the means  $\pm$  SEM. Statistical tests included Student's *t* test, ANOVA, followed by a Bonferroni post hoc test or non-parametric ANOVA (Kruskal–Wallis test), followed by a Dunn post hoc test, as appropriate. Differences were considered significant if *P* < 0.05.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank Dr. Birnbaumer (National Institutes of Health) for providing P/Q channel cDNAs, Dr. Blasi (Universitat de Barcelona) for providing syntaxin 1A and botulinum toxin C cDNAs, Dr. Criado (Universidad Miguel Hernández) for providing SNAP-25 cDNA, Dr. J. Striessnig (University of Innsbruck) for the gift of human *CACNA1A* cDNA, and Dr. Harkins for making available the MPC cell line 9/3L-AH. Dr. Marfany and Dr. Fandos are acknowledged for helpful suggestions on the DNA cloning experiments. We thank Dr. Fernandes for her help in preliminary electrophysiological studies and M. Elias for assistance in the amperometric recordings. The work was funded by Fundació la Marató de TV3 (061331 and 061330), the Spanish Ministry of Education and Science (SAF2006-13893-C02-02, SAF2006-13893-C02-01, SAF2009-13182-C03-02, SAF2009-13182-C03-01, SAF2009-13182-C03-03, SAF2003-04704, SAF2006-04973, and SAF2009-09848), Fondo de Investigación Sanitaria (red HERACLES RD06/0009, Red Española de Ataxias G03/056, PI05/2129, and PI05/1050), and Generalitat de Catalunya (SGR05-848, SGR05-266, 2009SGR1369, 2009SGR971 and 2009SGR78). M.A.V. is the recipient of an ICREA Academia Award (Generalitat de Catalunya).

- Pietrobon D (2007) Familial hemiplegic migraine. *Neurotherapeutics* 4:274–284.
- Ducros A, 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.
- Bolay H, et al. (2002) Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model. *Nat Med* 8:136–142.
- Ophoff RA, et al. (1996) Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell* 87:543–552.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Glossmann H, Hering S, Striessnig J (1998) Familial hemiplegic migraine mutations change  $\alpha_{1A}$  Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem* 273:5586–5590.
- Hans M, et al. (1999) Functional consequences of mutations in the human  $\alpha_{1A}$  calcium channel subunit linked to familial hemiplegic migraine. *J Neurosci* 19:1610–1619.
- Kraus RL, et al. (2000) Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel kinetics. *J Biol Chem* 275:9239–9243.
- Müllner C, Broos LA, van den Maagdenberg AM, Striessnig J (2004) Familial hemiplegic migraine type 1 mutations K1336E, W1684R, and V1696I alter Ca<sub>v</sub>2.1 Ca<sup>2+</sup> channel gating: Evidence for  $\beta$ -subunit isoform-specific effects. *J Biol Chem* 279:51844–51850.
- van den Maagdenberg AM, et al. (2004) A *Cacna1a* knockin migraine mouse model with increased susceptibility to cortical spreading depression. *Neuron* 41:701–710.
- Tottene A, et al. (2005) Specific kinetic alterations of human Ca<sub>v</sub>2.1 calcium channels produced by mutation S218L causing familial hemiplegic migraine and delayed cerebral edema and coma after minor head trauma. *J Biol Chem* 280:17678–17686.
- Serra SA, et al. (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.
- Catterall WA (2000) Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annu Rev Cell Dev Biol* 16:521–555.
- Jones SW (2002) Calcium channels: When is a subunit not a subunit? *J Physiol* 545:334.
- Stotz SC, Jarvis SE, Zamponi GW (2004) Functional roles of cytoplasmic loops and pore lining transmembrane helices in the voltage-dependent inactivation of HVA calcium channels. *J Physiol* 554:263–273.
- Birnbaumer L, et al. (1998) Structures and functions of calcium channel  $\beta$  subunits. *J Bioenerg Biomembr* 30:357–375.
- Bezprozvanny I, Scheller RH, Tsien RW (1995) Functional impact of syntaxin on gating of N-type and Q-type calcium channels. *Nature* 378:623–626.
- Zhong H, Yokoyama CT, Scheuer T, Catterall WA (1999) Reciprocal regulation of P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channels by SNAP-25, syntaxin and synaptotagmin. *Nat Neurosci* 2:939–941.
- Bezprozvanny I, Zhong P, Scheller RH, Tsien RW (2000) Molecular determinants of the functional interaction between syntaxin and N-type Ca<sup>2+</sup> channel gating. *Proc Natl Acad Sci USA* 97:13943–13948.
- Mochida S, Sheng Z-H, Baker C, Kobayashi H, Catterall WA (1996) Inhibition of neurotransmission by peptides containing the synaptic protein interaction site of N-type Ca<sup>2+</sup> channels. *Neuron* 17:781–788.
- Rettig J, et al. (1997) Alteration of Ca<sup>2+</sup> dependence of neurotransmitter release by disruption of Ca<sup>2+</sup> channel/syntaxin interaction. *J Neurosci* 17:6647–6656.
- Harkins AB, Cahill AL, Powers JF, Tischler AS, Fox AP (2004) Deletion of the synaptic protein interaction site of the N-type (Ca<sub>v</sub>2.2) calcium channel inhibits secretion in mouse pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15219–15224.
- Keith RK, Poage RE, Yokoyama CT, Catterall WA, Meriney SD (2007) Bidirectional modulation of transmitter release by calcium channel/syntaxin interactions *in vivo*. *J Neurosci* 27:265–269.
- Bergsmann JB, Tsien RW (2000) Syntaxin modulation of calcium channels in cortical synaptosomes as revealed by botulinum toxin C1. *J Neurosci* 20:4368–4378.
- Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD, Baloh RW (2005) Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures. *Neurology* 65:529–534.
- Harkins AB, Cahill AL, Powers JF, Tischler AS, Fox AP (2003) Expression of recombinant calcium channels support secretion in a mouse pheochromocytoma cell line. *J Neurophysiol* 90:2325–2333.
- Schiavo G, Shone CC, Bennett MK, Scheller RH, Montecucco C (1995) Botulinum neurotoxin type C cleaves a single Lys-Ala bond within the carboxyl-terminal region of syntaxins. *J Biol Chem* 270:10566–10570.
- Moser T, Neher E (1997) Rapid exocytosis in single chromaffin cells recorded from mouse adrenal slices. *J Neurosci* 17:2314–2323.
- Cricchi F, et al. (2007) Early-onset progressive ataxia associated with the first CACNA1A mutation identified within the I-II loop. *J Neurosci* 25:69–71.
- Branchaw JL, Banks MJ, Jackson MB (1997) Ca<sup>2+</sup>- and voltage-dependent inactivation of Ca<sup>2+</sup> channels in nerve terminals of the neurohypophysis. *J Neurosci* 17:5772–5781.
- Forsythe ID, Tsujimoto T, Barnes-Davies M, Cuttle MF, Takahashi T (1998) Inactivation of presynaptic calcium current contributes to synaptic depression at a fast central synapse. *Neuron* 20:797–807.
- Sandoz G, et al. (2004) Repositioning of charged I-II loop amino acid residues within the electric field by  $\beta$  subunit as a novel working hypothesis for the control of fast P/Q calcium channel inactivation. *Eur J Neurosci* 19:1759–1772.
- Wadel K, Neher E, Sakaba T (2007) The coupling between synaptic vesicles and Ca<sup>2+</sup> channels determines fast neurotransmitter release. *Neuron* 53:563–575.
- Neher E, Sakaba T (2008) Multiple roles of calcium ions in the regulation of neurotransmitter release. *Neuron* 59:861–872.
- Geib S, et al. (2002) The interaction between the I-II loop and the III-IV loop of Ca<sub>v</sub>2.1 contributes to voltage-dependent inactivation in a  $\beta$ -dependent manner. *J Biol Chem* 277:10003–10013.
- Black DF (2006) Sporadic and familial hemiplegic migraine: Diagnosis and treatment. *Semin Neurol* 26:208–216.
- Lauritzen M (1994) Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory. *Brain* 117:199–210.
- Ducros A, Tournier-Lasserre E, Bousser MG (2002) The genetics of migraine. *Lancet Neurol* 1:285–293.

# Supporting Information

10.1073/pnas.0908359107

## SI Methods

**Subjects.** This study includes a three-generation dominant migraine family referred to Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona. Seven affected and three healthy individuals were directly interviewed and examined by one of the authors (A.M.), following the guidelines of the International Classification of Headache Disorders of the International Headache Society (1). For the genetic studies, the recruited control individuals and their first-degree relatives lacked any history of recurrent or disabling headache.

**Linkage Analysis.** Genomic DNA was isolated from consenting subjects, 10 family members, and 150 healthy unrelated individuals using the QIAamp DNA Blood Maxi Kit (QIAGEN) (approved by Universitat de Barcelona's Ethical Committee following the Helsinki Declaration). Eight microsatellite markers (synthesized using sequence data from the GDB (<http://www.gdb.org/>) and CEPH (<http://www.cephb.fr/>) databases) flanking the *CACNA1A* (D19S586, D19S1165, D19S714), *ATPIA2* (D1S3466, D1S1595, D1S1677) and *SLC1A3* (D5S426, D5S418) genes, and three SNPs (rs8191987, rs994399, rs1542484) located within the *SCN1A* gene were genotyped in all of the available family members to test potential linkage of migraine to these loci. The genetic distances (in cM) between the markers are according to the Marshfield map (available at <http://www.marshfieldclinic.org/research/pages/index.aspx>). The haplotypes were constructed manually by assuming the minimum number of recombinations (Fig. S1).

PCR reactions were performed under the following conditions: 50 ng genomic DNA, 0.2 mM dNTPs, 2.5 pmol each primer, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems), and 1× PCR Gold buffer in a final volume of 25 μL. Amplification conditions were 10 min at 94 °C, 35 cycles with 1 min at 94 °C, 1 min at 56 °C, 1 min at 72 °C, and a final extension step of 10 min at 72 °C. For the microsatellite markers, the PCR products were separated on a 6% acrylamide/bisacrylamide 19:1 gel and visualized by silver staining (2). For the SNPs, we performed direct sequencing of the PCR products, following the procedure indicated below.

**Mutation Analysis.** *SCN1A* and *SLC1A3* were not considered disease-causing genes in this pedigree because several hemiplegic patients did not share the same haplotype. Analysis of markers flanking the *ATPIA2* gene indicated that all of the affected individuals shared at least part of the genomic segment including the gene. The analysis of markers around the *CACNA1A* gene showed that individual I.2 transmitted the same combination of alleles to probands II.3, II.5, II.6, III.1, and III.2 (all displaying FHM or MA with tongue/ facial paresthesia), and a different combination of alleles was passed to proband II.1 who, like her mother, presents MA without sensorimotor symptoms. Accordingly, the 47 exons of the *CACNA1A* gene and the 23 exons of the *ATPIA2* gene and their corresponding exon/intron junctions, including splice sites and branch points, were PCR amplified (following a standard procedure similar to that describe previously) and sequenced from individual II.5 (hemiplegic migraine) and a healthy individual in 42 and 16 independent PCR products, respectively. The coding region of the *CACNA1A* gene was sequenced also in individual II.1 (migraine with visual aura). The PCR products were column purified using the GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (Amersham Pharmacia Biotech), sequenced from either the forward or the

reverse PCR primer using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1 (Applied Biosystems), purified with Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) using MultiScreen Plates (Millipore), and run in an ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Applied Biosystems). Sequence chromatograms were inspected manually and analyzed with the SeqMan v3.6 software (DNASTAR, Inc).

*CACNA1A* gene mutation (c.1360G > A; A454T) was confirmed by sequencing reverse DNA strand and HphI restriction analysis of exon 11 PCR product. Restriction analysis was also used to check for the presence of the mutation in all of the members of the pedigree and in a group of 150 unrelated healthy Spanish individuals. The mutation identified was named according to Human Genome Variation Society guidelines (<http://www.hgvs.org/>) using RefSeq entry NM\_001127221 as a cDNA reference sequence, with nucleotide 237A (ATG) corresponding to +1, and NP\_001120693 as the protein reference sequence. Both sequences correspond to the *CACNA1A* transcript variant 3.

**Voltage Protocols and Fittings.** Recordings were obtained with a D-6100 Darmstadt amplifier (List Medical) filtered at 1 kHz [only for short (ms) pulses] and corrected for leak and capacitive currents using the leak subtraction procedure (P/8 for short pulses and P/4 for long pulses). Currents were acquired at 33 kHz (for short pulses) or 5 kHz (for long pulses). Series-resistance compensation ≥80% was employed. The pClamp8 software (Axon Instruments) was used for pulse generation, data acquisition, and subsequent analysis.

Peak inward Ca<sup>2+</sup> currents were measured from cells clamped at –80 mV and pulsed for 20 ms from –60 mV to +70 mV in 5-mV steps. The following modified Boltzmann equation (Eq. 1) was fitted to normalized current voltage (I–V) to obtain the voltage dependence of activation

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

where  $I$  is the peak current,  $G_{\max}$  is the maximum conductance of the cell,  $V$  is the membrane potential,  $V_{\text{rev}}$  is the extrapolated reversal potential of  $I_{\text{Ca}}$ ,  $V_{1/2, \text{act}}$  is the voltage for half-maximal current activation, and  $k_{\text{act}}$  is the slope factor of the Boltzmann term.

Time constant for activation ( $\tau_{\text{act}}$ ), deactivation ( $\tau_{\text{deact}}$ ), and inactivation ( $\tau_{\text{inact}}$ ) were obtained from single exponential fits of  $I_{\text{Ca}}$  activation phase, tail currents obtained with 20-ms prepulse to +20 mV (to maximally open the voltage-gated P/Q channels) and followed by test pulses between –80 mV and +10 mV (in 5 mV steps) for 30 ms, and the inactivation phase of  $I_{\text{Ca}}$  during a 3-s pulse from a holding potential of –80 mV to a test potential of +20 mV, respectively.

Time course of  $I_{\text{Ca}}$  recovery from inactivation ( $\tau_{\text{recovery}}$ ) was tested, applying a second pulse of 50 ms to +20 mV at increasing time intervals (1–106 s) after the inactivating prepulse. Normalized peak  $I_{\text{Ca}}$  at different times was fitted to a single exponential.

Voltage dependence of steady-state inactivation was estimated by measuring peak  $I_{\text{Ca}}$  currents at +20 mV following 30-s steps to various holding potentials (from –100 to +10 mV;). During the time interval between test pulses (20 ms), cells were held at –80 mV.  $I_{\text{Ca}}$  was normalized to maximal  $I_{\text{Ca}}$  and half-maximal voltage ( $V_{1/2, \text{inact}}$ ), and slope factor for steady-state inactivation ( $k_{\text{inact}}$ ) was obtained by fitting the data to the following Boltzmann equation (Eq. 2):

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

Alternatively, voltage dependence of steady-state inactivation was evaluated from a 20-ms test pulse to +20 mV following a 30-s prepulse to -80 mV or -20 mV (currents were normalized to the current following the -80 mV prepulse) or by the application of a 200-Hz train of 2-ms depolarizations from -80 mV to +20 mV (in this case, currents were normalized to the current evoked by the first pulse of the train).

**Capacitance and Amperometric Measurements.** Capacitance measurements were performed using an EPC-9 patch-clamp amplifier (HEKA Electronics) using the "sine + dc" software lock-in amplifier method implemented in PULSE software. The pipette solution was similar to that indicated for  $I_{\text{Ca}}$  records, and in some experiments the  $\text{Ca}^{2+}$  buffering was changed to 0.1 or 5 mM EGTA to modify the magnitude of  $\text{Ca}^{2+}$  microdomains. Cells were held at -80 mV except during membrane depolarization. The assumed reversal potential was 0 mV, and the sinusoid had an amplitude of 25 mV and a frequency of 1 kHz. The stimulation protocol was a train of five-step depolarizations to +20 mV for 200 ms delivered at 20 Hz, as reported previously (3). Single-pulse current data were leak subtracted by hyperpolarizing sweeps.

Amperometric recordings were carried out on MPC 9/3L-AH cells triggered to secrete by local puffing of a modified extracellular solution, where 50 mM KCl replaced equimolarly TEACl. Cells were loaded with 70 mM dopamine, following a 3-h incubation period at 37 °C before the start of the experiment. The onset of the stimulus was recorded digitally via a TTL signal delivered by the electrovalve system (Harvard Apparatus). The carbon fiber electrodes, prepared from 10- $\mu\text{m}$  diameter fibers as described previously (4), were held at 700 mV over the bath Ag/AgCl electrode by an Axoptach-200B (Molecular Devices) and pressed against the cell membrane. Currents were filtered at 5 kHz bandwidth and acquired using Strathclyde Electrophysiology Data Recorder (EDR) software (provided by John Dempster, University of Strathclyde, Strathclyde, UK; [http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page.php?page=software\\_ses](http://spider.science.strath.ac.uk/sipbs/page.php?page=software_ses)). Analysis was performed using Igor Pro software version 6.0 (Wavemetrics).

**Membrane Protein Extraction.** Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice, detached with PBS solution, and centrifuged at  $335 \times g$  for 5 min. Cell pellets were homogenized in 20 mM Tris-HCl (pH 7.4), 140 mM NaCl, and 5 mM EDTA and centrifuged twice for 10 min at  $1,000 \times g$ . The supernatant was then transferred to polyallomer tubes and centrifuged at  $100,000 \times g$  for 30 min. The membrane fraction obtained in the pellet was solubilized in 25 mM Hepes, 150 mM NaCl, 1% CHAPS. All steps were carried out on ice, and all buffers contained protease inhibitors.

**Total Protein Extraction.** Forty-eight hours after transfection, cells were washed twice with PBS solution, and whole-cell extracts were obtained by resuspension with cell scraper in BNP40 lysis buffer [50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 150 mM NaCl, 0.5% Nonidet P-40, 1 mM DTT, 5 mM EDTA, 0.1 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 0.1 mM PMSF, 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  aprotinin, 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  leupeptin, 10 mM  $\beta$ -glycerolphosphate, 10 mM NaF] containing 1 $\times$  Complete Mini inhibitor mixture (Roche). Cell extracts were vigorously vortexed for 15 min at 4 °C and centrifuged at  $18,000 \times g$  for 30 min at 4 °C.

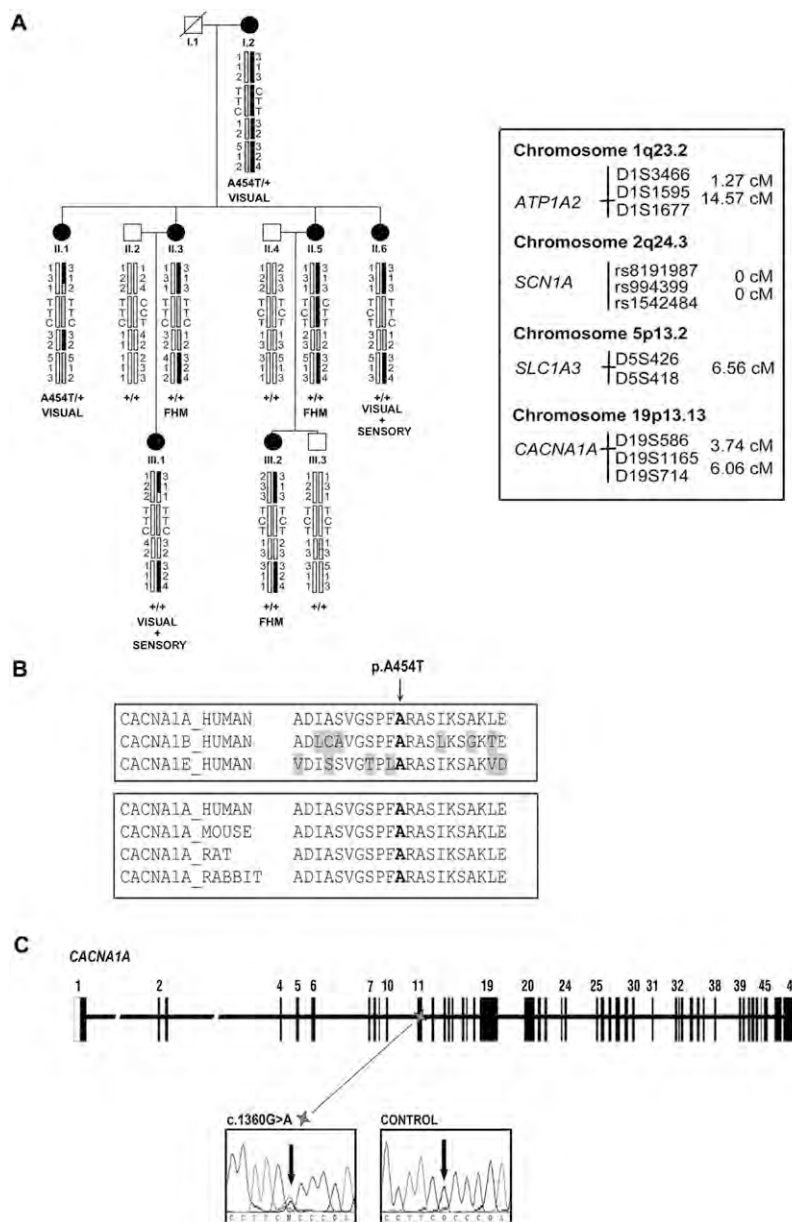
**Western Blotting.** One hundred micrograms of total protein or 20  $\mu\text{g}$  of membrane protein were electrophoresed in NuPAGE Novex 3–8% Tris-Acetate precast gels (Invitrogen) or 8% Tris-glycine gels, respectively, and transferred onto nitrocellulose membranes using the iBlot Dry Blotting System (Invitrogen). Membranes were blocked for 1 h at room temperature in TTBS [100 mM Tris-HCl (pH 7.5) 150 mM NaCl, 0.1% Tween 20] containing 5% skim milk powder (blocking solution). The appropriate primary and secondary antibodies (see below) were incubated in blocking solution overnight at 4 °C or 1 h at room temperature, respectively. Membranes were subjected to chemiluminescence analysis using SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate (Pierce Biotechnology) and detected on Curix RP2 Plus films (Agfa). Primary antibodies (concentration, source, and supplier) include anti-syntaxin (1:2,000, mouse monoclonal; Sigma), anti-GFP/CFP (1:500, mouse monoclonal; Clontech), and anti- $\alpha$ -tubulin/ $\beta$ -actin (1:3,000, mouse monoclonal; Sigma). Anti-mouse and rabbit IgG secondary antibodies (Amersham Biosciences) from a sheep and donkey source, respectively, were used at 1:2,000 dilution.

**RNA Extraction, RT-PCR, and Semiquantitative PCR.** Total RNA from mouse cerebellum and MPC cells was extracted using Nucleospin RNA II Kit (Macherey-Nagel) following manufacturer's instructions. RT-PCR was performed with 1  $\mu\text{g}$  of total RNA using random primers (Promega) by the SuperScript Reverse Transcriptase System (Invitrogen). Semiquantitative PCR analyses of the four different beta subunits were conducted using the following primer pairs: for *Cacnb1* (Gene ID: 12295, NCBI Gene database), forward 5'-TCAAAGGTCAGACGGGAGT-3' and reverse 5'-GTTTGGTCTTGGCTTCTCG-3'; for *Cacnb2a* (Gene ID: 12296, NCBI Gene database), forward 5'-GATGGAAGCA-CATCGTCAGA-3' and reverse 5'-TTTTTCCAACCTGTGCCT-GTG-3'; for *Cacnb3* (Gene ID: 12297, NCBI Gene database), forward 5'-ACTGTGGGGTTCTGGATGAG-3' and reverse 5'-GGCCTTCTGTTCTGTTTGA-3'; and for *Cacnb4* (Gene ID: 12298, NCBI Gene database), forward 5'-CAGGAACATT-CCGAGCAACT-3' and reverse 5'-CAAAGAGGGCTTTCTGCATC-3'. PCR conditions were 94 °C for 5 min; 94 °C for 30 s; 60 °C for 30 s; 72 °C for 30 s; and 72 °C for 7 min, with 35 cycles of amplification. The PCR-derived cDNAs were analyzed by agarose gel electrophoresis, and the identity of the product was confirmed by sequencing.

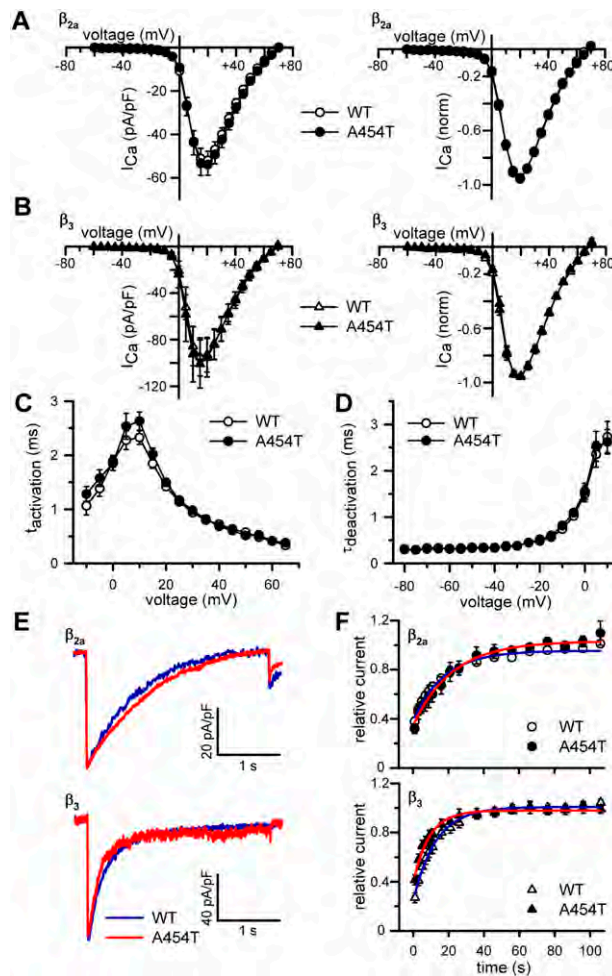
- Lipton RB, Bigal ME, Steiner TJ, Silberstein SD, Olesen J (2004) Classification of primary headaches. *Neurology* 63:427–435.
- Chabás A, et al. (1996) Neuronopathic and non-neuronopathic presentation of Gaucher disease in patients with the third most common mutation (D409H) in Spain. *J Inherit Metab Dis* 19:798–800.

- Harkins AB, Cahill AL, Powers JF, Tischler AS, Fox AP (2004) Deletion of the synaptic protein interaction site of the N-type ( $\text{Ca}_v2.2$ ) calcium channel inhibits secretion in mouse pheochromocytoma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:15219–15224.
- Schulte A, Chow RH (1996) A simple method for insulating carbon fiber microelectrodes using anodic electrophoretic deposition of paint. *Anal Chem* 68:3054–3058.

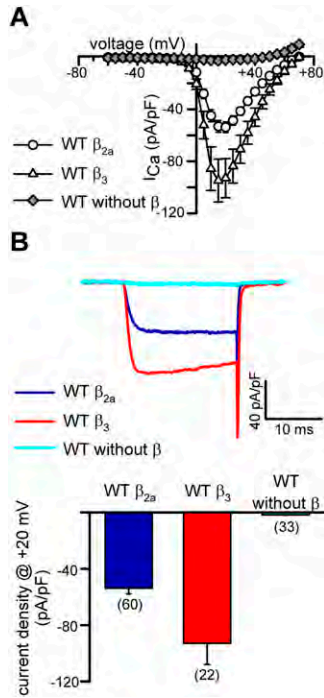




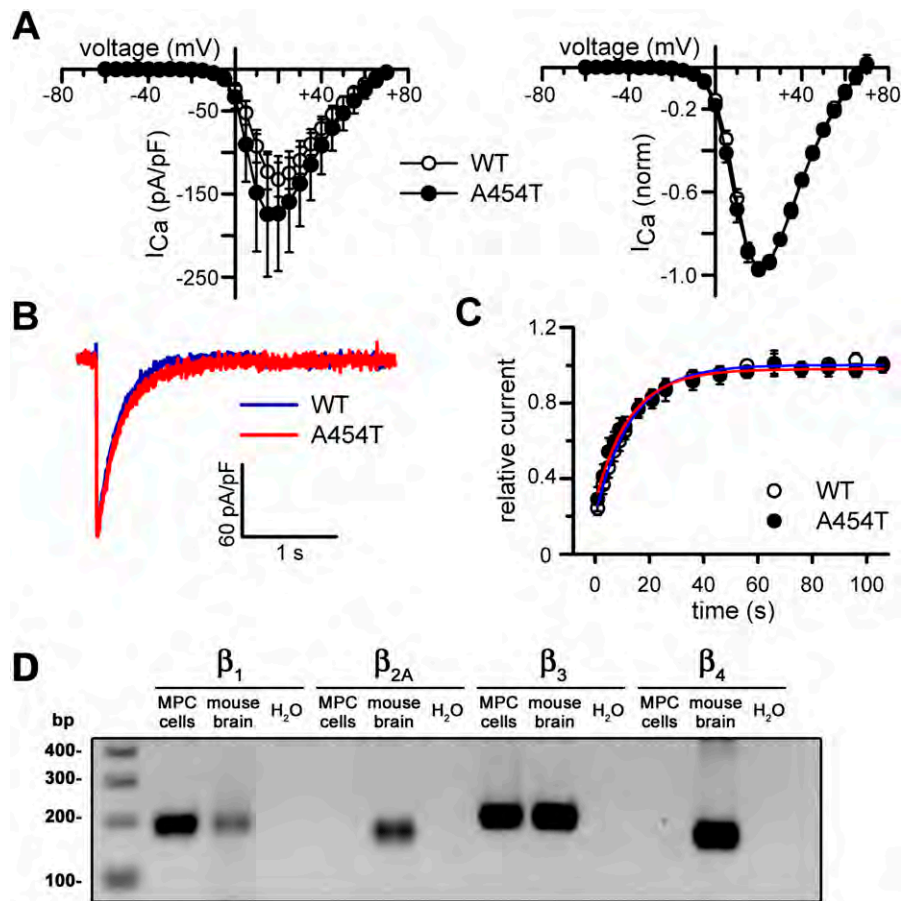
**Fig. S1.** Pedigree segregating the A454T mutation and gene location of the nucleotide change. (A) Clinical and genetic characterization of a three-generation migraineur pedigree segregating the A454T mutation. Affected individuals are denoted by solid symbols (squares indicate male family members; circles, female family members; symbols with a slash, members who had died). The genotype for the 11 polymorphic markers of the four genes (*ATP1A2*, *SCN1A*, *SLC1A3*, and *CACNA1A*) previously involved in FHM used in linkage analysis, the *CACNA1A* mutation carrier status, and the main clinical characteristics (type of aura) are indicated below each individual. (Inset) Order of markers and genetic distances between them in cM. (B) Conservation of the A454 amino acid residue in  $\alpha_1$  subunits of different human calcium channels (Upper) and in the  $\alpha_{1A}$  subunit of the P/Q type calcium channel of different species (Lower). Nonconserved residues are shadowed in gray. The alignments were performed with clustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>). (C) Location of the single-nucleotide substitution (c.1360G > A) in the *CACNA1A* gene.



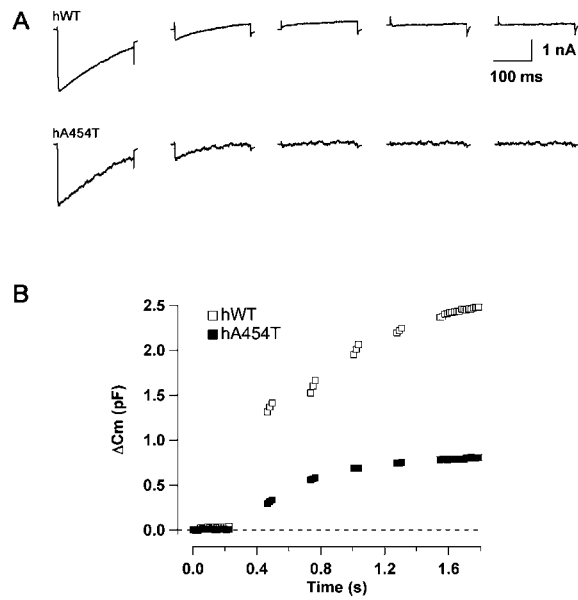
**Fig. S2.** A454T has no effect on current density, voltage-dependent activation, and inactivation kinetics of heterologously expressed P/Q channels. Current density-voltage relationships (*Left*) and normalized I-V curves (*Right*) for WT and A454T P/Q channels containing  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$  (A) or  $\text{Ca}_v\beta_3$  (B) subunits expressed in HEK 293 cells. Peak current densities were (in pA/pF): WT $\beta_{2a}$  (○,  $n = 53$ )  $52 \pm 4.2$ ; A454T $\beta_{2a}$  (●,  $n = 34$ )  $53.9 \pm 4.9$ ; WT $\beta_3$  (△,  $n = 22$ )  $94.8 \pm 16.4$ ; and A454T $\beta_3$  (▲,  $n = 16$ )  $100.7 \pm 20.6$ . Maximum P/Q current density from cells expressing the “fast-inactivating” regulatory  $\text{Ca}_v\beta_3$  subunit were significantly higher ( $P < 0.05$ ) than that obtained in the presence of the “slow-inactivating” palmitoylated  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$  subunit without differences between WT and A454T channels ( $P > 0.7$ ). No differences between WT and A454T (ANOVA,  $P > 0.11$ ) were observed regarding their voltage for half-maximal  $\text{Ca}^{2+}$  current ( $I_{Ca}$ ) activation, the steepness of the activation curve, or the apparent reversal potential (ruling out major changes in  $\text{Ca}^{2+}$  permeability) (A and B *Right*).  $V_{1/2, \text{act}}$  and  $k_{\text{act}}$  values were (in mV): WT $\beta_{2a}$  (○,  $n = 53$ )  $7.9 \pm 0.4$  and  $4.0 \pm 0.3$ ; A454T $\beta_{2a}$  (●,  $n = 34$ )  $7.9 \pm 0.4$  and  $3.9 \pm 0.3$ ; WT $\beta_3$  (△,  $n = 22$ )  $6.9 \pm 0.3$  and  $3.8 \pm 0.2$ ; and A454T $\beta_3$  (▲,  $n = 16$ )  $7.3 \pm 0.3$  and  $3.6 \pm 0.2$ , respectively. Average  $V_{\text{rev}}$  values in the different groups were between 64.7 mV and 65.3 mV, with no statistically significant differences between them (ANOVA,  $P = 0.41$ ). Average  $\tau_{\text{act}}$  (C) and  $\tau_{\text{deact}}$  (D) of WT (○) and A454T channels (●), at the indicated voltage, illustrating that activation and tail currents deactivation time constants were similar for all combinations of P/Q channel subunits under study (only data for  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$ -containing channels are shown, ANOVA,  $P > 0.1$ ). (E) Representative current traces illustrating voltage-dependent inactivation of WT (blue line) and A454T (red line) channels comprising either the  $\beta_{2a}$  (Upper) or the  $\beta_3$  (Lower) subunit, in response to a 3-s depolarizing pulse. As widely reported before (reviewed in refs. 12 and 15), P/Q channels containing  $\text{Ca}_v\beta_{2a}$  subunit inactivated slower (Upper) than those including  $\text{Ca}_v\beta_3$  (Lower) without significant differences between WT and A454T channels (WT $\beta_{2a}$ ,  $1.01 \pm 0.1$  s,  $n = 27$  vs. WT $\beta_3$ ,  $0.25 \pm 0.03$  s,  $n = 14$ ,  $P < 0.001$ ; A454T $\beta_{2a}$ ,  $0.96 \pm 0.09$  s,  $n = 21$  vs. A454T $\beta_3$ ,  $0.23 \pm 0.05$  s,  $n = 6$ ,  $P < 0.01$ ). (F) Similar time course of  $\text{Ca}^{2+}$  current recovery from inactivation for WT and A454T channels in the presence of the  $\beta_{2a}$  (Upper) or  $\beta_3$  (Lower) channel subunit. Average  $\tau$  of current recovery from inactivation for the different P/Q channels, obtained after fitting the data to a single exponential, were (in s): WT $\beta_{2a}$  (○,  $n = 20$ )  $18.54 \pm 2.74$ ; A454T $\beta_{2a}$  (●,  $n = 10$ )  $22.09 \pm 4.93$ ; WT $\beta_3$  (△,  $n = 14$ )  $14.16 \pm 1.99$ ; A454T $\beta_3$  (▲,  $n = 8$ )  $9.73 \pm 1.66$  (ANOVA,  $P = 0.093$ ).



**Fig. S3.** No substantial P/Q  $\text{Ca}^{2+}$  currents are recorded from transfected HEK 293 cells in the absence of regulatory  $\text{Ca}_v\beta$  subunits. (A) Current density-voltage relationships for WT P/Q channels expressed in HEK 293 in the presence or absence of  $\text{Ca}_v\beta$  subunits, as indicated. (B) Representative  $\text{Ca}^{2+}$  current traces (Upper) and average current densities (Lower) obtained in response to a 20-ms depolarizing pulse to +20 mV from HEK 293 cells expressing  $\alpha_{1A}$ ,  $\alpha_{2\delta}$ , and EGFP in the presence or absence of different  $\text{Ca}_v\beta$  subunits.



**Fig. S4.** Electrophysiological properties of WT and A454T P/Q channels expressed in MPC 9/3L-AH cells. (*A Left*) Current density-voltage relationships for WT and A454T P/Q channels expressed in MPC 9/3L-AH cells. Peak current densities were (in pA/pF): WT ( $\circ$ ,  $n = 17$ )  $132.8 \pm 20.6$ ; A454T ( $\bullet$ ,  $n = 9$ )  $173.7 \pm 69.3$ . (*Right*) Normalized  $I-V$  curves for WT and A454T channels expressed in MPC 9/3L-AH cells.  $V_{1/2,act}$ ,  $k_{act}$ , and  $V_{rev}$  values obtained by fitting the data to the modified Boltzmann equation (Eq. 1) were, respectively (in mV): WT ( $\circ$ ,  $n = 17$ ),  $9.6 \pm 0.4$ ,  $4.3 \pm 0.3$  and  $65.8 \pm 0.7$ ; A454T ( $\bullet$ ,  $n = 9$ )  $8.9 \pm 0.4$ ,  $4.5 \pm 0.3$ , and  $66.1 \pm 0.7$ . (*B*) Representative current traces illustrating voltage-dependent inactivation of WT (blue line) and A454T (red line) P/Q channels expressed in MPC 9/3L-AH cells, in response to a 3-s depolarizing pulse. As observed in transfected HEK 293 cells, no significant differences between WT and A454T P/Q channels expressed in MPC 9/3L-AH cells were observed regarding their maximum current density ( $P = 0.48$ ; Fig. S4A Left), voltage for half-maximal activation ( $P = 0.29$ ), steepness of the activation curve ( $P = 0.6$ ), apparent reversal potential ( $P = 0.8$ ; Fig. S4B Right), or inactivation kinetics (WT,  $0.23 \pm 0.05$  s,  $n = 10$  vs. A454T,  $0.27 \pm 0.09$  s,  $n = 8$ ;  $P = 0.69$ ; Fig. S4B). (*C*) Similar time course of  $Ca^{2+}$  current recovery from inactivation for WT and A454T P/Q channels expressed in MPC 9/3L-AH cells. Average  $\tau$  of current recovery from inactivation for the different P/Q channels, obtained after fitting the data to a single exponential, were (in s): WT ( $\circ$ ,  $n = 9$ )  $13.96 \pm 0.93$ ; A454T ( $\bullet$ ,  $n = 6$ )  $13.11 \pm 1.09$  ( $P = 0.56$ ). (*D*) Detection of endogenous expression of  $Cacnb1$ ,  $Cacnb2a$ ,  $Cacnb3$ , and  $Cacnb4$  in MPC cells and mouse cerebellum by RT-PCR. Mouse brain expressed the four different beta subunits, whereas MPC cells only expressed  $\beta_1$  and  $\beta_3$  subunits. No amplification could be seen by using water as negative control (see *SI Methods* for methodological details).



**Fig. 55.** Coupling of the human  $\alpha_{1A}$  channel subunit to exocytosis in MPC 9/3L-AH cells is reduced by the A454T mutation. (A) Currents from two MPC 9/3L-AH cells of similar size expressing either human WT (Upper) or human A454T  $\alpha_{1A}$  channel subunits (Lower) in response to a train of five successive 200-ms depolarizing voltage steps to +20 mV delivered at 20 Hz. As observed for the rabbit  $\alpha_{1A}$  subunit, the A454T mutation did not affect the inactivation kinetics of P/Q currents through channels containing the human  $\alpha_{1A}$  subunit expressed in MPC 9/3L-AH cells in response to a 3-s depolarizing pulse (hWT,  $0.14 \pm 0.019$  s,  $n = 5$  vs. hA454T,  $0.135 \pm 0.019$  s,  $n = 5$ ;  $P = 0.82$ ). (B) Capacitance traces, plotted as a function of time, from the same cells showed in A. Human WT (hWT,  $\square$ ) and human A454T (hA454T,  $\blacksquare$ )  $\alpha_{1A}$  expressing cells were stimulated at 20 Hz as described previously.

## Formes multifactorials de migranya

### Article 4:

### Variacions de tipus SNP en gens dels receptors de vanil·loids TRPV1 i TRPV3 estan associats amb la migranya a la població espanyola

#### Resum

La superfamília de receptors de potencial transitori (TRP) de canals catiónics no selectius està implicada en diversos processos relacionats amb la fisiopatologia de la migranya, incloent-hi la percepció sensorial multimodal i el dolor, la sensibilització central i perifèrica i la regulació de l'homeostasi del calci. Amb l'objectiu d'identificar polimorfismes d'un sol nucleòtid (SNPs) en els gens TRP que poden conferir una major susceptibilitat genètica a la migranya, es va realitzar un estudi cas-control d'associació genètica amb rèplica en un total de 1040 casos i 1037 controls. Es van genotipar 149 SNPs de 14 gens TRP que s'expressen al cervell. L'estudi es va dur a terme en dues etapes. En la primera es va estudiar una mostra (*discovery*) de 555 casos i 555 controls, mentre que en la segona (rèplica) es van incloure 485 casos i 482 controls. Els pacients migranyosos eren de nacionalitat espanyola, ètnia caucàsica i es van seleccionar d'acord amb els criteris per al diagnòstic de la ICHD-II, alguns amb migranya sense aura (MO) i d'altres amb migranya amb aura (MA). A la mostra *discovery*, 19 SNPs de deu gens TRP va mostrar associació nominal ( $P < 0,05$ ) amb els grups de MO, MA o migranya general. A la mostra de rèplica, l'associació es va confirmar per les variants rs7217270 (*TRPV3*) en MA i rs222741 (*TRPV1*) en el grup de migranya general. Es van identificar haplotips de risc en set dels gens que van mostrar associació nominal a la mostra *discovery*, però cap d'ells es va replicar a la segona mostra. Les troballes suggereixen que els membres de la subfamília dels receptors vanil·loids (TRPV) contribueixen a la susceptibilitat genètica a la migranya a la població espanyola.

#### Referència

Carreño O, Corominas R, Fernández-Morales J, Camiña M, Sobrido MJ, Fernández-Fernández JM, Pozo-Rosich P, Cormand B, Macaya A. SNP variants within the vanilloid TRPV1 and TRPV3 receptor genes are associated with migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet B* [sotmès a publicació].





American Journal of  
Medical Genetics  
Part B: Neuropsychiatric Genetics

**SNP variants within the vanilloid TRPV1 and TRPV3 receptor genes are associated with migraine in the Spanish population**

Journal:	<i>American Journal of Medical Genetics Part B: Neuropsychiatric Genetics</i>
Manuscript ID:	NPG-11-0096.R1
Wiley - Manuscript type:	Research Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Carreño, Oriol; Universitat de Barcelona, Departament de Genètica Corominas, Roser; Hospital Universitari Vall d'Hebron, Laboratori Neurologia Infantil Fernández-Morales, Jessica; Vall d'Hebron Institut de Recerca, Headache and Neurological Pain Laboratory Camiña, Montserrat; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica Sobrido, Maria; Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica Fernández-Fernández, José; Universitat Pompeu Fabra, Laboratory of Molecular Physiology and Channelopathies Pozo-Rosich, Patricia; Vall d'Hebron Institut de Recerca, Headache and Neurological Pain Laboratory Cormand, Bru; University of Barcelona, Genetics Macaya, Alfons; Vall d'Hebron Institut de Recerca, Grup de recerca en Neurologia Pediàtrica
Keywords:	migraine, association study, transient receptor potential

SCHOLARONE™  
Manuscripts



1  
2  
3  
4  
5 **SNP variants within the vanilloid *TRPV1* and *TRPV3* receptor genes are associated**  
6  
7 **with migraine in the Spanish population**  
8  
9

10  
11 Oriel Carreño<sup>1,2</sup>, Roser Corominas<sup>3,4</sup>, Jessica Fernández-Morales<sup>5</sup>, Montserrat Camiña<sup>6</sup>,  
12  
13 María-Jesús Sobrido<sup>6,4</sup>, José Manuel Fernández-Fernández<sup>7</sup>, Patricia Pozo-Rosich<sup>5</sup>, Bru  
14  
15  
16 Cormand<sup>1,2,4</sup>, Alfons Macaya<sup>3</sup>  
17  
18

19  
20  
21 <sup>1</sup> Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Spain  
22

23 <sup>2</sup> Institut de Biomedicina de la Universitat de Barcelona (IBUB), Spain  
24

25 <sup>3</sup> Pediatric Neurology Research Group, Vall d'Hebron Research Institute, Universitat  
26  
27 Autònoma de Barcelona, Spain

28 <sup>4</sup> Center for Biomedical Network Research on Rare Diseases (CIBERER)-Institute of  
29  
30 Health Carlos III, Spain

31  
32 <sup>5</sup> Headache and Neurological Pain Laboratory, Vall d'Hebron Research Institute and  
33  
34 Headache Unit, Neurology Department, Hospital Universitari Vall d'Hebron,  
35  
36 Barcelona, Spain.

37 <sup>6</sup> Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica, Santiago de Compostela, Spain  
38

39 <sup>7</sup> Laboratory of Molecular Physiology and Channelopathies, Department of  
40  
41 Experimental and Health Sciences, Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain  
42  
43  
44

45  
46 **Corresponding author:**

47 Alfons Macaya MD, PhD

48 Telephone # +34 934894334

49 Fax # +34 932746837

50  
51 Email address: amacaya@vhebron.net  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

**ABSTRACT**

The transient receptor potential (TRP) superfamily of non-selective cationic channels are involved in several processes plausibly relevant to migraine pathophysiology, including multimodal sensory and pain perception, central and peripheral sensitization and regulation of calcium homeostasis.

With the aim of identifying single nucleotide polymorphisms (SNPs) in TRP genes that may confer increased genetic susceptibility to migraine, we carried out a case-control genetic association study with replication, including a total of 1040 cases and 1037 controls. We genotyped 149 SNPs covering 14 TRP genes with known brain expression.

The two-stage study comprised samples of 555 and 485 Spanish, Caucasian patients, selected according to the ICHD-II criteria for the diagnosis of migraine without aura (MO) or migraine with aura (MA). In the discovery sample, 19 SNPs in ten TRP genes showed nominal association ( $P < 0.05$ ) with MO, MA or overall migraine. In the replication sample, nominal association was confirmed for *TRPV3* rs7217270 in MA and *TRPV1* rs222741 in the overall migraine group. Risk haplotypes were identified for seven of the genes showing nominal association in the discovery set, but none of them was replicated.

The present findings suggest that members of the vanilloid TRPV subfamily of receptors contribute to the genetic susceptibility to migraine in the Spanish population.

**KEYWORDS:** migraine, association study, TRP, vanilloid

## INTRODUCTION

Migraine is a disabling type of primary headache with a global lifetime prevalence of 14% and a female:male ratio of 3:1 (Jensen and Stovner 2008). The International Headache Society (IHS) has established a set of criteria to define the main migraine phenotypes, most notably the two main subtypes of migraine without aura (MO) and migraine with aura (MA) (International Headache Society (IHS) 2004). These deliberately restrictive definitions have allowed for homogenizing phenotypes, and have thus paved the way for research in migraine genetics. However, to date, the only genes known to cause migraine are those responsible for the rare monogenic form of familial hemiplegic migraine (FHM) (De Fusco and others 2003; Dichgans and others 2005; Ophoff and others 1996; Suzuki and others 2010), with the addition of the *KCNK18* gene, encoding a two-pore domain potassium channel, in familial MA (Lafreniere and others 2010). Even less is known about the genetic basis of common forms of migraine. A recent genome-wide association study (GWAS) in a clinic-based central and northern European sample identified a genetic variant on chromosome 8q22.1 that conferred increased susceptibility to migraine and showed a stronger effect in MA individuals (Anttila and others 2010).

Migraine's mechanism is only partially understood and may in fact vary among the different migraine subtypes. In MA, cortical spreading depression (CSD) is assumed to underlie the aura phase and to produce brainstem activation via the trigeminovascular system. The molecular underpinnings of CSD are unknown for the most part but, based on functional characterization of the mutations found in FHM patients, ionic channel sensitivity appears crucial in the initiation of the cascade of events that lead to an increased neurotransmitter secretion, the presence of neuronal hyperexcitability and consequently a migraine attack (reviewed in (de Vries and others 2009; Pietrobon 2005)). Alternatively, it has been hypothesized that the increased brainstem input that results in the headache phase of migraine does not result fully from CSD but also from an impaired nociceptive regulation within the nervous system (Goadsby 2001). In this regard, several members of the transient receptor potential (TRP) superfamily of non-selective cationic channels are known to mediate pain perception and processing in various cell types in the peripheral and central nervous system. These cell membrane sensors are capable of integrating both intracellular and extracellular chemical, thermal, osmotic or mechanical signals. TRP channels are also involved in  $Mg^{2+}$  and  $Ca^{2+}$  homeostasis, intracellular membrane fusion and fission and, consequently, neuron activation and neurotransmitter release (reviewed in (Cortright and others 2007)). TRP-related

1  
2  
3 channelopathies are ubiquitous in the organism and are being increasingly reported. As related to  
4  
5 neurological disorders, mutations in *TRPV4*, *TRPM1*, *TRPM11* and *TRPM2 /TRPM7* have been reported  
6  
7 in Charcot-Marie-Tooth type 2C, congenital stationary night blindness, mucopolidosis type IV and  
8  
9 Guamanian amyotrophic lateral sclerosis-Parkinson Dementia Complex, respectively (Nilius and  
10  
11 Owsianik 2010). TRPV1 channels are mediators of neuropathic pain and have been proposed to play a  
12  
13 role in migraineous allodynia and sensitization phenomena (Benarroch 2008; Meents and others 2010).  
14  
15 Finally, several TRP channels are functional receptors for algogenic substances (Cortright and others  
16  
17 2007) and TRPV1 and TRPA1 are expressed in the sensory neurons of the trigeminal ganglia (Story and  
18  
19 others 2003).

20  
21 Because of their role in nociception and calcium homeostasis, we considered involvement of TRP  
22  
23 channels in susceptibility to migraine plausible. We present the findings of a two-stage genetic  
24  
25 association study covering fourteen TRP channel genes in two samples of Spanish migraineurs.  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

## PATIENTS AND METHODS

### Discovery Sample

A total of 555 patients were diagnosed either with MA (n=232) or MO (n=323) according to the International Criteria for Headache Disorders 2nd edition (International Headache Society (IHS)) after being directly interviewed and examined by one of the neurologists in the team. Four hundred and thirty-one patients were female (77.6%). For the purpose of analysis, three clinical subgroups were defined: i) “all migraine”, including all the patients recruited in the study; ii) “MO” and iii) “MA”. Patients displaying attacks of both MO and MA were classified as MA. Patients with hemiplegic aura, a MA variant showing monogenic inheritance, were excluded. The control sample consisted of 555 unrelated blood donors that lacked any personal or family history of headache and were sex-matched with the cases. Average age at assessment was 36.9 years (SD=12.67) for patients and 54.8 years (SD=17.05) for control subjects. All individuals were Caucasian and Spanish and were recruited in three centers: the Fundación Pública Galega de Medicina Xenómica in Santiago de Compostela, the Sant Joan de Déu Hospital in Manresa and the Pediatric Neurology Section at the Vall d'Hebron Research Institute in Barcelona.

### Replication Sample

The replication cohort consisted of 485 migraine patients (158 MA and 327 MO) and 482 sex-matched unrelated controls. Patients and controls were recruited according to the same criteria used in the discovery set. Three hundred and eighty-three patients were female (79%). Average age at assessment was 43.7 years (SD=16.49) for the patients and 55.3 years (SD=17.34) for control subjects. All individuals were recruited at the Neurology Service, Hospital Universitari Vall d'Hebron in Barcelona. The study was approved by the local Ethics Committees and informed consent was obtained from all adult subjects, children and their parents according to the Helsinki declaration.

### DNA isolation and quantification.

Genomic DNA was isolated either from peripheral blood lymphocytes by a salting-out procedure (Miller and others 1988) or using a magnetic bead technology with the Chemagic Magnetic Separation Module I and the Chemagic DNA kit (Chemagen, Baesweiler, Germany) or from saliva using the Oragene DNA

1  
2  
3 Self-Collection Kit (DNA Genotek, Kanata, Ontario, Canada). The DNA concentrations of all samples  
4  
5 were measured with a NanoDrop spectrophotometer (NanoDrop Technologies, LLC, Delaware, USA).  
6  
7

### 8 9 **Gene and single nucleotide polymorphism (SNP) selection and SNPLex design**

10 We selected a subset of 14 genes of the TRP channel superfamily that are expressed in the brain, on the  
11 basis of their involvement in nociception and/or inflammatory pain pathways (TRPA1, TRPV1, TRPV2,  
12 TRPV3, TRPV4, TRPM4, TRPM8) (Cortright and others 2007), neurotransmitter release (TRPC4,  
13 TRPM7) (Krapivinsky and others 2006; Munsch and others 2003), formation of synaptic connections  
14 (TRPC3, TRPC5) (Greka and others 2003; Li and others 1999), linkage to familial hypomagnesemia with  
15 secondary hypocalcemia leading to infantile seizures (TRPM6) (Walder and others 2002), or possible  
16 relevance in neuronal excitability (TRPC1) (Kim and others 2003). TRPC7 may form multimeric  
17 channels with TRPC1 and TRPC3 (Zagranichnaya and others 2005). To ensure full genetic coverage of  
18 these genes and minimize redundancy, we used the Haploview v3.32 software and the HapMap phase II  
19 database (www.hapmap.org, release #22) to evaluate the LD pattern of the region spanning each  
20 candidate gene plus three to five Kb flanking regions. TagSNPs were selected at an  $r^2$  threshold of 0.85  
21 and minor allele frequency (MAF) > 0.15 for genes with fewer than 15 tagSNPs and MAF > 0.25 for  
22 genes with 15 or more tagSNPs. Seven additional non-synonymous or UTR SNPs within the selected  
23 genes were also included in the study: rs12583681 and rs3904512 (5'UTR of *TRPC4*);  
24 rs8042919/NP\_060142.3:p.Thr1482Ile (TRPM7); rs8065080/NP\_061197.4:p.Ile585Val,  
25 rs222747/NP\_061197.4:p.Met315Ile and rs222749/NP\_061197.4:p.Pro91Ser (TRPV1);  
26 rs322937/NP\_659505.1:p.Arg117Gly (TRPV3). A total of 202 SNPs were chosen (see Supplementary  
27 Table 1). Nine SNPs did not pass through the SNPLex design pipeline. To rule out stratification in the  
28 discovery sample, we genotyped 48 unlinked anonymous SNPs located at least 100 kb distant from  
29 known genes (Corominas and others 2010). In the replication study, the 18 SNPs showing nominal  
30 association (rs7819749, rs7639403, rs9547988, rs1577007, rs9576354, rs871385, rs11668962,  
31 rs9650767, rs11563056, rs6758653, rs222741, rs182637, rs7223530, rs161393, rs733080, rs11078454,  
32 rs2455858 and rs10774912) plus the 12 SNPs included in the risk haplotypes identified in the original  
33 cohort (rs10161932, rs3904512, rs2151438, rs12339024, rs2151423, rs7858755, rs7867868, rs12465950,  
34 rs4790522, rs7217270 and rs10850830) were selected for further analysis. Because of design  
35 constrictions, rs758275, rs7218756 and rs4663994 were finally excluded.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### Genotyping and quality control

Genotyping of the discovery sample was performed using the SNPlex platform (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) at the Barcelona node of the National Genotyping Center (CeGen) as described (Tobler and others 2005). Two CEPH samples were included in all genotyping assays and a 100% concordance with HapMap data was obtained. The follow-up, replication sample was genotyped by means of the SNPlex technology as described above and TaqMan Genotyping Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the LightCycler<sup>®</sup> Real-Time PCR System in 384 multiwell plates following the manufacturer's protocol and with the LightCycler<sup>®</sup> 480 Software release 1.5 (Roche, Basel, Switzerland) for analysis. Three CEPH samples were included in all TaqMan assays and a 100% concordance with HapMap data was obtained.

### Statistical Analysis

Individuals with >40% missing genotypes were excluded from the analysis; SNPs with >20% missing genotypes were considered as failed; SNPs in LD ( $r^2 > 0.85$ ) with any other studied SNP or showing deviation from Hardy-Weinberg equilibrium (HWE; threshold=0.01) as calculated in our control sample were also excluded. Genetic Power Calculator ([pnu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc](http://pnu.mgh.harvard.edu/~purcell/gpc)) (Purcell and others 2003) was used to calculate *post hoc* minimal statistical power, assuming an odds ratio (OR) of 1.5, prevalence of 0.14 (Jensen and Stovner 2008), significance level of 0.05, and the lowest MAF of 0.099 and 0.195 for the first and second population, respectively.

### Single-marker analysis

The analysis of HWE as well as case-control comparisons of genotype frequencies under a Log-Additive model were performed with the SNPassoc R v2.8.0 library (Gonzalez and others 2007) adjusting by sex. When a nominal association was identified ( $P < 0.05$ ), dominant and recessive models were also analyzed. In the initial association study the significance threshold under the Bonferroni correction for multiple testing was set at  $P < 1.0e-04$  upon consideration of 149 SNPs analyzed and three clinical groups (MO, MA and all-migraine patients).

### Multiple-marker analysis

1  
2  
3 In order to minimize type I errors and multiple testing, risk haplotypes were evaluated in the clinical  
4 subgroup where the genes showed nominal association in the single-marker analysis (all-migraine, MO or  
5 MA), with the UNPHASED 3.0 software (Dudbridge 2003). For each gene, the best two-marker  
6 haplotype from all possible combinations was identified. Likewise, additional markers (up to five) were  
7 added in a stepwise manner to the initial two-SNP haplotype until the highest odds ratio (OR) was  
8 achieved. Significance was estimated by a 10,000 permutation procedure. Assignment of specific  
9 haplotypes to individuals was performed with the PHASE 2.1 software (Stephens and others 2001). The  
10 comparisons of risk haplotype carriers vs non carriers, OR and confidence intervals (CI) were estimated  
11 using the SPSS v12.0 Software (SPSS Inc., IBM Company Chicago, Illinois, USA).  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22

### 23 **Replication study**

24 For SNPs showing nominal association with migraine in the discovery population, a comparison of  
25 genotype frequencies was undertaken in the replication population, under the Log-Additive model.  
26  
27 Additionally, risk haplotypes identified in the first sample were tested in the second one.  
28  
29  
30  
31  
32

### 33 **Interaction**

34 Epistasis analysis was performed on the selected *TRPV1* and *TRPV3* genes by comparing two different  
35 regression models with a likelihood ratio test using the statistical package SPSS v12.0. In the first model,  
36 we used the affection status as a dependent variable and the two risk alleles as predictive variables  
37 (*TRPV3* under the log-additive model, with AA=2, AG=1 and GG=0; *TRPV1* under the dominant model,  
38 with TT=1, CT=0 and CC=0) (Affected status =  $a + b\text{SNP}_1 + c\text{SNP}_2$ ). In the second model, we included  
39 the interaction between SNPs as an independent variable (Affected status =  $a + b\text{SNP}_1 + c\text{SNP}_2 +$   
40  $d\text{SNP}_1 * \text{SNP}_2$ ).  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## RESULTS

### Discovery sample

Among 191 SNPs (tagSNPs, singletons and missense changes) in 14 candidate genes, we excluded 34 SNPs for genotyping failure (call rate <60%), two SNPs that showed deviation from HWE in the control population ( $P < 0.01$ ) and six SNPs that were in strong LD with other SNPs ( $r^2 > 0.85$ ). The minimal statistical power for a general two degrees-of-freedom (df) test was 84% for the “all migraine” group and 73% (MO) or 64% (MA) when clinical subgroups were considered.

### Single-Marker Analysis

No evidence of population stratification was found in the first population, that includes subjects recruited in distant geographical areas in Spain, by applying the STRUCTURE software (posterior probability of a single population approaching 1 and of two to five populations  $< 2e-137$ ), the  $F_{st}$  coefficient ( $\Theta = 0$  with a 99% confidence interval (CI) of 0.000–0.001), and the Pritchard and Rosenberg method ( $P = 0.268$ ) as previously reported (Corominas and others 2010). The comparison of genotype frequencies between patients and controls under a log-additive model showed nominal association between three genes and MO (*TRPC1* SNP rs7639403, *TRPC7* SNP rs871385 and *TRPM8* SNP rs11563056), 9 SNPs within seven genes and MA (*TRPA1* SNP rs7819749, *TPRM4* SNP rs11668962, *TRPM8* SNP rs4663994, *TRPVI* SNPs rs4790522 and rs182637, *TRPV3* SNPs rs7217270 and rs11078454, *TRPC4* SNP rs9576354 and *TRPV4* SNP rs10850830) as well as seven SNPs within four genes and migraine (*TRPC4* SNP rs2151438, rs3904512 and rs1577007, *TRPM8* SNPs rs12465950 and rs6758653, *TRPM6* SNP rs9650767 and *TRPVI* SNP rs222741; (Table 1). For these SNPs, the comparison under dominant and recessive models was calculated (Supplementary Table 1). None of the obtained  $P$ -values, however, remained significant after applying the stringent Bonferroni correction for multiple comparisons.

### Multiple-Marker Analysis

Genes showing single-marker associations were considered for the multiple-marker analysis in the subgroup(s) of patients where the nominal association was found. However, for *TRPM8*, which showed nominal association with the three clinical categories, i.e., MO, MA and all-migraine, only all-migraine was used in order to enhance statistical power. As for *TRPC4* and *TRPVI*, where all-migraine and a single

1  
2  
3 clinical subgroup showed significant associations, the clinical subgroup was used to favor homogeneity of  
4 the sample. Haplotype analyses are shown in Table 2. All the positive associations remained significant  
5 after adjusting for multiple comparisons by means of correction by permutations.  
6  
7  
8  
9

### 10 11 ***Migraine without Aura***

12 The analysis of all possible SNPs combinations within the *TRPC1* gene revealed a two- marker haplotype  
13 (rs7639403/rs9851381) associated with MO (Adjusted  $P$ -value=0.026), with over-representation of the C-  
14 G haplotype in patients (OR=1.37[10.5-1.80]). The *TRPC7* gene was not associated with MO in the  
15 multiple-marker analysis.  
16  
17  
18  
19

### 20 21 22 23 ***Migraine with Aura***

24 The haplotype analysis also showed positive association between MA and four genes: *TRPC4*  
25 (rs9547988/rs3904512/rs9576354; adjusted  $P$ =0.004, with over-representation of the risk T-A-C allelic  
26 combination (OR=1.87[1.47-2.46])), *TRPV1* (rs7223530/rs161393/rs733080/rs222741/rs182637; adjusted  
27  $P$ =0.0033, with under-representation of the G-A-T-G allelic combination in cases (OR=1.84[1.24 -  
28 2.72])), *TRPV3* (rs7218756/rs11078454/rs2455858; adjusted  $P$ =0.0171, with over-representation of the  
29 risk G-C-T allele (OR=1.68[1.24-2.28])) and *TRPV4* (rs10774912/rs10850830; adjusted  $P$ =0.0112,  
30 showing over-representation of the T-C haplotype in the clinical sample (OR=1.51[1.20 – 1.90])). No  
31 association, however, was found for *TRPA1* and *TRPM4*.  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41

### 42 43 ***Overall migraine sample***

44 The multiple-marker analysis showed positive association between migraine and the *TRPM6* and *TRPM8*  
45 genes. A five-marker haplotype within *TRPM6* was identified in the overall migraine sample  
46 (rs9650767/rs12339024/rs2151423/ rs7858755/rs7867868; Adjusted  $P$ -value=0.0013) with over-  
47 representation of the G-C-A-A-C haplotype (OR=2.42[1.61-3.6]). A three-marker haplotype in the  
48 *TRPM8* gene (rs758275/rs11563056/rs6758653; Adjusted  $P$ =0.048) was also found associated with  
49 migraine, showing over-representation of the C-T-G allelic combination (OR=1.76[1.19-2.6]) in the  
50 clinical sample.  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

### **Replication study**

Thirty-one SNPs were selected for follow-up in a replication cohort. We selected the 18 SNPs nominally associated with the disorder in the discovery population and the SNPs that compose the different risk haplotypes. The minimal statistical power for a general 2-df test in the replication population was 90% for all samples, 75% for MO and 43% for MA.

### **Single-Marker Analysis**

The comparison of genotype frequencies between patients and controls was performed for every SNP that had shown association in the discovery sample. The analysis revealed a nominally significant association of the T allele from the *TRPVI* SNP rs222741 ( $P=0.03$ ) and allele A from the *TRPM6* SNP rs9650767 ( $P=0.01$ ) with the all-migraine group. Allele A from SNP rs7217270 located in the *TRPV3* gene ( $P=0.02$ ) was found nominally associated with the MA subgroup. However, after applying Bonferroni correction for multiple comparisons none of them remained significant.

### **Multiple-Marker Analysis**

None of the haplotypes showing association in the original sample was replicated in the follow-up sample.

### **Interaction**

We then evaluated possible interactions between the SNPs that displayed positive associations in both populations. A pooled association study was performed, including the discovery and the replication populations under the inheritance models and clinical subgroups that displayed the best association signals (Table 3). We tested putative interaction in the overall migraine sample, under a log additive model of inheritance for *TRPVI* and a dominant model for *TRPV3*. The difference between the interaction model and the non-interaction model was not significant ( $\chi^2 = 0.617$  with 2 df;  $P = 0.73455$ ).

## **DISCUSSION**

In the present study, we performed a comprehensive screen of common genetic variants in genes from the TRP family, to investigate their role in the susceptibility to common forms of migraine. In the discovery

1  
2  
3 stage, 149 SNPs covering 14 TRP genes were genotyped in 555 cases and controls. Nineteen of these  
4  
5 SNPs showed nominal association with migraine and were subsequently tested in a follow-up stage. The  
6  
7 association was replicated for two intronic SNPs, *TRPV1* rs222741 in the all-migraine group and *TRPV3*  
8  
9 rs7217270 in the MA group. The positive associations in the multiple marker analysis could not be  
10  
11 replicated.

#### 12 13 14 15 *Association of the vanilloid TRPV thermosensors with migraine*

16  
17 *TRPV1* and *TRPV3* lie in close proximity on the 17p13 chromosomal region. They encode two channels  
18  
19 pertaining to the polymodal thermo and chemosensitive TRP vanilloid subfamily. *TRPV1* and *TRPV3* are  
20  
21 only modestly permeable to  $\text{Ca}^{2+}$ , in contrast with *TRPV5* and *TRPV6*, the only highly  $\text{Ca}^{2+}$  selective  
22  
23 channels in the entire TRP superfamily (Nilius and Owsianik 2010).

24  
25 *TRPV1* was identified as the capsaicin receptor and is activated by noxious temperature, low extracellular  
26  
27 pH (Caterina and others 1997), voltage (Gunthorpe and others 2000) and diverse lipid derivatives  
28  
29 (Zygmunt and others 1999). It is abundantly expressed in several neural structures, including sensory C  
30  
31 and A $\delta$  fibers, dorsal root ganglia and trigeminal ganglia (Caterina and others 1997) and it is thought to  
32  
33 play a critical role in the transduction of painful stimuli. *TRPV1* channels are stimulated by ethanol  
34  
35 (Trevisani and others 2002) when they mediate neurogenic vasodilatation in the trigeminovascular system  
36  
37 and are also involved in the release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) (Nicoletti and others  
38  
39 2008). It is thus conceivable that this neurogenic inflammatory mechanism might underlie the ability of  
40  
41 alcohol to trigger the migraine attack. The analgesic effects of the *TRPV1* antagonist SB-705498 on  
42  
43 trigeminovascular sensitization and neurotransmission have been studied in an animal model of  
44  
45 neurovascular head pain (Lambert 2009). This compound was able to both reverse and prevent the  
46  
47 sensitization to sensory inputs from the trigeminovascular facial and dural receptive fields. *TRPV1* might  
48  
49 thus be involved in the development of the cutaneous trigeminal allodynia observed in some migraineurs.  
50  
51 A phase II clinical trial with SB-705498 in acute migraine has been conducted under GlaxoSmithKline  
52  
53 Industry sponsorship ([clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00269022](http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00269022)), although to our  
54  
55 knowledge the results have not been disclosed. In addition, the observation that continuous exposure to  
56  
57 local high-dose capsaicin promotes pain relief through nociceptor inactivation or death of sensory nerve  
58  
59 terminals (Jancso and others 1961) has been followed by the development of high-concentration capsaicin  
60

1  
2  
3 dermal patches for the effective treatment of chronic painful neuropathies (Derry and others 2009),  
4  
5 admittedly a mechanistically dissimilar pain disorder.  
6

7 A SNP in another member of the vanilloid receptor subfamily, *TRPV3*, was associated with the MA  
8  
9 subgroup. *TRPV3* was identified in 2002 and found expressed in the trigeminal ganglion, dorsal root  
10  
11 ganglion, spinal cord and other brain tissues including the thalamus and striatum (Peier and others 2002;  
12  
13 Smith and others 2002; Xu and others 2002). It is activated by both innocuous and noxious temperatures  
14  
15 (Smith and others 2002);(Moqrich and others 2005), various chemicals such as monoterpenoids (Vogt-  
16  
17 Eisele and others 2007) and is modulated by voltage (Smith and others 2002). Like TRPV1, it is a  
18  
19 molecule presumably involved in neurogenic vasoregulation and the associated inflammatory pain state.  
20  
21 The evidence that *TRPV1* and *TRPV3* share chromosomal localization, are co-expressed in neurons and  
22  
23 display similar heat-mediated gating, makes them fine candidates for intrafamily heteromerization (Smith  
24  
25 and others 2002). Assembly of human TRPV1 and TRPV3 has been verified by co-immunoprecipitation  
26  
27 experiments and functional assays in heterologous systems, the co-assembly allowing for modulation of  
28  
29 the TRPV1 response (Smith and others 2002). The two homologous murine thermosensitive subunits  
30  
31 have been also detected to co-assemble: spectroscopy-based fluorescence resonance energy transfer  
32  
33 (FRET) revealed FRET signals limited to the plasma membrane, and single-channel recordings showed  
34  
35 heteromeric channels exhibiting intermediate conductance and gating properties (Cheng and others 2007).  
36  
37 In the light of this experimental evidence, we analyzed the possible interaction between the replicated  
38  
39 SNPs in *TRPV1* and *TRPV3* genes, but found no evidence supporting the existence of epistatic effects  
40  
41 between these genes in the risk to develop migraine.

42 Temperature changes are listed among classical migraine triggers. Weather changes and “heat” have been  
43  
44 reported as triggers in a 53.2% and 30.3% of migraineurs, respectively (Kelman 2007). Although data on  
45  
46 factors triggering migraine attacks was available for most of the thousand patients included in our study,  
47  
48 lack of uniformity in data collection at the different participant centers prevented statistical analysis. It is  
49  
50 tempting to speculate, however, that genetic variants in TRPV 1-4 might underlie enhanced susceptibility  
51  
52 to temperature variations in migraine. In fact, abnormal thermal pain thresholds, indicating interictal  
53  
54 cutaneous sensitization, have been found in episodic and chronic migraineurs (Schwedt and others 2011).  
55  
56  
57  
58  
59  
60

*TRPM subfamily findings*

1  
2  
3 We also observed association of the intronic rs9650767 in the *TRPM6* gene with migraine. However, the  
4 risk allele differed between the discovery and the replication population, thus suggesting the presence of a  
5 flip-flop phenomenon. Variation in LD or interlocus correlation in the context of multilocus effects may  
6 lead to flip-flop associations (Lin and others 2007), that are also be observed when there is constant LD  
7 (Zaykin and Shibata 2008). This association could be as well a statistical artifact.

8  
9 A recent genome-wide association study reported nominal association ( $P \leq 5 \times 10^{-5}$ ) between MA and a  
10 locus containing rs17862920 ( $P=1.26E-05$ , OR=1.28 [1.14-1.44]) and several nearby SNPs in the *TRPM8*  
11 gene, the cold and menthol receptor (Anttila and others 2010). Our experiment was designed under a  
12 genetic coverage strategy based on LD patterns. We selected 21 SNPs in the *TRPM8* gene among which  
13 18 were successfully genotyped, but none of them reached significant association values with migraine.  
14 The rs17862920 SNP was not included in the design, as our selection was made prior to the publication of  
15 the manuscript by Anttila et al. (Anttila and others 2010). One of the SNPs that we have genotyped,  
16 rs758275, is in  $r^2=0.6$  with rs17862920 but does not show association with any of the clinical migraine  
17 subgroups (Fig 1).

### 32 *Methodological issues*

33  
34 The present case-control association study raises several methodological questions. First, our limited  
35 sample size (555 patients) may have prevented us from detecting susceptibility loci with very subtle  
36 effects in the overall population of patients with migraine. Our power decreased further when patients  
37 were subdivided in order to reduce clinical heterogeneity according to aura/non-aura clinical subtypes. In  
38 this respect, our discovery population had minimal statistical power for general 2 df test of 84% for all  
39 migraine patients, 60% for MO and 45% for MA; and the replication study had 90% for general migraine,  
40 75% for MO and 43% for MA. This power was able to detect a minimum OR of 1.5 for an SNP with an  
41 MAF of 0.099 in the first population and a MAF of 0.195 in the second population.

42  
43 Second, population stratification can lead to false positive signals in a case-control study. For that reason  
44 several preventive measures were undertaken: (1) in the discovery population, where patients were  
45 recruited in Galicia and Catalonia, population stratification was ruled out; (2) Our patient cohort was  
46 clinically well defined by neurologists and was ethnically homogeneous, Caucasian with Spanish origin;  
47 and (3) control and patient samples were recruited from the same geographical area and were matched for  
48 sex.

1  
2  
3 Third, reducing type I errors in the high-throughput SNP analysis requires correction for multiple  
4 comparisons. Under the conservative Bonferroni correction, taking into account 149 SNPs and three  
5 clinical groups, the significant threshold was set at  $P > 1.0e-04$ . No SNP withstood this correction, which  
6 on the other hand may be too stringent to identify the subtle genetic factors involved in the etiology of a  
7 complex disease such as migraine. The Bonferroni correction assumes independence of all tests  
8 performed, whereas many SNPs within the genes studied are not completely independent and the clinical  
9 subgroups are also not totally independent.

10  
11 Fourth, to limit the number of tests, we implemented a systematic approach for the haplotype analysis: (1)  
12 in the replication sample we tested the relevant haplotypes only in the clinical group (MO, MA or all-  
13 migraine) where the association was found in the discovery sample; (2) we identified the best SNP  
14 combinations in a stepwise manner, always including a SNP showing nominal association in the first  
15 combination. As a result, four genes that did not show nominal association with any migraine phenotype  
16 and three haplotypes that did not include a nominal SNP in the best two-marker combination were not  
17 further analyzed. Therefore, we cannot rule out having missed other haplotypes that contribute to  
18 migraine specific traits or modulate the phenotype through interactions with other candidate genes.

19  
20 Fifth, although we achieved adequate SNP coverage for many genes ( $r^2 = 0.85$ ), gaps still exist in 12  
21 genes, because 21% of the 191 selected SNPs could not be tested. In addition, since uncommon SNPs  
22 were not included, we cannot rule out the participation of rare variants in the etiology of the disorder.

23  
24 Finally, the two variants associated with the disease were intronic: rs222741 (NM\_080704.3:c.-  
25 34+2841C>T) and rs7217270 (NM\_145068.2:c.2085+395T>C). No known splicing alterations or protein  
26 changes are caused by these SNPs. It could be that the identified risk variants may produce by themselves  
27 functional alterations or they might lie in LD with other susceptibility loci, in the case of an indirect  
28 association. Since both of these SNPs are TagSNPs, we analyzed these variants and those in LD with  
29 them by means of the web utility SNP Function Prediction (Xu and Taylor 2009). The predictions of  
30 functional effects for transcription factor binding sites, exonic splicing enhancers or silencers, changing of  
31 splicing pattern or efficiency by disrupting splice sites, regulation of protein translation by affecting  
32 microRNA binding sites and conservation scores were negative. Five SNPs in LD with rs7217270 in the  
33 *TRPV3* gene (rs7216486 ( $r^2=1$ ), rs7207628 ( $r^2=1$ ), rs8079054 ( $r^2=1$ ), rs925102 ( $r^2=0.966$ ) and rs925101  
34 ( $r^2=0.932$ )) showed marked resemblance to alignment patterns typical of regulatory elements (Potential  
35 regulatory score above 0.1) (see Supplementary Table 2). In *TRPV1*, SNP rs222741 captures rs460716  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

1  
2  
3 (r<sup>2</sup>=1) and rs465563 (r<sup>2</sup>=0.883) in the same multiloci bin. Rs460716 is located in the 5'UTR region of  
4  
5 TRPV1 (NM\_080704.3:c.-121T>C); this region is shared with the gene encoding sedoheptulokinase  
6  
7 (SHPK), the defective enzyme in cystinosis (Touchman and others 2000), both SNPs being located within  
8  
9 the 3'UTR region of SHPK, rs460716 at NM\_013276.2:c. 2046T>C and rs465563 at NM\_013276.2:c.  
10  
11 135C>T. The G allele of rs465563 has been associated with carotid intima-media thickness (Lanktree and  
12  
13 others 2009). Future studies are needed to elucidate whether these positive SNP signals indeed relate to  
14  
15 migraine pathophysiology.  
16  
17  
18  
19  
20

### 21 *Conclusions*

22  
23 The currently most accepted view envisages migraine as a primary neurogenic disorder, where impaired  
24  
25 control of sensory inputs seems to play a central role (Lane and Davies 2006). The TRP family of  
26  
27 receptors appears crucial for both sensory transduction and intracellular Ca<sup>2+</sup> homeostasis, thereby  
28  
29 becoming suitable candidates for genetic association studies in primary headaches. Our results suggest a  
30  
31 role for *TRPV1* and *TRVP3*, two genes belonging to the TRP pain-related pathway, in the susceptibility to  
32  
33 migraine. Confirmation of these findings in larger-scale case-control cohorts is warranted, particularly  
34  
35 since TRP channels are emerging as novel pharmacological targets.  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



## ACKNOWLEDGMENTS

We are grateful to patients and controls for their participation in the study. We thank B. Narberhaus for his help in patient recruitment and Marta Ribasés and Claudio Toma for her assistance in statistical analysis. Supported by Ministerio de Ciencia e Innovación (Spain), Fondos Europeos de Desarrollo Regional (FEDER) and Plan E (grants SAF 2009-13182-C01, SAF 2009-13182-C02 and SAF 2009-13182-C03), Fondo de Investigación Sanitaria (Red HERACLES RD06/0009), Agència de Gestió d'Ajuts Universitaris i de Recerca (2009SGR078, 2009SGR0971, 2009SGR1369 ) and Fundació La Marató de TV3 (072310), Catalunya, Spain.

The present work complies with Spain's current laws.

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCES

- Anttila V, Stefansson H, Kallela M, Todt U, Terwindt GM, Calafato MS, Nyholt DR, Dimas AS, Freilinger T, Muller-Myhsok B and others. 2010. Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1. *Nat Genet* 42(10):869-73.
- Benarroch EE. 2008. TRP channels: functions and involvement in neurologic disease. *Neurology* 70(8):648-52.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD, Julius D. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389(6653):816-24.
- Cheng W, Yang F, Takanishi CL, Zheng J. 2007. Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties. *J Gen Physiol* 129(3):191-207.
- Corominas R, Sobrido MJ, Ribases M, Cuenca-Leon E, Blanco-Arias P, Narberhaus B, Roig M, Leira R, Lopez-Gonzalez J, Macaya A and others. 2010. Association study of the serotonergic system in migraine in the Spanish population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 153B(1):177-84.
- Cortright DN, Krause JE, Broom DC. 2007. TRP channels and pain. *Biochim Biophys Acta* 1772(8):978-88.
- De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, Ballabio A, Aridon P, Casari G. 2003. Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2. *Nat Genet* 33(2):192-6.
- de Vries B, Frants RR, Ferrari MD, van den Maagdenberg AM. 2009. Molecular genetics of migraine. *Hum Genet* 126(1):115-32.
- Derry S, Lloyd R, Moore RA, McQuay HJ. 2009. Topical capsaicin for chronic neuropathic pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev*(4):CD007393.
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, Ferrari MD, Herzog J, van den Maagdenberg AM, Pusch M and others. 2005. Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine. *Lancet* 366(9483):371-7.
- Dudbridge F. 2003. Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes. *Genet Epidemiol* 25(2):115-21.
- Goadsby PJ. 2001. Migraine, aura, and cortical spreading depression: why are we still talking about it? *Ann Neurol* 49(1):4-6.
- Gonzalez JR, Armengol L, Sole X, Guino E, Mercader JM, Estivill X, Moreno V. 2007. SNPassoc: an R package to perform whole genome association studies. *Bioinformatics* 23(5):644-5.
- Greka A, Navarro B, Oancea E, Duggan A, Clapham DE. 2003. TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology. *Nat Neurosci* 6(8):837-45.
- Gunthorpe MJ, Harries MH, Prinjha RK, Davis JB, Randall A. 2000. Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1). *J Physiol* 525 Pt 3:747-59.
- International Headache Society (IHS) HCS. 2004. The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition. *Cephalalgia* 24 Suppl 1:9-160.
- Jancso N, Jancso-Gabor A, Takats I. 1961. Pain and inflammation induced by nicotine, acetylcholine and structurally related compounds and their prevention by desensitizing agents. *Acta Physiol Acad Sci Hung* 19:113-32.
- Jensen R, Stovner LJ. 2008. Epidemiology and comorbidity of headache. *Lancet Neurol* 7(4):354-61.
- Kelman L. 2007. The triggers or precipitants of the acute migraine attack. *Cephalalgia* 27(5):394-402.
- Kim SJ, Kim YS, Yuan JP, Petralia RS, Worley PF, Linden DJ. 2003. Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1. *Nature* 426(6964):285-91.
- Krapivinsky G, Mochida S, Krapivinsky L, Cibulsky SM, Clapham DE. 2006. The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release. *Neuron* 52(3):485-96.
- Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, Boisvert K, Lafreniere F, McLaughlan S, Dube MP and others. 2010. A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura. *Nat Med* 16(10):1157-60.
- Lane R, Davies P. 2006. Migraine. Taylor and Francis: New York:pp 259-278.
- Lanktree MB, Hegele RA, Yusuf S, Anand SS. 2009. Multi-ethnic genetic association study of carotid intima-media thickness using a targeted cardiovascular SNP microarray. *Stroke* 40(10):3173-9.
- Li HS, Xu XZ, Montell C. 1999. Activation of a TRPC3-dependent cation current through the neurotrophin BDNF. *Neuron* 24(1):261-73.

- 1  
2  
3 Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA, Martin ER. 2007. No gene is an island: the flip-flop phenomenon. *Am J Hum Genet* 80(3):531-8.
- 4 Meents JE, Neeb L, Reuter U. 2010. TRPV1 in migraine pathophysiology. *Trends Mol Med* 16(4):153-9.
- 5 Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from  
6 human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16(3):1215.
- 7 Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, Andahazy M, Story GM,  
8 Patapoutian A. 2005. Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor  
9 sensor in the skin. *Science* 307(5714):1468-72.
- 10 Munsch T, Freichel M, Flockerzi V, Pape HC. 2003. Contribution of transient receptor potential channels  
11 to the control of GABA release from dendrites. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(26):16065-70.
- 12 Nicoletti P, Trevisani M, Manconi M, Gatti R, De Siena G, Zagli G, Benemei S, Capone JA, Geppetti P,  
13 Pini LA. 2008. Ethanol causes neurogenic vasodilation by TRPV1 activation and CGRP release  
14 in the trigeminovascular system of the guinea pig. *Cephalalgia* 28(1):9-17.
- 15 Nilius B, Owsianik G. 2010. Transient receptor potential channelopathies. *Pflugers Arch* 460(2):437-50.
- 16 Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, Lamerdin JE,  
17 Mohrenweiser HW, Bulman DE, Ferrari M and others. 1996. Familial hemiplegic migraine and  
18 episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4. *Cell*  
19 87(3):543-52.
- 20 Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, Story GM, Colley S,  
21 Hogenesch JB, McIntyre P and others. 2002. A heat-sensitive TRP channel expressed in  
22 keratinocytes. *Science* 296(5575):2046-9.
- 23 Pietrobon D. 2005. Migraine: new molecular mechanisms. *Neuroscientist* 11(4):373-86.
- 24 Purcell S, Cherny SS, Sham PC. 2003. Genetic Power Calculator: design of linkage and association  
25 genetic mapping studies of complex traits. *Bioinformatics* 19(1):149-50.
- 26 Schwedt TJ, Krauss MJ, Frey K, Gereau RWt. 2011. Episodic and chronic migraineurs are hypersensitive  
27 to thermal stimuli between migraine attacks. *Cephalalgia* 31(1):6-12.
- 28 Smith GD, Gunthorpe MJ, Kelsell RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, Wright JE, Jerman JC, Walhin JP,  
29 Ooi L and others. 2002. TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein. *Nature*  
30 418(6894):186-90.
- 31 Smith PJ, Zhang C, Wang J, Chew SL, Zhang MQ, Krainer AR. 2006. An increased specificity score  
32 matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. *Hum Mol Genet*  
33 15(16):2490-508.
- 34 Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. 2001. A new statistical method for haplotype reconstruction from  
35 population data. *Am J Hum Genet* 68(4):978-89.
- 36 Story GM, Peier AM, Reeve AJ, Eid SR, Mosbacher J, Hricik TR, Earley TJ, Hergarden AC, Andersson  
37 DA, Hwang SW and others. 2003. ANKTM1, a TRP-like channel expressed in nociceptive  
38 neurons, is activated by cold temperatures. *Cell* 112(6):819-29.
- 39 Suzuki M, Van Paesschen W, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, Legius E, Riant F, De  
40 Jonghe P, Li Y and others. 2010. Defective membrane expression of the Na(+)-HCO(3)(-)  
41 cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine. *Proc Natl Acad Sci U S A*  
42 107(36):15963-8.
- 43 Tobler AR, Short S, Andersen MR, Paner TM, Briggs JC, Lambert SM, Wu PP, Wang Y, Spoonde AY,  
44 Koehler RT and others. 2005. The SNPlex genotyping system: a flexible and scalable platform  
45 for SNP genotyping. *J Biomol Tech* 16(4):398-406.
- 46 Touchman JW, Anikster Y, Dietrich NL, Maduro VV, McDowell G, Shotelersuk V, Bouffard GG,  
47 Beckstrom-Sternberg SM, Gahl WA, Green ED. 2000. The genomic region encompassing the  
48 nephropathic cystinosis gene (CTNS): complete sequencing of a 200-kb segment and discovery  
49 of a novel gene within the common cystinosis-causing deletion. *Genome Res* 10(2):165-73.
- 50 Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, Amadesi S, Gray J, Jerman JC,  
51 Brough SJ and others. 2002. Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the  
52 vanilloid receptor-1. *Nat Neurosci* 5(6):546-51.
- 53 Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, Hatt H. 2007.  
54 Monoterpenoid agonists of TRPV3. *Br J Pharmacol* 151(4):530-40.
- 55 Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, Boettger MB, Beck GE,  
56 Englehardt RK, Carmi R and others. 2002. Mutation of TRPM6 causes familial  
57 hypomagnesemia with secondary hypocalcemia. *Nat Genet* 31(2):171-4.
- 58 Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, Ge P, Lilly J, Silos-Santiago I, Xie Y  
59 and others. 2002. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature*  
60 418(6894):181-6.

- 1  
2  
3 Xu Z, Taylor JA. 2009. SNPinfo: integrating GWAS and candidate gene information into functional SNP  
4 selection for genetic association studies. *Nucleic Acids Res* 37(Web Server issue):W600-5.  
5 Zaganichnaya TK, Wu X, Villereal ML. 2005. Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins  
6 combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells. *J Biol Chem* 280(33):29559-  
7 69.  
8 Zaykin DV, Shibata K. 2008. Genetic flip-flop without an accompanying change in linkage  
9 disequilibrium. *Am J Hum Genet* 82(3):794-6; author reply 796-7.  
10 Zygumt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED.  
11 1999. Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide.  
12 *Nature* 400(6743):452-7.  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

1  
2  
3 **FIGURE LEGEND**  
4  
5  
6

7 **Fig 1** Linkage disequilibrium patterns within the *TRPM8* gene. Haploview R-square matrix of the *TRPM8*  
8  
9 SNPs that were genotyped in the present study and rs17862920 (boxed), the SNP found nominally  
10  
11 associated with MA in a previous GWAS (Anttila and others 2010). The numbers indicate  $r^2$  values  
12  
13 between SNPs  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60

For Peer Review

**Table 1.** Results of the case-control association study of 149 SNPs from 14 genes of the TRP channels family in 555 migraine patients (323 migraine without aura, 232 migraine with aura) and 555 screened controls in a discovery population. Replication study of the nominally associated SNPs in a population of 485 migraine patients (158 migraine with aura and 327 migraine without aura) and 482 screened controls.

	Discovery Population				Replication Population			
	MAF		Log		P value		P value	
	(Case-Control)	Add	Dominant	Recessive	(Case-Control)	Log Add	Dominant	Recessive
<b>Migraine without Aura</b>								
<i>TRPCI</i>	rs7639403	(0.16-0.21)	0.010					
<i>TRPC7</i>	rs871385	(0.45-0.40)	0.018					
<i>TRPM8</i>	rs11563056	(0.29-0.36)	0.004					
<b>Migraine with Aura</b>								
<i>TRPA1</i>	rs7819749	(0.48-0.43)	0.039					
<i>TRPC4</i>	rs9576354	(0.47-0.38)	0.001					
<i>TRPV3</i>	rs7217270	(0.46-0.39)	0.018	NS	(0.43-0.36)	0.024	0.043	NS
	rs11078454	(0.47-0.39)	0.005					
<i>TRPV4</i>	rs10850830	(0.44-0.49)	0.041					
<i>TRPM4</i>	rs11668962	(0.51-0.46)	0.046					
<i>TRPM8</i>	rs4663994	(0.35-0.30)	0.049					
<i>TRPV1</i>	rs4790522	(0.38-0.44)	0.044					
	rs182637	(0.52-0.45)	0.014					
<b>All migraine patients</b>								
<i>TRPC4</i>	rs2151438	(0.48-0.44)	0.041					
	rs3904512	(0.45-0.39)	0.007					
	rs1577007	(0.40-0.44)	0.038					
<i>TRPM8</i>	rs12465950	(0.31-0.27)	0.03					
	rs6758653	(0.36-0.40)	0.033					
<i>TRPV1</i>	rs222741	(0.19-0.23)	0.045	NS	(0.20-0.24)	0.03	0.003	NS
<i>TRPM6</i>	rs9650767	(0.38-0.43)	0.010	0.035	0.036	0.011	NS	0.009

TRP, Transient Receptor Potential. SNP, single nucleotide polymorphism. MAF, Minor Allele Frequency. Log Add, Log-Additive model. NS, Not significant.

**Table 2.** Multiple marker analysis of genes showing nominal association with MO, MA or all-migraine patients using the UNPHASED software. Only significant results are included.

Gene / Subgroup Haplotype Marker*	Allelic Combination	Cases (%)	Controls (%)	Global <i>P</i> -value	Odds Ratio [95% CI]	Adjusted <i>P</i> -value
<b>TRPC1 / MO</b>						
4 5	C G	519 (0.85)	827 (0.80)	0.0206	1.37 [1.05 –1.80]	0.026
<b>TRPC4 / MA</b>						
1 17 22	T A C	115 (0.29)	170 (0.18)	0.0026	1.87 [1.42-2.46]	0.0002
<b>TRPV1 / MA</b>						
1 6 9 11	G A T G	76 (0.26)	312 (0.39)	0.0005	1.86[1.38 -2.51]	0.00079
<b>TRPV3 / MA</b>						
3 6 13	G C T	84 (0.20)	131 (0.13)	0.0001	1.68 [1.24-2.28]	0.0171
<b>TRPV4 / MA</b>						
6 7	T C	189 (0.44)	352 (0.34)	0.018	1.51 [1.20 – 1.90]	0.0112
<b>TRPM6 / all-migraine</b>						
1 5 7 8 14	G C A A C	84 (0.13)	37 (0.06)	0.0033	2.42 [1.61-3.62]	0.0013
<b>TRPM8 / all-migraine</b>						
1 9 13	C T G	72 (0.07)	40 (0.04)	0.0134	1.76 [1.19-2.61]	0.0482

MA, Migraine with aura; MO, Migraine without aura; CI, Confidence interval.

Haplotype markers: *TRPC1*: 4 (rs7639403), 5 (rs9851381); *TRPC4*: 1 (rs9547988), 17 (rs3904512), 22 (rs9650767); *TRPM6*: 1 (rs9650767), 5 (rs12339024), 7 (rs2151423), 8 (rs7858755), 14 (rs7867868); *TRPM8*: 1 (rs758275), 8 (rs12465950), 9 (rs11563056), 13 (rs6758653), 15 (rs11563200); *TRPV1*: 1 (rs7223530), 6(rs161393), 9 (rs733080), 11 (rs182637); *TRPV3*: 3 (rs7218756), 6(rs11078454), 13 (rs2455858); *TRPV4*: 6 (rs10774912), 7(rs10850830).

\*The *TRPA1*, *TRPC7* and *TRPM4* genes contained individual markers nominally associated with the disease but none of them displayed an associated haplotype.

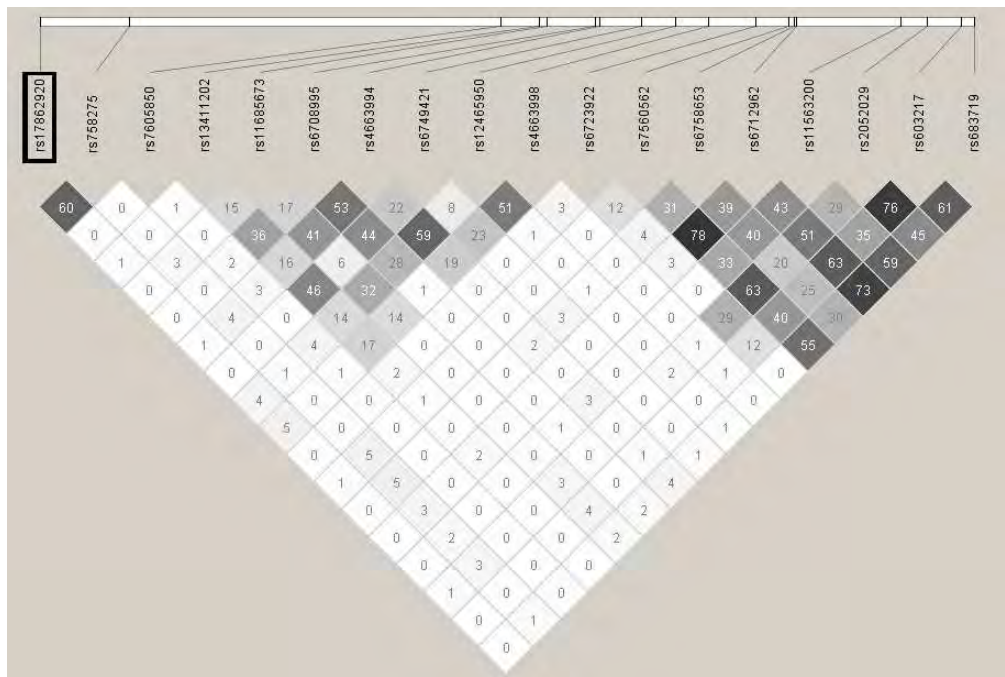
Table 3. Results of the pooled case-control association study of the SNPs from the *TRPV1*, *TRPV3* and *TRPM6* genes, which showed nominally significant association in the discovery sample. This analysis includes the discovery and the replication sets, with 1040 migraine patients (650 migraine without aura, 390 migraine with aura) and 1037 screened controls.

Gene SNP	All Migraine patients			MA			MO		
	Log Add	Dominant	Recessive	Log Add	Dominant	Recessive	Log Add	Dominant	Recessive
<b>TRPV3</b> rs7217270	0.0138	0.0681	0.025	0.0011	0.0074	0.0094	0.2475	0.4958	0.1938
<b>TRPV1</b> rs222741	0.0033	0.0005	0.8583	0.027	0.0198	0.4959	0.0109	0.0015	0.8284
<b>TRPM6</b> rs9650767	0.9398	0.6397	0.6617	0.7165	0.3293	0.5858	0.88	0.9719	0.8189

SNP, Single Nucleotide Polymorphism . MA, Migraine with Aura. MO, Migraine without Aura. Log Add, Log-Additive model.



1  
2  
3  
4  
5  
6  
7  
8  
9  
10  
11  
12  
13  
14  
15  
16  
17  
18  
19  
20  
21  
22  
23  
24  
25  
26  
27  
28  
29  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50  
51  
52  
53  
54  
55  
56  
57  
58  
59  
60



Linkage disequilibrium patterns within the TRPM8 gene. Haploview R-square matrix of the TRPM8 SNPs that were genotyped in the present study and rs17862920 (boxed), the SNP found nominally associated with MA in a previous GWAS (Anttila et al. 2010). The numbers indicate r2 values between SNPs  
240x161mm (96 x 96 DPI)

Review

**Supplementary Table 1:** SNP selection for the SNPlex genotyping assay covering 14 genes of the Transient Receptor Potential channel superfamily.

Gene	SNP_ID	Position	Allele	Controls		Case-control P-value(*)			SNPs captured
				MAF	HWE (p-value)	MA	MO	All migraine	
<b>TRPA1</b>	rs7018446	3' near gene	A/C	0.52	0.44	0.1195	0.9186	0.3568	rs4738200
	rs4738201	3' near gene	G/A	0.52	0.54	in LD with rs7018446 (r2=0.996)			singleton
	rs2044270	3' UTR	T/A	0.62	1	0.2172	0.8703	0.42813	singleton
	rs9298197	3' UTR	G/T			39.88 % missing**			singleton
	rs13268757	p.C3R	A/G			39.20 % missing**			singleton
	rs16937976	p.T58R	C/G	0.83	0.44	0.6123	0.6401	0.55798	singleton
	rs10091093	intron	C/T			100% missing**			rs16937933, rs10104927, rs10109581, rs13266501, rs10104081, rs2305017, rs7011222, rs7011431, rs2028708
	rs920829	p.K179E	G/A	0.9	1	0.8237	0.4685	0.54274	singleton
	rs7819749	p.N186K	G/T	0.58	0.1	0.0393	0.6499	0.15489	rs4738204, rs3779755, rs920830, rs10104272, rs2383846, rs1811457, rs7010969, rs13269625, rs1384002
	rs3779754	intron	G/C			100% missing**			rs10100108, rs3824152, rs10107349, rs1373302, rs4737338, rs3735942, rs3824150, rs12541196, rs12541199, rs12541200, rs12548486, rs10101155, rs12677736, rs7824377, rs1443952, rs1373297, rs4738205, rs1822571, rs1968584, rs4738206, rs10111216
	rs7836192	intron	T/G			100% missing**			rs1025929, rs3735943, rs3735944, rs10504526, rs6472657
	rs1025928	intron	C/T			85% missing**			rs2383844, rs4737339, rs11990722, rs1562054, rs2120474, rs1842663
	rs13259803	intron	C/T	0.69	0.69	0.6711	0.9511	0.85194	rs13255063, rs13249568, rs10504523, rs2044271, rs2044272, rs10504524, rs2120473, rs6982184, rs13252489
	rs4738202	intron	G/A	0.69	0		HWE***		singleton
	rs13279503	intron	G/C	0.61	1	0.7928	0.8024	0.76052	singleton
	rs959976	p.R1018H	T/C	0.83	0.35	0.3861	0.4432	0.32434	singleton
	rs2383841	intron	G/A	0.52	0.66	0.1062	0.6791	0.25413	rs1384001, rs959974, rs2383842
	rs2587562	5' near gene	G/A	0.55	0.48	0.3963	0.907	0.60282	singleton
	<b>TRPC1</b>	rs13094259	intron	G/T	0.8	0.34	0.3941	0.3093	0.24096
rs4607150		intron	C/T	0.75	0.4	0.0585	0.3785	0.68965	singleton
rs13086677		intron	C/T	0.79	0.36	0.5511	0.5262	0.45213	singleton
rs7639403		intron	C/T	0.79	0.02	0.8235	0.0096	0.10768	rs2049328, rs2354856, rs2177398, rs7638459, rs9836269, rs6803681, rs6440108, rs1382688, rs7621642, rs9864230, rs7637846, rs9815607, rs4643748, rs2033912, rs7641514, rs9868886, rs9849461
rs9851381		intron	G/A	0.8	0.49	in LD with rs7639403 (r2=0.889)			rs3821647, rs4259003, rs7610200
rs11715459		5' near gene	A/G			100% missing**			singleton
<b>TRPC3</b>	rs6841843	3' near gene	T/C	0.71	0.35	0.691	0.093	0.35218	rs17517624
	rs906493	intron	T/C	0.66	0.63	0.5629	0.2614	0.64832	rs11726196, rs4292355
	rs884701	intron	C/T	0.72	1	0.4761	0.8172	0.81245	rs10518289, rs7672879, rs13151345, rs953691, rs13131003, rs13133876, rs13143218, rs11732666, rs3805158, rs951974, rs13127488, rs1507993, rs13141092, rs906496, rs1507991, rs3805161, rs2292232, rs4833778, rs11721457
	rs2892973	intron	T/C	0.66	0.08	0.2415	0.2291	0.84142	rs12502635
	rs4076212	5' near gene				100% missing**			singleton

TRPC4	rs9547988	3' near gene	T/G	0.67	1	0.8138	0.4277	0.6795	rs9547994, rs9547996, rs9547997, rs9547998, rs9548000, rs9532093, rs9548003, rs7330679, rs7321872, rs9532095, rs7321585, rs9548026, rs11843893, rs11147662, rs9547991
	rs10161932	3' UTR	C/T	0.81	0.88	0.6669	0.9031	0.74899	singleton
	rs7332871	intron	C/T	0.59	0.86	0.6195	0.4494	0.8013	rs1570609, rs7997809, rs4943528, rs2985167, rs1570608, rs9532099
	rs7336008	intron	G/A	0.63	0.65	0.5158	0.9406	0.76633	rs12856733, rs9576329, rs9566245, rs2985170, rs9566246, rs9566247, rs9566248, rs9566249, rs9603244, rs9594224, rs9603245, rs9594226, rs9603246, rs1924289, rs2025407, rs7337477, rs7337173, rs9576328, rs7338239, rs2957218, rs2957215, rs2957214, rs4450268, rs2147124, rs9576332, rs9594225, rs4943529, rs9576335, rs9576338, rs7320775, rs4284516, rs12871022, rs7325911, rs7336516, rs7336526, rs9532096, rs9532098, rs4943532, rs9548012, rs1333353, rs9532097, rs7330896, rs4943531, rs2985164
	rs8001743	intron	A/G	0.55	0.34	0.7234	0.2202	0.29482	rs2181747, rs1924304, rs9594229
	rs17056448	intron	A/G	0.68	1	0.1643	0.5205	0.74616	singleton
	rs7317546	intron	A/T	0.59	0.06	0.9049	0.8713	0.95544	rs8002313
	rs1413002	intron	A/G	0.61	0.4	0.6647	0.6241	0.56384	rs978156
	rs1344351	intron	T/C	0.53	0.26	0.2267	0.7594	0.39557	rs1333360, rs1333362, rs9315508, rs7319926, rs7332772
	rs1360623	intron	A/C	0.57	0.54	0.578	0.1428	0.48891	singleton
	rs1360624	intron	A/G	0.52	0.93	0.5228	0.3708	0.78659	singleton
	rs1577007	intron	T/C	0.56	0.42	0.1421	0.057	0.03772	rs7997030, rs1029117, rs1556541, rs2151443, rs11616422
	rs12874552	intron	T/C	0.62	0.11	0.0899	0.1358	0.05604	rs12430948, rs11147671
	rs9548043	intron	A/G	0.67	0.33	0.5268	0.5725	0.97165	rs914862, rs9548036, rs9548039, rs1360625, rs2025404, rs763969, rs9548037
	rs9315511	intron	A/G	0.75	0.72	0.5832	0.1597	0.21084	rs4943534, rs4943538, rs8000744
	rs12869943	intron	A/G	0.73	0.83	0.3101	0.718	0.42028	singleton
	rs3904512	5' UTR	G/A	0.61	0.46	0.0318	0.0318	0.03184	rs9315514, rs9594231, rs7993498
	rs12583681	5' UTR	G/A	0.87	0.58	0.86	0.9299	0.87701	singleton
	rs2151438	intron	A/G	0.56	0.41	0.1046	0.0849	0.04071	rs1319667, rs1333373, rs9315512, rs9576350, rs1333374, rs1333376, rs9315513, rs9576351, rs9548048, rs7339215, rs933006, rs9532115, rs9532116, rs4460944, rs1556543, rs7330192, rs1855253
	rs7331005	intron	A/T	0.58	0.15	0.5616	0.3401	0.34468	rs7327037
	rs1924377	intron	G/C	0.57	0.06	0.2695	0.213	0.15168	rs1924378
	rs9576354	intron	T/C	0.62	0.52	0.0014	0.2469	0.01084	singleton
	rs1333377	intron	G/C	0.55	0.11	0.8819	0.8248	0.79694	singleton
	rs9548050	intron	A/G	0.6	0.22	0.5489	0.2483	0.62856	singleton
	rs655207	intron	T/G	0.59	0.72	0.3172	0.2471	0.79996	rs7337719, rs9635087, rs668684, rs6650469, rs639445, rs639099, rs604580, rs9566254
	rs625221	intron	C/T	0.71	0.84	0.1888	0.7633	0.35754	
	rs9548067	intron	C/T	0.79	0.51	0.4508	0.1557	0.16973	rs9532126, rs2104326, rs9548074
	rs9576388	intron	C/A	0.73	0.57	in LD with rs3812840 (r2=0.899)			rs9576388, rs3812837, rs1538144, rs1415601, rs1924379, rs1337601, rs1538146
	rs9548085	intron	T/C	0.51	0.66	0.0891	0.5102	0.62993	rs9548086, rs4144140, rs1538145, rs1538148, rs2323637
	rs12583681	5' UTR	A/G						SNPlex design pipeline*
	rs4617713	intron	G/T						SNPlex design pipeline* singleton

	rs1333358	intron	C/T				24.4% missing**		rs17262400, rs12875577, rs1924301, rs2184124, rs12875518, rs12861121, rs1924300, rs12858218, rs2025402, rs11147667, rs11618049, rs12854825, rs11147670, rs12874443
	rs612308	intron	A/G				57.5% missing**		rs612701, rs4943540, rs603955, rs535728
	rs7322054	intron	A/C				44.2% missing**		rs9532107, rs9548033, rs9532108
	rs9532117	intron	A/G				20.99% missing**		singleton
	rs1333354	intron	C/G				100% missing**		singleton
	rs6563569	intron	C/T				100% missing**		singleton
	rs1413005	intron	GT				57.55% missing**		singleton
	rs3812840	5' near gene	T/C	0.71	0.11	0.0679	0.7804	0.23725	rs3812841
<b>TRPC5</b>	rs4893412	intron	A/G	0.74	0.98	0.4421	0.4267	0.33763	singleton
	rs17222608	intron	A/C	0.8	0.7	0.4035	0.8219	0.54037	singleton
	rs7056863	intron	A/G	0.87	0.32	0.619	0.6686	0.99641	rs16986725
	rs2223497	intron	G/A	0.89	0.58	0.3617	0.1355	0.13348	rs6655168, rs16986742, rs7060242, rs12011058, rs7052164, rs7888649, rs7064992, rs7060180, rs16986746, rs16986748, rs12011265, rs16986754, rs10521540, rs7892137, rs7876948, rs7054642, rs16986757, rs12014370, rs7891976, rs12014696, rs7891415, rs7061480, rs4534285, rs12011820, rs6642976
	rs4893414	intron	A/G				SNPlex design pipeline*		singleton
<b>TRPC7</b>	rs871385	intron	G/A	0.61	0.31	0.9444	0.0177	0.11941	rs7731706, rs13173271, rs11959071, rs889012, rs13157486, rs7728953, rs3734123
	rs6596299	intron	C/A	0.54	0.93	0.3647	0.0555	0.07396	rs2194138, rs6893792, rs889010, rs10463951, rs2287746
	rs2042243	intron	G/A	0.86	0.05	0.3476	0.3106	0.84283	singleton
	rs6868895	intron	A/G	0.67	0.7	0.3428	0.7089	0.43923	rs1477322, rs17170027, rs13155582
	rs17762209	intron	T/G	0.83	0.06	0.1433	0.1439	0.07242	singleton
	rs10042289	intron	C/T	0.59	0.93	0.8313	0.2244	0.48357	rs1909544, rs344824, rs1499765, rs10477781, rs6596300, rs12515960, rs4976490
	rs11748766	intron	T/C	0.82	0.06	0.1107	0.2802	0.10998	singleton
	rs12518787	intron	G/T	0.54	0.67	0.7797	0.0865	0.1922	rs4976491, rs3777151, rs4976488, rs950715, rs7701815, rs2881486, rs3777154, rs1499775, rs17763790, rs344823, rs12515628, rs180767, rs237613, rs1392170, rs4976370, rs2017353, rs1469067, rs10055133, rs1392172, rs344828, rs171101, rs11744916, rs3777150
	rs2673931	intron	A/G	0.68	1	0.9661	0.2555	0.44865	rs4976489, rs1477323, rs2546657, rs953096, rs4976487, rs2546658, rs2546659, rs2546660, rs2649699, rs4976485, rs10070699, rs2216640, rs1303813, rs4976368, rs4976369, rs10067383, rs1499764, rs11744181, rs3822748, rs344825, rs344826, rs13157395
	rs2673930	intron	A/C	0.73	0.16	0.9917	0.5829	0.70291	rs2673926, rs7727558, rs2161382
	rs963590	intron	T/C	0.73	0.39	0.9202	0.3401	0.48047	singleton
	rs2546651	intron	A/G				37.94% missing		singleton
<b>TRPM4</b>	rs3745297	5' near gene	A/C	0.55	0.72	0.5002	0.0981	0.13723	singleton
	rs3745298	5' near gene	C/T	0.52	0.93	0.3755	0.1739	0.15975	singleton
	rs11667393	intron	A/G	0.75	0.65	0.4203	0.4927	0.36844	singleton
	rs12979689	intron	G/A	0.74	1	0.3227	0.8115	0.71003	singleton
	rs1175806	intron	T/C	0.67	0.01	0.0524	0.6558	0.17213	rs12981989, rs10403114, rs1175791, rs909010, rs4802586, rs3760666, rs7252170
	rs11668962	3' near gene	G/A	0.55	0.93	0.0461	0.853	0.32915	singleton

	rs3745300	5' near gene					56.91% missing**	singleton	
	rs12461216	intron	C/G				SNPlex design pipeline*	singleton	
	rs3760663	5' UTR	A/G				SNPlex design pipeline*	singleton	
<b>TRPM6</b>	rs9650767	intron	G/A	0.57	0.48	0.0606	0.0225	0.00975	singleton
	rs875034	intron	G/A	0.51	0.25	0.277	0.7894	0.43441	rs1759831
	rs12551900	intron	T/C	0.73	0.27	0.9377	0.9592	0.94011	singleton
	rs2769195	intron	T/C	0.64	0.51	0.5738	0.4973	0.87866	rs2769195, rs11144082, rs514348
	rs12339024	intron	T/C	0.58	0.33	0.6266	0.2621	0.6181	rs6560408, rs7018938
	rs13299138	intron	G/T	0.71	0.83	0.3288	0.3459	0.24004	singleton
	rs2151423	intron	A/G	0.56	0.06	0.4914	0.3485	0.30881	rs11144085
	rs7858755	intron	A/G	0.75	0.73	0.469	0.9704	0.6814	rs2151424
	rs3858116	intron	G/A	0.65	0.56	0.8904	0.4892	0.6809	singleton
	rs7859201	synonymous	A/C	0.6	1	0.8504	0.5444	0.74944	rs12336062, rs7045338, rs7859884
	rs17060550	intron	A/C	0.76	0.64	0.3674	0.4244	0.95796	rs10512038, rs17060535, rs17060538, rs12115672, rs9942942, rs4300062, rs7024831
	rs1012710	intron	T/C	0.72	0.52	0.7945	0.9856	0.88125	singleton
	rs7045949	intron	T/C	0.54	0.16	0.5597	0.8549	0.65931	rs2376269, rs6560414
	rs7867868	intron	C/T	0.61	0.07	0.3032	0.8178	0.68799	rs9650770, rs11144123
	rs4431653	intron	C/T	0.65	0.15	0.9028	0.2297	0.44672	rs6560416
	rs2184118	intron	G/A	0.67	0.33	0.472	0.1916	0.61531	rs7027629, rs10869447, rs10869452, rs17060601, rs11144108, rs2104932, rs11144113
	rs1333341	intron	G/C	0.6	0.58	0.5789	0.9693	0.73306	rs4745363, rs11144130, rs1333342
	rs1333343	intron	T/C	0.8	0.49	0.7313	0.2934	0.3724	rs10746966, rs7853685
	rs476673	intron	A/G						58.76% missing**
	rs2274924	p.E1584K	C/T						SNPlex design pipeline*
<b>TRPM7</b>	rs11070795	3' UTR	A/G	0.68	0.84	in LD with rs644890 (r2=0.90)			rs8035534
	rs8042919	p.T1482I	G/A	0.89	0.09	0.1467	0.1261	0.06741	singleton
	rs644890	intron	T/C	0.65	0.51	0.8274	0.2658	0.38865	rs473357, rs539383, rs567109, rs480280, rs616256, rs512708, rs493728, rs506693, rs577583, rs7163283, rs7175149, rs11635045, rs12324599, rs11636930, rs7165721, rs4775899, rs7178070, rs11636576, rs11630165, rs2292175, rs2899463, rs491907, rs8042320
	rs3848127	intron	G/A	0.75	0.1	0.9531	0.1687	0.38208	rs1060599, rs4775892, rs17520350, rs17520448, rs17598819, rs998831
	rs11636964	intron	A/G	0.52	0.07	0.7181	0.8998	0.89933	rs3101853, rs2630, rs3131580, rs3109888, rs3131578, rs3131577, rs3105590, rs3105591, rs2414060, rs3109891, rs3109892, rs3109895, rs17645523, rs11070798, rs3848129, rs3848130, rs12439744, rs3101852, rs12438305, rs12442787, rs2292174, rs8023644, rs2011064, rs3109894, rs3131576, rs874665, rs7174839, rs3105592, rs2414059, rs4775894
	rs17520378	intron	G/C	0.86	0.86	0.5579	0.8857	0.66495	singleton
	rs12593556	intron	A/T						56.57% missing**
	rs2115671	intron	C/G						100% missing**
<b>TRPM8</b>	rs758275	intron	T/C	0.81	0.17	0.2358	0.6328	0.32995	rs6431648, rs7604471, rs4233636, rs4663986, rs758276, rs737636, rs10189040, rs10490012, rs6711120, rs13418652, rs2302153, rs11892538, rs11563063, rs6738979, rs1965629, rs10166942, rs2362290, rs1003540, rs10170399, rs9646720
	rs7605850	intron	T/C	0.59	0.15	0.6367	0.1321	0.45496	rs13401339, rs10171428
	rs13411202	intron	A/G	0.64	0.85	0.9085	0.2724	0.50034	singleton
	rs11685673	intron	C/A	0.79	1	0.2683	0.2806	0.18395	singleton

	rs6708995	intron	T/G	0.51	0.3	0.6359	0.2064	0.25995	rs6736916, rs11689034, rs728672, rs6718140
	rs4663994	intron	C/G	0.7	0.92	0.0495	0.1966	0.05455	rs4663992, rs4233637, rs4233638
	rs6749421	intron	A/G	0.62	0.31	0.9839	0.3258	0.50227	rs10207672
	rs12465950	intron	C/T	0.73	0.37	0.1346	0.0461	0.02963	rs11563208
	rs11563056	intron	T/G	0.64	0.05	0.6771	0.004	0.0275	singleton
	rs4663998	intron	G/T	0.56	0.86	0.1002	0.1422	0.05789	rs4663999, rs1024608, rs1024607, rs2362294
	rs6723922	intron	T/C	0.56	0.24	0.6003	0.4202	0.40474	singleton
	rs7560562	intron	T/C	0.67	0.77	0.5434	0.9069	0.8068	singleton
	rs6758653	intron	G/A	0.6	0.47	0.0822	0.0817	0.03295	rs6718140, rs12999395
	rs6712962	intron	T/C	0.6	0.66	0.9632	0.2219	0.39001	singleton
	rs11563200	intron	A/G	0.56	0.86	0.1759	0.0965	0.06144	rs10929331, rs599294, rs11675108
	rs2052029	3' UTR	C/G	0.7	0.41	0.353	0.7262	0.80413	rs6431652, rs2052030, rs6431651, rs1118259, rs28948678, rs4664001, rs2190951, rs4664000, rs6721761, rs6734618, rs1024687
	rs603217	3' near gene	G/C	0.63	0.85	0.7788	0.137	0.24337	rs7371495
	rs683719	5' near gene	A/G	0.58	0.23	0.7923	0.143	0.39405	singleton
	rs10929320	intron	T/C				44.60% missing**		singleton
	rs10929321	intron	G/A				100% missing**		singleton
	rs758277	intron	T/C				46.37% missing**		singleton
	rs602312	5' near gene	C/G				SNPlex design pipeline*		rs11675064, rs591103, rs602371
	rs6727222	intron	G/T				SNPlex design pipeline*		singleton
<b>TRPV1</b>	rs2277679	intron	G/C				SNPlex design pipeline*		singleton
	rs161376	intron	C/T				SNPlex design pipeline*		singleton
	rs879207	3' near gene	C/A	0.56	0.43	0.0443	0.895	0.31319	singleton
	rs7223530	3' near gene	G/C	0.68	0.69		in LD with rs879207 (r2=0.93)		rs7406509, rs17632843
	rs4790522	3' UTR	C/A	0.56	0.43	0.0443	0.895	0.31319	singleton
	rs877610	synonymous	C/T	0.97	0		HWE***		singleton
	rs8065080	p.V585I	T/C	0.6	0.59	0.618	0.6863	0.99911	rs8078936
	rs150908	intron	G/A	0.62	0.85	0.3672	0.932	0.57637	singleton
	rs3826501	intron	G/A	0.74	0.14	0.4185	0.8978	0.71661	rs17706630
	rs161393	intron	A/G	0.68	1	0.1156	0.7581	0.27844	rs224534, rs224536, rs12936340
	rs222747	p.I315M	C/G	0.79	0.52	0.1432	0.3577	0.15654	singleton
	rs222749	p.S91P	C/T	0.96	0.15	0.5399	0.911	0.67326	singleton
	rs733080	intron	T/C	0.71	0.76	0.2179	0.9388	0.4684	rs2277675, rs7217945
	rs222741	intron	T/C	0.77	0.46	0.0873	0.1159	0.04485	rs460716, rs465563
	rs182637	intron	G/A	0.55	0.07	0.0143	0.4169	0.05685	singleton
	rs224546	intron	C/T				39.73% missing**		rs224547
	rs4790151	intron	A/G				100% missing**		rs9902581, rs161365, rs877611, rs11655540
	rs150846	intron	A/G				100% missing**		singleton
	rs161364	intron	T/C				100% missing**		singleton
<b>TRPV2</b>	rs3813769	5' UTR	A/G	0.71	0.46	0.2757	0.7081	0.39988	singleton
	rs4792738	intron	G/A	0.71	0.83	0.3326	0.8525	0.49811	rs8079271
	rs8079010	intron	C/T	0.66	0.77	0.7174	0.2689	0.34318	singleton
	rs11078341	intron	G/C	0.62	0.78	0.8122	0.4802	0.72214	rs7222754, rs8121, rs7223205, rs4792742, rs1129235, rs7208718, rs7214366, rs4072454, rs3935801, rs9251, rs7215836
	rs12936240	intron	G/T	0.74	1	0.7628	0.8957	0.7933	singleton
	rs11871958	3' near gene	T/C	0.73	0.91	0.5452	0.7554	0.88806	singleton
	rs4561507	intron	G/C				22.42% missing**		rs7217735
<b>TRPV3</b>	rs7208811	3' UTR	A/C	0.61	0.79	0.8607	0.4619	0.68442	rs2271158
	rs7219780	intron	T/C	0.52	0.33	0.6703	0.1791	0.50001	singleton
	rs7218756	intron	A/G	0.5	1	0.9026	0.2078	0.43178	singleton
	rs7217270	intron	G/A	0.61	0.15	0.018	0.7346	0.12683	rs7216486, rs8079054, rs7207628, rs11656938, rs925102, rs17763099, rs17175319, rs925101

	rs9906883	intron	G/A	0.7	0.76	0.2515	0.1282	0.09582	rs12944105, rs8081785
	rs11078454	intron	T/C	0.61	0.58	0.0051	0.4687	0.04371	singleton
	rs4790145	intron	A/G	0.6	0.21	0.8871	0.1742	0.32714	rs365350
	rs395357	synonymous	T/C	0.51	0.23	0.8275	0.581	0.79964	singleton
	rs322942	intron	A/G	0.5	1	0.9574	0.4369	0.57054	rs322943
	rs11078458	synonymous	G/T	0.59	1	0.9154	0.7511	0.87783	singleton
	rs322937	p.G117R	A/G	0.59	0.79	0.7785	0.6205	0.85538	singleton
	rs1039519	synonymous	A/G	0.6	0.85	0.3898	0.8344	0.53701	singleton
	rs2455858	intron	T/A	0.59	0.65	0.2539	0.8811	0.47416	singleton
	rs1699138	intron	C/T	0.72	0.91	0.7624	0.7534	0.9551	singleton
	rs4790519	intron	T/C	0.58	0.6	0.3744	0.6124	0.88898	singleton
	rs322962	intron	C/T	0.68	0.31	0.6467	0.8663	0.90143	singleton
	rs9911213	intron	A/G					100% missing**	rs422159, rs661835
	rs12451131	intron	C/T					22.42% missing**	singleton
	rs322964	intron	C/G					100% missing**	singleton
	rs7212403	intron	A/G					100% missing**	singleton
	rs4790520	5' near gene	C/T					100% missing**	singleton
	rs454106	intron	T/C					41.56% missing**	singleton
<b>TRPV4</b>	rs4766631	3' near gene	G/A	0.54	0.93	0.466	0.0615	0.38628	singleton
	rs11068274	intron	G/A	0.57	0.79	0.074	0.7326	0.22918	singleton
	rs1861810	intron	C/A	0.59	0.57	in LD with rs11068274 (r2=0.935)			singleton
	rs10735104	intron	C/T	0.51	1	0.8161	0.1676	0.41622	singleton
	rs3825394	synonymous	C/A	0.53	0.48	0.3904	0.9821	0.65751	rs10850783, rs1861809, rs10850801
	rs7971845	intron	C/G	0.74	0.09	0.5073	0.4794	0.38997	singleton
	rs10774912	intron	T/C	0.73	0.67	0.16	0.7868	0.34413	rs10850800, rs10850781, rs10774911, rs3742031, rs10744892
	rs10850830	5' near gene	C/T	0.51	0.34	0.0411	0.9491	0.26685	singleton

MAF, Minor Allele Frequency. SNP, Single Nucleotide Polymorphism. LD, Linkage Disequilibrium. HWE, Hardy-Weinberg Equilibrium.

\*SNPs Excluded from the case-control association study for the following reasons: \*Not passing through the SNPlex design pipeline; \*\*Genotyping Failure (the % of missing genotypes is indicated); \*\*\*Not in Hardy-Weinberg equilibrium in the control sample (p<0.01)

**Supplementary table 2.** Functional prediction of the associated SNPs and the variants located in the same bin set with FuncPred (Xu and Taylor 2009).

SNP	r <sup>2</sup>	Chr	Position	Allele	Nearby Gene	Distance (bp)	TFBS	Splicing (site)	Splicing (ESE or ESS)	Splicing (abolish domain)	miRNA (miRanda)	miRNA (Sanger)	nsSNP	Stop Codon	Polyphen	SNPs3D (svm profile)	SNPs3D (svm structure)	Regulation Potential Score	Conservation Score
rs222741	assoc	17	3455629	G/A	TRPV1	40139  3825	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0	0.004
rs460716	1	17	3458557	A/G	TRPV1/SHPK	43067/252  897/27808	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0	0
rs465563	0.883	17	3460468	A/G	SHPK	2163  25897	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.052963	0.001
rs7217270	assoc	17	3368225	A/G	TRPV3	4989  39814	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.07156	0
rs7216486	1	17	3368782	A/G	TRPV3	5546  39257	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.431906	1
rs7207628	1	17	3369289	G/T	TRPV3	6053  38750	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.411614	0
rs8079054	1	17	3369103	A/G	TRPV3	5867  38936	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.288679	0
rs11656938	0.966	17	3367787	C/G	TRPV3	4551  40252	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0	0
rs925102	0.966	17	3369116	A/C	TRPV3	5880  38923	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.288264	0.015
rs17175319	0.933	17	3370282	A/G	TRPV3	7046  37757	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0	0
rs17763099	0.933	17	3370189	C/T	TRPV3	6953  37850	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0	0
rs925101	0.932	17	3371257	C/T	TRPV3	8021  36782	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	--	0.305059	0

SNP: single nucleotide polymorphism. Chr: Chromosome. Bp: Base Pair. TFBS: transcription factor binding sites. ESE: exonic splicing enhancers. ESS: exonic splicing silencers. miRNA: microRNA. nsSNP: non synonymous SNP. Assoc: associated





# DISCUSSIÓ

---

L'objectiu principal d'aquest treball ha estat estudiar les causes genètiques i moleculars de la migranya en les dues formes d'herència que presenta la malaltia. Per això s'ha dividit el treball en dos capítols: malaltia monogènica i malaltia complexa. En aquesta discussió abordarem les dues formes d'herència per separat, seguirem amb unes consideracions generals sobre la nosologia i la genètica de la migranya i per últim discutirem les perspectives de futur en l'estudi d'aquesta patologia.

## 1. Anàlisi mutacional i funcional de gens prèviament relacionats amb les formes monogèniques de migranya

El cribratge dels dos gens FHM1/2 (*CACNA1A* i *ATP1A2*) en 19 pacients amb migranya hemiplègica (HM) ha permès identificar vuit mutacions dominants en heterozigosi suposadament responsables del fenotip patològic, la majoria de canvi de sentit, dues al gen *ATP1A2* i sis al gen *CACNA1A*. També s'ha identificat un canvi modulador del fenotip al gen *CACNA1A*.

### 1.1 Anàlisi del gen *CACNA1A*

El gen *CACNA1A* codifica la subunitat  $\alpha 1$  de canal  $Ca_v2.1$ . Fins ara s'han descrit 34 mutacions en HM de canvi de sentit.

La mostra inclou 19 pacients amb HM, dels quals nou són esporàdics. La seqüenciació del gen *CACNA1A* ha permès identificar una nova mutació i sis canvis prèviament descrits, dels quals dos han aparegut *de novo* en el pacient ja que no estan presents als seus progenitors. Sis d'aquests canvis donen com a resultat substitucions aminoacídiques, mentre que un altre, c.2175+9G>A, podria alterar l'*splicing*. Finalment, un dels set canvis, p.Ala454Thr, no seria la causa del trastorn sinó una variant moduladora del fenotip, tal i com es discutirà més endavant.

Deu pacients tenen diagnòstic FHM i nou pacients són SHM. S'han identificat tres mutacions en pacients FHM (3/10, 30%) i tres en els casos SHM o esporàdics (3/9, 33,3%). Comparant les dades d'aquest treball amb d'altres estudis previs, hi ha un únic treball en població espanyola, realitzat per membres del nostre equip de recerca, en què s'analitzaren 27 pacients per a mutacions en els gens *CACNA1A*, *ATP1A2* i *SCN1A* (en aquest darrer només s'inspeccionen

dues mutacions prèviament descrites en diversos pacients), amb un 27,3 % d'èxit en els pacients amb FHM (Cuenca-Leon et al. 2008). Aquests números no s'allunyen gaire dels percentatges aportats per altres treballs amb una variacions entre sèries que va del 14% al 56% (Ducros et al. 1999; Thomsen et al. 2007). Aquesta discrepància en la freqüència de mutacions observades entre sèries són un reflex de les diferències que hi ha entre les metodologies experimentals, el diagnòstic i/o els grups de pacients de cada treball (p.ex. en el treball de Ducros et al. la mostra inclou pacients amb FHM i atàxia cerebel·losa progressiva, mentre que la mostra de Thomsen et al. és d'origen poblacional; a més, en alguns casos en què es disposava de famílies, es féu una anàlisi de lligament prèvia).

La proporció d'individus que presenten mutacions en el gen *CACNA1A* és similar en els casos esporàdics (SHM) i en els familiars (FHM) de la nostra mostra. Diversos estudis han cercat mutacions als gens originalment relacionats amb FHM en pacients SHM (Terwindt et al. 2002; de Vries, B. et al. 2007; Thomsen et al. 2008; Riant et al. 2010; Zangaladze et al. 2010; Stam et al. 2011). Globalment, dels 191 pacients SHM analitzats en aquestes sèries, s'han identificat 15 canvis al *CACNA1A*, i per tant un 7,8% dels pacients presenta substitucions animoacídiques en aquest gen. Entre aquests canvis hi ha mutacions prèviament descrites en el fenotip FHM i canvis no descrits (no es fan estudis funcionals d'aquestes alteracions moleculars i per tant no està confirmat el seu efecte patogènic). Cal destacar l'estudi fet amb pacients SHM d'inici primerenc (inici clínic amb una mitjana d'edat de 7,7 anys) en què s'ha observat un elevat percentatge de mutacions (Riant et al. 2010). El nostre grup ha identificat les mutacions p.Ser218Leu i p.Tyr1387Cys *de novo* en dos pacients SHM amb un inici molt precoç del atac (3 i 5 anys, respectivament). La paternitat dels progenitors s'ha confirmat mitjançant la genotipació de marcadors de tipus microsatèlit distribuïts per tot el genoma (veure apartat 1.3.1 de la Discussió). Aquests resultats confirmen que la SHM comparteix espectre genètic amb la FHM però que també hi podria haver altres factors genètics involucrats.

### 1.1.1 Descripció de les variants identificades al gen *CACNA1A*

Les mutacions al primer gen FHM conegut, *CACNA1A*, estan associades a un espectre fenotípic molt ampli. Els pacients presenten principalment, a més de migranya hemiplègica, atàxia cerebel·losa o epilèpsia. Les variants identificades en el gen a la cohort estudiada en el marc d'aquesta Tesi són gairebé totes de canvi de sentit (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln, p.Thr666Met, p.Tyr1387Cys i p.Ala454Thr), però també s'ha detectat un canvi intrònic que podria alterar l'*splicing* del RNA (c.2175+9G>A). Tot seguit s'inclou una breu descripció de les característiques moleculars d'aquests canvis i dels aspectes clínics més rellevants que acompanyen la migranya hemiplègica en els pacients de la nostra cohort (i procedents d'estudis previs) que són portadors de les mutacions:

La mutació p.Ser218Leu s'ha identificat en un pacient SHM en què ha aparegut *de novo*, en el context d'una clínica de migranya hemiplègica acompanyada d'edema cerebral transitori, convulsions generalitzades i afàsia perllongada. La posició 218 està situada al llaç citoplasmàtic

que uneix les repeticions S4 i S5 del domini I del canal. La serina, un aminoàcid aromàtic, polar i petit, és substituït per la leucina, un aminoàcid alifàtic i hidrofòbic. Aquesta mutació s'havia descrit anteriorment en vuit pacients (Kors et al. 2001; Curtain et al. 2006; Chan et al. 2008; Debais et al. 2009; Stam et al. 2009; Zangaladze et al. 2010) dos d'ells SHM en què també s'origina *de novo* perquè no està present en els progenitors (Stam et al. 2009). La correlació fenotip-genotip en aquests casos previs es similar a la del nostre pacient, amb migranya hemiplègica i altres símptomes acompanyants, alguns dels quals són molt greus, que poden produir la mort després d'un traumatisme cranial lleu (Kors et al. 2001). Els símptomes descrits són els següents: coma (Kors et al. 2001; Curtain et al. 2006; Chan et al. 2008), edema cerebral (Kors et al. 2001; Curtain et al. 2006; Chan et al. 2008; Debais et al. 2009; Stam et al. 2009; Zangaladze et al. 2010), convulsions o epilèpsia (Kors et al. 2001; Chan et al. 2008; Debais et al. 2009; Stam et al. 2009; Zangaladze et al. 2010), hipertèrmia (Debais et al. 2009) i atàxia (Chan et al. 2008). Les conseqüències funcionals de la mutació p.Ser218Leu han estat investigades en models cel·lulars i en un ratolí *knock-in* pel *CACNA1A*. En comparació amb altres mutacions FHM1, la mutació p.Ser218Leu mostra un dels guanys de funció més potents. L'efecte s'observa especialment a baixos voltatges, que són incapaços d'obrir el canal WT i despolaritzar la cèl·lula. D'altra banda, la mutació p.Ser218Leu augmenta la recuperació del canal després de la inactivació (Tottene et al. 2005). Una part de l'augment d'activitat s'explica perquè altera la desinhibició del canal de calci durant la regulació directa per proteïnes G (Weiss et al. 2008). Així, aquesta mutació possiblement produeix una combinació d'inactivació particularment lenta durant la CSD i un baix llindar d'activació del canal (Debais et al. 2009). Estudis recents mostren que en ratolí la mutació p.Ser218Leu afecta la facilitació dependent de  $Ca^{2+}$  i la plasticitat sinàptica (Adams et al. 2010).

La mutació **p.Thr501Met**, identificada en un pacient amb fenotip FHM i atàxia progressiva implica la substitució de l'aminoàcid treonina 501, polar i sense càrrega, per l'aminoàcid no polar metionina. Aquesta mutació afecta el segment S1 del domini II. Aquest canvi s'ha descrit recentment en una família amb fenotip EA2 (Mantuano et al. 2010). En el marc d'aquesta Tesi s'han fet estudis funcionals d'aquest canvi que es discuteixen a l'apartat 1.1.2 de la Discussió.

La mutació **p. Arg583Gln** s'ha identificat en el proband i en quatre membres afectats més de la família en que segreguen combinacions dels fenotips EA2, atròfia cerebel·losa, HM i MA (veure **figura 4** de l'article 1 a Resultats). La mutació no està present en els cinc individus asimptomàtics de la família. La correlació fenotip-genotip es similar a la d'altres famílies portadores de la mateixa mutació que s'han descrit. Aquesta es la segona mutació més freqüent a la proteïna *CACNA1A*, i fou descrita per primer cop en una família amb FHM i atàxia cerebel·losa progressiva d'inici tardà (Battistini et al. 1999) S'ha identificat en unes altres cinc famílies amb FHM, atàxia i símptomes cerebel·losos (Ducros et al. 2001; Alonso et al. 2003; Thomsen et al. 2007), i en dos casos SHM, un d'ells amb afàsia i confusió episòdiques (Terwindt et al. 2002) i un altre sense símptomes cerebel·losos (Riant et al. 2010). També s'ha descrit en una família amb atàxia (Cleves et al. 2009). L'arginina 583 està situada al sensor de

voltatge del segment 4 del domini II (DII-S4) on és substituïda per una glutamina. Els estudis funcionals d'aquesta mutació realitzats per altres autors revelen un canvi en la dependència de voltatge d'activació i d'inactivació cap a potencials més negatius com a conseqüència de la neutralització del residu 583, que està carregat positivament en el canal WT, i una disminució de la recuperació de la inactivació (Kraus et al. 2000). En situacions d'alta activitat aquesta disfunció del flux de  $Ca^{2+}$  explicaria el desencadenament dels episodis neurològics per estímuls sensorials o emocionals (Kraus et al. 2000).

El canvi **p.Thr666Met** és la mutació a *CACNA1A* més prevalent en HM. S'ha descrit en 21 famílies amb diversos símptomes acompanyants, com atàxia cerebel·losa progressiva, nistagmus i coma (Ophoff et al. 1996; Ducros et al. 1999; Friend et al. 1999; Wada et al. 2002; Kors et al. 2003; Thomsen et al. 2007; Freilinger et al. 2008; Yabe et al. 2008). També s'ha trobat tres casos esporàdics amb els següents símptomes acompanyants: atàxia, nistagmus i atròfia cerebel·losa (Ducros et al. 1999; Terwindt et al. 2002; Riant et al. 2010). En un estudi en què es detecta la mutació en 9 famílies franceses i en un cas esporàdic amb FHM i atàxia cerebel·lar progressiva, l'anàlisi de diversos marcadors polimòrfics intrònics suggereix que el canvi ha aparegut per events mutacionals recurrents, i que no hi hauria per tant un efecte fundador (Ducros et al. 1999). A més el canvi s'ha descrit com a mínim en un cas com a mutació *de novo* (Riant et al. 2010). El canvi consisteix en la substitució d'una treonina, un aminoàcid petit, hidrofòbic i polar, per una metionina, també hidrofòbica, a la posició 666 de la proteïna, que està situada entre els segments S4 i S5 del domini II. Diversos autors han dut a terme estudis funcionals en sistemes d'expressió heteròlegs que mostren un guany de funció del canal mitjançant el següents mecanismes: un alentiment de la recuperació del canal després de la inactivació (Kraus et al. 1998), un increment de l'influx de  $Ca^{2+}$  a través del canal i una disminució de la densitat de corrent màxima (Tottene et al. 2002).

La mutació **p.Tyr1387Cys** s'ha identificat en una pacient SHM amb inici a la infantesa (retard psicomotor i primer atac amb hemiparèsia als 3 anys) i símptomes greus: dèficit motor progressiu amb signes piramidals, problemes visuals, atròfia cerebel·losa i deteriorament cognitiu (veure Article 2 a Resultats). Aquesta mutació s'havia descrit dues vegades anteriorment, també en fenotips greus i curiosament amb un origen *de novo*. El primer cas es va descriure en una pacient amb inici molt primerenc dels atacs (7 anys) presentava, als 33 anys, història d'episodis d'HM i coma, retard mental (QI: 40), atàxia cerebel·losa permanent, convulsions i atròfia cerebel·losa (Vahedi et al. 2000). El segon cas, també amb inici primerenc (5 anys), atàxia cerebel·losa i nistagmus, retard psicomotor (IQ:50) patia episodis d'HM amb pèrdua del coneixement associada (Riant et al. 2010). La mutació s'ha descrit amb diferent nomenclatura a la literatura, en el primer cas al residu aminoacídic 1385 i en el segon cas en la posició 1384; nosaltres utilitzem com a referència la isoforma 2 (RefSeq NP\_075461.2) on es troba a la posició 1387. Es tracta d'un canvi de tirosina, un aminoàcid hidrofòbic i aromàtic, a cisteïna, que també es hidrofòbica i aromàtica però més petita i pot formar enllaços disulfur amb altres aminoàcids. Es troba al segment helicoidal S5 del domini III transmembrana del

canal. El S5 és un domini conservat evolutivament i està implicat en la selectivitat i la conductància del ió  $\text{Ca}^{2+}$ . S'han identificat prèviament dues mutacions en aquest segment, però en el domini IV. La primera, p.Val1696Ile, es va trobar *de novo* en dos bessons univitel·lins amb fenotip de HM i hemiplègia alternant (de Vries, B. et al. 2008). La segona, p.Ile1710Thr, estava present en un fenotip HM acompanyat d'atàxia i epilèpsia infantil (Kors et al. 2004). S'han fet estudis electrofisiològics del canvi p.Val1696Ile (S5-DIV) que mostren un guany de funció del canal  $\text{Ca}_v2.1$ , amb un increment de l'activitat del canal a potencials lleugerament més negatius (tot i que els resultats no assolien significació estadística). El canvi provoca també un alentiment del temps d'inactivació i afecta la recuperació després de la inactivació del canal. En aquest estudi també es van analitzar sistemàticament les subunitats  $\beta_{1/2/3}$  del canal i es van observar diferències en alguns paràmetres electrofisiològics (Mullner et al. 2004).

S'ha identificat la mutació **c.2175+9G>A**, un canvi a la posició +9 de l'intró 17 del gen *CACNA1A* que podria alterar l'*splicing*, en un individu amb fenotip inusual. Es tracta d'un pacient de 9 anys que té una història de cefalees hemicranials dretes recurrents des dels 4 anys, normalment acompanyades de força discapacitat: pal·lidesa i mareig, inestabilitat, alteració visual i fins i tot de l'estat de consciència en algun episodi. Encara que només es va documentar un episodi d'hemiplègia franca (que es va prolongar durant dies/setmanes), quan el diagnòstic HM en requereix dos, aquest malalt amb mutació confirmada il·lustra les limitacions dels criteris dictats per la IHS als ICHD-II. Aquest pacient, que en un dels atacs va tenir una convulsió epilèptica, sembla correspondre a un fenotip "greu" de FHM1, amb símptomes que se sobreposen amb els de la migranya de tipus basilar. EEG i RM cerebral són normals. A diferència d'altres casos greus de FHM, el seu QI és normal tot i que el perfil neuropsicològic és compatible amb el diagnòstic de trastorn per dèficit d'atenció. Amb el programa ESEfinder (<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE2/index.html>) es pot fer un predicció bioinformàtica de l'efecte de la variant al lloc d'unió del RNA nuclear petit (snRNA) U2, una molècula implicada en el reconeixement dels exons durant el procés de *splicing*. L'anàlisi dels dos al·lels de la variant mostra que l'al·lel A redueix l'afinitat del donador de *splicing* per l'U2 (**Figura 4**, Article 1, Resultats). El reconeixement inexacte dels límits exó/intró o la fallida en l'eliminació d'un intró pot generar molècules de mRNA aberrants que són inestables o codificar isoformes de la proteïna defectuoses o perjudicials. En últim terme, el canvi identificat s'haurà de testar a nivell funcional per comprovar si realment afecta el procés de *splicing* i la funció de la proteïna i es pot per tant relacionar amb la malaltia. Tenint en compte que el gen *CACNA1A* s'expressa sobretot en cervell i que per tant és complicat tenir accés a material biològic apropiat procedent del pacient, un possible mètode per estudiar l'efecte de la mutació és la construcció de minigens que permetin avaluar l'activitat *splicing in vitro*. Aquest enfoc experimental està actualment en marxa al nostre laboratori. Tot i que és una metodologia d'aplicació relativament simple, els efectes observats podrien no reproduir exactament allò que ocorre en condicions fisiològiques.

Finalment, s'ha identificat un canvi al gen *CACNA1A*, **p.Ala454Thr**, en una família amb migranya d'herència autosòmica dominant, en què segreguen diversos fenotips de migranya (migranya amb aura visual, migranya amb aura sensitiva i FHM). El canvi s'ha identificat en una mare i una filla afectades de migranya amb aura visual, mentre que els pacients amb fenotips més greus de la família no són portadors del canvi (veure Article 3 a Resultats). El canvi sembla modificar el fenotip de la malaltia, perquè els portadors de p.Ala454Thr tenen migranya però no símptomes hemiplègics o parestèsics. La mutació és una substitució aminoacídica a la posició 454 situada en el llaç intracel·lular que uneix els dominis DI i DII de la subunitat  $\alpha 1A$  del canal  $Ca_v2.1$ . L'alanina, un aminoàcid apolar hidrofòbic, és substituïda per la treonina, un residu polar. En el marc d'aquest projecte s'han dut a terme estudis funcionals que indiquen que la mutació tindria un paper modulador del fenotip (veure apartat 1.2.2 Discussió).

### 1.1.2 Efecte funcional de les variants identificades

Es van recollir diverses evidències a favor de la rellevància funcional dels canvis p.Ala454Thr, p.Thr501Met i p.Tyr1387Cys, pels quals no hi ha estudis funcionals a la literatura:

- S'ha confirmat llur absència en 200 cromosomes d'individus control (en els quals es va excloure específicament història personal i familiar de qualsevol tipus de migranya).
- Els canvis identificats no estan presents a les bases de dades públiques de SNPs (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP); Ensembl Genome Browser, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org); UCSC Genome Browser, [genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)), la qual cosa indica que probablement no es tracta de variants polimòrfiques comunes presents a la població general. L'única excepció és el canvi p.Ala454Thr que havia estat considerat inicialment com una variant polimòrfica rara amb una freqüència de 1/500 (Ophoff et al. 1996) i també s'havia associat a atàxia progressiva d'inici precoç (Cricchi et al. 2007).
- La seqüenciació de la pràctica totalitat de les regions codificants del gen *CACNA1A* (només falta l'exó 1, d'un total de 47, que ofereix dificultats tècniques a nivell tant d'amplificació per PCR com de seqüenciació a causa del biaix que presenta cap a nucleòtids de tipus C i G) no ha revelat la presència de cap altre canvi en els pacients. Tampoc s'han detectat alteracions al gen *ATP1A2*.
- Els aminoàcids implicats estan molt conservats en l'evolució, tant a nivell interespecífic (subunitats  $\alpha 1A$  de l'home –*Homo sapiens*–, la vaca –*Bos taurus*–, la rata –*Rattus norvegicus*–, el ratolí –*Mus musculus*–, i el peix zebra –*Danio rerio*–) com intraespecífic (subunitats *CACNA1B/E/D/F/C/S* humanes), la qual cosa indicaria una importància funcional i/o estructural. Constitueix una excepció la variant p.Tyr1387Cys, que es troba en una posició que està conservada només en les subunitats més properes al *CACNA1A*: *CACNA1B/E*. No per això es descarta necessàriament aquest canvi com a causant del fenotip. La variabilitat entre els diferents tipus de subunitat  $\alpha 1$  podria indicar que aquesta regió de la proteïna confereix característiques particulars als diferents tipus de subunitats (**figura 3**, Article 1, Resultats).

Per estudiar la relació causal entre els canvis identificats i la patologia es va comptar amb la col·laboració del grup dirigit pel Dr. Valverde i el Dr. José M. Fernández-Fernández al Laboratori de Fisiologia Molecular i Canalopaties de la Universitat Pompeu Fabra, amb qui es van dur a terme els estudis funcionals de les mutacions identificades al gen *CACNA1A*.

Es va plantejar fer els estudis funcionals de les variants p.Thr501Met i p.Ala454Thr perquè en el seu moment no estaven descrites com a causants del fenotip i a més, en el cas de la variant p.Thr501Met, havia de ser el primer estudi de una mutació al segment S1 com a causa de fenotip HM. En cas de la variant p.Ala454Thr s'havia d'aclarir la seva contribució al trastorn, amb el plantejament original que una mutació en el gen *CACNA1A* pogués actuar com a modulador del fenotip i no com a responsable de la malaltia.

#### Estudis funcionals del canvi p.Thr501Met

Els resultats obtinguts en les anàlisis electrofisiològiques del canal  $Ca_v2.1$  portador de la mutació p.Thr501Met transfectat en cèl·lules de ronyó humà (HEK293) redueix el llindar del voltatge necessari tant per activar com per inactivar el canal. Aquest guany de funció del canal és similar al descrit per altres mutacions analitzades a nivell funcional anteriorment pel grup (Serra et al. 2009) així com per a les que es poden trobar a la literatura, i per tant recolzaria el paper causal de la mutació en la patologia del pacient.

Un increment de l'activitat de canal  $Ca_v2.1$  incrementaria l'entrada de calci dins de la neurona en resposta a un potencial d'acció i en conseqüència augmentaria la secreció del neurotransmissor glutamat a l'espai sinàptic, tot produint un estat d'hiperexcitació neuronal i facilitant la CSD. La major propensió a la CSD podria explicar l'aura, però queda per establir una relació entre aquesta excitabilitat i l'activació del sistema trigèminovascular on s'origina el mal de cap.

#### Estudis funcionals del canvi p.Ala454Thr

Els experiments funcionals de la mutació p.Ala454Thr mostren que es produeixen canvis rellevants en la fisiologia molecular del canal a causa de la desregulació de dos mecanismes:

En primer lloc, la mutació provoca canvis en la inactivació de l'estat de repòs dependent de voltatge del canal  $Ca_v2.1$  i accelera la recuperació de la inhibició mediada per la subunitat auxiliar  $G\beta\gamma$ . Aquests canvis serien rellevants només durant i després d'una alta freqüència de descàrregues neuronals, situació que es dona durant la depressió cortical propagant (CSD) en pacients migranyosos. S'ha de tenir en compte que l'impacte de la mutació dependrà del tipus de subunitat  $Ca_v\beta$  associada al canal.

En segon lloc, el canal portador de la mutació p.Ala454Thr interromp la interacció amb la sintaxina 1A, proteïna del complex SNARE que modula l'activitat del canal. Això comporta una disminució de la secreció de vesícules de neurotransmissor acoblades a canals  $Ca_v2.1$ . Aquests resultats impliquen que el llaç d'unió entre els dominis I i II intervé en els mecanismes reguladors de les proteïnes SNARE.



Aquesta disminució en la funció del canal aniria en sentit contrari als efectes que produeixen les mutacions associades a la HM. La mutació p.Ala454Thr elevaria el llindar de voltatge necessari per desencadenar la CSD, i això seria important a les àrees corticals sensitivo-motores on l'inici de la CSD requereix un estímul més gran que a l'àrea visual occipital (Lauritzen 1994). Això podria explicar el fenotip diferencial dels individus portadors de la mutació respecte als familiars afectats de migranya amb aures sensitivo-motores (com l'hemiplègia). En general aquesta pèrdua de funció del canal estaria en concordança amb altres mutacions estudiades al gen *CACNA1A* associades a atàxia (recordem que les mutacions que causen EA2 provoquen una pèrdua de funció), i amb el treball en què s'associa aquesta mutació amb símptomes cerebel·losos (Cricchi et al. 2007).

Per poder considerar el gen *CACNA1A* no només com a causant de la patologia migranyosa sinó també com a gen que pot actuar com a modificador del fenotip, serà necessari realitzar estudis en un altre model experimental que confirmi l'efecte d'aquesta mutació en la prevenció de l'aura sensitivo-motora.

S'han descrit variants modificadores en moltes altres patologies, com ara la malaltia de Gaucher, un trastorn metabòlic d'acumulació lisosomal de lípids causat per mutacions en el gen que codifica la  $\beta$ -glucocerebrosidasa. Aquests canvis provoquen una pèrdua total o parcial de l'activitat enzimàtica. Un exemple d'al·lel modificador és el canvi p.Glu326Lys que no s'ha trobat mai sol als pacients i sempre acompanya una altra mutació. Però quan es troba juntament amb una altra canvi en al·lells dobles mutants, s'accentua la disminució de l'activitat de l'enzim mutant, provocant així un efecte major (Montfort et al. 2004). Hi ha també exemples d'al·lells modificadors situats en gens diferents al que causa primàriament la patologia.

### 1.1.3 Altres mutacions al gen *CACNA1A*

Recentment, a banda de mutacions de canvi de sentit, s'han descrit altres tipus de mutacions al gen *CACNA1A*. En fer un anàlisi dels extrems 5' i 3' del gen, Veneziano et al. van identificar una mutació al promotor, g.-757\_753delCTTTC. Aquesta deleció de cinc nucleòtids mostrava un augment de l'activitat transcripcional. Els autors suggereixen que aquesta expressió incrementada podria dur a un augment de la quantitat de canal a la membrana cel·lular i produir així un guany de funció (Veneziano et al. 2009).

En un altre treball en què es buscaven grans reordenaments cromosòmics al gen, es va identificar una deleció dels exons 39 al 47 en dos casos SHM. Els autors troben aquesta mateixa deleció en tres famílies amb EA2 (Labrum et al. 2009). Aquestes grans delecions no s'han estudiat a nivell funcional però és probable que produeixin una pèrdua de funció. Això estaria en discordança amb la teoria actualment acceptada segons la qual un guany de funció en la via de la neurotransmissió del glutamat estaria actuant com a mecanisme causal de la HM.

Actualment estem duent a terme un estudi de grans reordenaments cromosòmics en el gen *CACNA1A* utilitzant les tècniques de *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification* (MLPA) i *Quantitative Multiplex Polymerase Chain Reaction of Short Fluorescent Fragments* (QMPSF). De moment els resultats preliminars obtinguts no indiquen la presència de cap deleció ni cap duplicació en aquesta sèrie de pacients.

#### 1.1.4 *CACNA1A*: Un gen, diversos fenotips

Les mutacions al gen *CACNA1A* poden causar diversos trastorns neurològics autosòmics dominants, com ara la migranya hemiplègica, l'atàxia episòdica de tipus 2 (EA2) i l'atàxia espinocerebel·losa de tipus 6 (SCA6). Se les ha anomenat canalopaties del Ca<sub>v</sub>2.1 ja que afecten la subunitat  $\alpha 1$  del canal de Ca<sup>2+</sup> dependent de voltatge de tipus P/Q. Aquesta heterogeneïtat clínica es correlaciona generalment amb l'heterogeneïtat al·lèlica.

##### Migranya hemiplègica (HM):

Les mutacions que s'han descrit fins ara en HM són de canvi de sentit, tot produint substitucions aminoacídiques en regions funcionalment rellevants del canal Ca<sub>v</sub>2.1, com el revestiment del porus i els sensors de voltatge. Hi ha molts pacients HM que a més dels atacs típics presenten símptomes cerebel·lars com atàxia cerebel·losa progressiva i/o nistagmus amb atrofia cerebel·lar (p.ex. la família A03\_44, Article 1, Resultats). També hi ha pacients portadors de mutacions que poden tenir atacs severos amb senyals d'encefalopatia, alteració de la consciència o confusió, febre i/o en alguns casos convulsions (de Vries, B. et al. 2009). És el cas de mutacions com la p.Ser218Leu o la p.Tyr1387Cys, que van associades a fenotips molt severos (en l'Article 2 de Resultats es descriu amb detall el quadre clínic del pacient 10\_336, portador del canvi p.Tyr1387Cys). Encara que hi ha mutacions al gen *CACNA1A* que són més freqüents en individus FHM "purs" mentre que d'altres ho són en individus amb símptomes cerebel·lars, no sempre hi ha una correlació clara entre genotip i fenotip. El fet que mutacions concretes puguin presentar penetració incompleta, p.ex. del 67% (Thomsen et al. 2007) i anar associades a una gran variabilitat de símptomes, suggereix que hi ha altres factors genètics o ambientals que influeixen en el fenotip.

##### Atàxia episòdica de tipus 2 (EA2):

En EA2 s'han identificat majoritàriament mutacions que introdueixen codons de parada de la traducció prematurs i petites delecions/insercions que trenquen la pauta de lectura, tot i que també s'han identificat algunes variants en zones implicades en el *splicing* i fins i tot de canvi de sentit (Pietrobon 2010). L'edat d'inici de la EA2 és típicament a la infància, i la malaltia es caracteritza per episodis recurrents de disfunció cerebel·lar, incoordinació de les extremitats, inestabilitat i disàrtria. Presenta símptomes interictals que inclouen principalment nistagmus i atàxia cerebel·losa permanent lleu o progressiva. Els episodis poden ser d'atàxia "purs" o estar associats a vertigen, nàusees, vòmits, migranya i diplòpia. En casos rars, el fenotip clínic també inclou retard mental, distonia, convulsions i/o epilèpsia (una minoria dels pacients poden presentar hemiplègia). Els factors desencadenants dels episodis inclouen estrès emocional,

exercici físic, alcohol i cafeïna. En general, la gran variabilitat intrafamiliar i interfamiliar de símptomes (tant episòdics com permanents) dels pacients EA2 indica que altres factors genètics o ambientals influeixen fortament en el fenotip (Pietrobon 2010).

#### Atàxia espinocerebel·lar tipus 6 (SCA6):

La SCA6 és una atàxia cerebel·losa d'inici tardà caracteritzada per atròfia de les cèl·lules de Purkinje, que s'hereta de forma dominant. És un trastorn de poliglutamines causat per l'amplificació d'un codó glutamina (CAG) repetit en tàndem situat a l'extrem 3' del gen *CACNA1A*. Aquesta expansió es troba a l'exó 47 i les variants de *splicing* que el contenen s'expressen predominantment a les cèl·lules de Purkinje. SCA6 es diferencia d'altres malalties d'amplificació de trinucleòtids en què l'expansió és excepcionalment petita (21-33 còpies) i predominen els símptomes cerebel·lars.

#### Conseqüències funcionals de les mutacions al gen *CACNA1A*:

Les mutacions en canals iònics poden causar una malaltia mitjançant tres mecanismes principals: el guany o la pèrdua de funció del canal i els efectes dominants negatius. Per demostrar els efectes funcionals de les mutacions potencialment patogèniques calen proves funcionals, típicament efectuades mitjançant mètodes de *patch clamp in vitro*. Recentment la generació de models animals per a diferents mutacions ha ajudat a entendre millor els mecanismes fisiopatològics d'aquests canvis.

En el cas de les mutacions de canvi de sentit que causen HM, tot i que hi ha resultats controvertits, està força acceptat per la comunitat científica que el mecanisme d'acció principal és un increment de la probabilitat d'obertura del canal, que comporta un augment de l'entrada de  $Ca^{2+}$  a la cèl·lula tot provocant un increment del nivell de neurotransmissió. Es parla d'un efecte de guany de funció del canal. En estudis de ratolins *knock-in* s'ha observat que els ratolins portadors de les mutacions p.Arg192Gln i p.Ser218Leu tenen un lliandar d'inducció de la CSD disminuït i presenten un augment en la velocitat de propagació de la CSD respecte els ratolins WT. En aquest estudis s'ha vist que la mutació p.Ser218Leu té un efecte major en l'activació, fet que explicaria per què els pacients presenten normalment una clínica més greu.

D'altra banda, tot i que el fenotip EA2 sol estar associat a mutacions que trunquen la proteïna, s'han descrit també substitucions aminoacídiques que produeixen una pèrdua completa de funció amb un efecte dominant negatiu (encara que, això podria ser un efecte condicionat pel model experimental i no es pot assegurar que les neurones tindrien el mateix comportament al cervell en un ambient fisiològic "normal"). En els casos en què les mutacions EA2 no tenen aquest efecte, s'observa una menor probabilitat d'obertura del canal  $Ca_v2.1$  mutant, i per tant una lleugera pèrdua de funció amb una disminució de l'activitat del canal. Les mutacions dels ratolins *tottering*, *leaner* i *rocker* (ratolins amb mutacions espontànies al *cacna1a*) produeixen un efecte de pèrdua de funció similar. A més, els ratolins *tottering* i *leaner* presenten un augment del lliandar d'inducció de la CSD i a la vegada una disminució de la velocitat de

propagació d'aquesta, en concordança amb una disminució de la neurotransmissió cortical deguda a una pèrdua de funció del canal (revisat a (Pietrobon 2010)).

Per tant, les mutacions HM i EA2 tindrien efectes oposats sobre la l'activació dependent de voltatge i la probabilitat d'obertura dels canals  $Ca_v2.1$ , la qual cosa comporta un augment de l'afluència de  $Ca^{2+}$  a l'interior cel·lular a través del canal en els portadors de mutacions HM i a una disminució del flux en el cas de EA2.

En SCA6, igual que en d'altres trastorns amb expansions de poliglutamines, es pensava que el mecanisme de la malaltia era la formació d'agregats citotòxics amb un efecte dominant negatiu. Però en base a evidències electrofisiològiques, alguns autors han suggerit que el fenotip SCA6 és degut a la pèrdua de funció dels canals  $Ca_v2.1$  (Toru et al. 2000). També s'ha observat que petites expansions de la repetició codificant CAG, que normalment son responsables del fenotip SCA6, poden causar EA2 (Jodice et al. 1997). Els autors suggereixen que EA2 i SCA6 són part de l'espectre d'una mateixa malaltia. L'elevada variabilitat fenotípica estaria relacionada, si més no en part, amb el nombre de repeticions del triplet CAG.

Una pregunta que encara queda per resoldre és per què una mateixa mutació pot provocar símptomes cerebel·lars com l'atàxia en alguns pacients i ens d'altres migranya hemiplègica. Alguns autors han proposat que els estudis electrofisiològics no reflexen la complexitat de la situació *in vivo* (Ducros et al. 2001). El canal no té per què funcionar de la mateixa manera als diferents teixits, com ara l'escorça o el cerebel. Cada teixit i tipus cel·lular té un patró d'expressió diferencial, i aquesta particularitat podria explicar diferents efectes de la mateixa mutació a diferents regions del cervell o fins i tot en diferents tipus neuronals dins de la mateixa regió. En aquest sentit, s'ha observat en estudis amb el model *knock-in* que la mutació p.Arg192Gln afavoreix la neuroexcitació a l'escorça però no altera la neurotransmissió inhibitoria (Pietrobon 2010). També s'ha observat que la funció del canal també pot variar segons els tipus de subunitat  $\beta$  del canal (Mullner et al. 2004), o per la variant de *splicing* (Adams et al. 2009) expressada a la cèl·lula. A més, moltes mutacions HM, a part de produir un guany de funció del canal, afecten també la inactivació del canal i en ocasions poden produir una pèrdua de funció tot afavorint la inactivació del canal, com és el cas de la mutació p.Tyr501Cys (Article 1, Resultats) i també de la mutació p.Tyr1245Cys (Serra et al. 2009). Podria ser que aquesta inactivació en determinats teixits expliqués la variabilitat clínica observada, juntament amb altres factors genètics o ambientals que influeixen en l'expressió d'aquests fenotips.

Ja per acabar, a nivell clínic s'ha observat que és més freqüent identificar mutacions al gen *CACNA1A* en pacients que presenten FHM juntament amb símptomes cerebel·losos. Aquesta tendència s'ha observat en estudis anteriors, per exemple, Ducros et al. identifiquen mutacions al gen *CACNA1A* en 10/19 casos amb HM i atàxia cerebel·lar progressiva (Ducros et al. 1999). A la nostra cohort, els pacients en què no hem identificat cap canvi (10/19) són HM "purs", en el sentit que no presenten simptomatologia cerebel·losa.

## 1.2 La migranya hemiplègica (HM) i altres gens (*ATP1A2*, *SCN1A*)

El segon gen FHM és *ATP1A2*, que codifica la subunitat  $\alpha 2$  d'una bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . La seqüenciació del gen *ATP1A2* en una mostra de 19 pacients amb HM ha permès identificar dues mutacions. Un dels canvis, p.Ala606Thr, s'havia descrit anteriorment (Riant et al. 2005) i l'altre, p.Glu825Lys, és nou.

En població espanyola no s'havia identificat fins ara cap mutació al gen *ATP1A2* (Cuenca-Leon et al. 2008). Un dels nostres pacients és d'origen espanyol, l'altre és grec. No hem trobat cap canvi en els pacients amb SHM, tot i que recentment s'ha descrit una elevada prevalença de mutacions en aquest gen en una sèrie de pacients SHM d'inici primerenc (11/25), encara que no es van fer estudis funcionals de les noves variants identificades (Riant et al. 2010).

### 1.2.1 Descripció de les variants *ATP1A2* identificades

S'han descrit fins ara més de 50 mutacions al gen *ATP1A2*, la majoria associades a FHM "pura", tot i que hi ha també casos amb símptomes acompanyants. Les variants identificades en el gen *ATP1A2* en aquesta sèrie de pacients espanyols son de canvi de sentit: p.Ala606Thr i p.Glu825Lys. A continuació descrivim breument els aspectes clínics que acompanyen la HM en els nostres pacients i els de la literatura, juntament amb les característiques de les variants genètiques trobades:

La mutació **p.Ala606Thr** s'ha identificat en un pacient amb FHM i convulsions epilèptiques parcials. Aquest canvi es va descriure en dues famílies FHM l'any 2005 (Riant et al. 2005) i en un nen amb hemiparèsies (debilitat motora en un hemicòs) prolongades (5 dies) amb antecedents de FHM (Jen et al. 2007). La posició 606 està situada al llaç intracel·lular entre els dominis transmembrana M4/5 de la bomba, on es troben casi la meitat de les mutacions identificades al canal. Els estudis funcionals amb ouabaïna, un inhibidor potent de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ , suggereixen que l'haploinsuficiència és el mecanisme causal de la patologia: les cèl·lules transfectades amb una construcció *ATP1A2* WT modificada genèticament eren resistents a la ouabaïna, mentre que les cèl·lules transfectades amb la mateixa construcció però amb la mutació incorporada no sobreviuen. Aquestes observacions concorden amb una pèrdua de funció de la proteïna mutada. Els resultats eren similars quan se simulava un estat heterozigot (Jen et al. 2007). En un estudi funcional més detallat es va observar que la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  tenia activitat parcial degut a una menor afinitat pel potassi (Tavraz et al. 2008).

El canvi **p.Glu825Lys** substitueix el residu àcid glutàmic, amb càrrega positiva, per un de negatiu, la lisina. La posició aminoacídica 825 es troba al llaç entre M6/7. Les mutacions prèviament descrites p.Met829Arg i p.Arg834Gln es troben també en aquest llaç i s'han estudiat a nivell funcional (De Vries, D. R. et al. 2007; Tavraz et al. 2008). Les cèl·lules portadores de les mutacions no mostraven supervivència en assaigs amb ouabaïna i un estudi funcional més detallat de la mutació p.Arg834Gln mostrava una reducció del *turn-over*, així com canvis en la dependència al voltatge de la bomba (Tavraz et al. 2008). El proband portador

de la mutació p.Glu825Lys va patir convulsions febrils entre els 11 i 14 mesos d'edat i ha sofert episodis neurològics paroxístmics provocats per traumatismes lleus sense pèrdua de consciència; el seu pare, també portador de la mutació, presenta mareigs, disàrtria i episodis d'hemiplègia que acompanyen un mal de cap intens (veure Article 1 als Resultats).

### 1.2.2 Estudis funcionals de la mutació p.Glu825Lys

Juntament amb les evidències comentades a l'apartat anterior, altres arguments donen suport a un paper causal d'aquest canvi aminoacídic (veure Article 1 als Resultats):

- Es va comprovar que la mutació p.Glu825Lys no era present en 412 cromosomes d'individus control.
- El canvi cosegrega amb el fenotip dins de la família.
- No s'han identificat altres canvis en els gens prèviament relacionats amb HM, incloent-hi el propi *ATP1A2*.
- El canvi p.Glu825Lys no està present a les bases de dades públiques de polimorfismes consultades (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP); Ensembl Genome Browser, [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org); UCSC Genome Browser, [genome.ucsc.edu](http://genome.ucsc.edu)).
- La posició Glu825 de la subunitat  $\alpha 2$  de l'ATPasa de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  està conservada intra- i interespecíficament.

Vam dur a terme assaigs de supervivència amb la toxina ouabaïna per tal de determinar si la nova mutació afectava la funció de la bomba de  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ . Els estudis s'han dut a terme per la Dra. Corominas al nostre laboratori. Tal i com s'observa a la **figura 5** de l'Article 1 de la secció de Resultats, només sobreviuen un 10% de les cèl·lules HeLa transfectades amb la construcció *ATP1A2* mutant respecte a les cèl·lules transfectades amb *ATP1A2* WT. Els assaigs de supervivència són un mètode àmpliament utilitzat per estudiar els efectes funcionals de les mutacions en aquesta proteïna. El canal és necessari per la supervivència cel·lular. En aquests estudis es cultiven cèl·lules transfectades amb el cDNA *ATP1A2* modificat genèticament perquè sigui resistent a l'ouabaïna. La resistència la confereixen dues substitucions aminoacídiques (Price et al. 1990), de tal manera que el producte del gen *ATP1A2* WT resistent a la ouabaïna pot rescatar la supervivència de cèl·lules tractades amb aquesta toxina. Si en transfectar cèl·lules amb la construcció *ATP1A2* portadora de les dues variants de resistència i la mutació identificada en el pacient es perd la capacitat de supervivència, llavors es considera que hi ha una disminució de la funció del canal, i per tant una possible relació causal amb la malaltia. Aquests assaigs són ràpids i útils per comprovar una alteració de la funció del canal, però són necessaris altres estudis cinètics (afinitat a ions o *turn-over* catalític), per saber exactament quin efecte té la mutació sobre l'electrofisiologia del canal.

S'ha suggerit que en el canal WT, els residus carregats negativament situats al llaç entre M6/7 contribueixen al reconeixement inicial dels ions  $\text{Na}^+$  o  $\text{K}^+$ , constituint el port citoplasmàtic d'entrada dels cations (Shainskaya et al. 2000; Jorgensen et al. 2003). No obstant això, altres experiments van descobrir que el llaç M6/7 és important en la transmissió de la senyal

d'activació del canal. Aquesta activació s'inicia amb la unió de cations al domini de fosforilació de la proteïna (Xu, G. et al. 2003). En aquests experiments, fets amb la Ca-ATPasa, es va substituir per una alanina l'acid glutàmic en la posició equivalent a la mutació p.Glu825Lys identificada al nostre pacient. El canvi disminueix l'aparent interacció amb  $\text{Na}^+$  i  $\text{K}^+$  de l'enzim unes 1,5-3 vegades.

La majoria de símptomes de la migranya amb aura són generats per la CSD o esdeveniments similars que es caracteritzen per un front excitador propagant (despolarització), seguit d'una depressió de llarga durada (hiperpolarització) (veure apartat 4.1 Introducció). Totes les mutacions del gen *ATP1A2* identificades en individus amb fenotip HM que s'han estudiat funcionalment produeixen una pèrdua de funció del canal, la qual cosa pot dur a una despolarització neuronal per diferents mecanismes. D'una banda, els canals de  $\text{K}^+$  juguen un paper important en la repolarització. Una reducció del gradient de  $\text{K}^+$  podria desestabilitzar el potencial de membrana en repòs i per tant reduir el llindar d'activació neuronal. En segon lloc, la ruptura del gradient de  $\text{Na}^+$  pot afectar l'eliminació del neurotransmissor glutamat de la fenedura sinàptica, que porten a terme els astròcits mitjançant el transportador  $\text{Na}^+$ /glutamat. S'ha demostrat que nivells elevats de glutamat extracel·lular desencadenen la CSD. En tercer lloc, aquesta baixada del gradient de  $\text{Na}^+$  podria elevar el  $\text{Ca}^{2+}$  intracel·lular, augmentar el flux de  $\text{Ca}^{2+}$  al reticle endoplasmàtic, que al seu torn porta a un augment de la senyal de  $\text{Ca}^{2+}$  (Golovina et al. 2003). Això es deu al fet que el gradient de  $\text{Na}^+$  és la font d'energia per l'intercanviador de  $\text{Na}^+$ / $\text{Ca}^{2+}$ . En conjunt, aquests canvis podrien contribuir a l'aparició de la CSD i a esdeveniments similars a la CSD en pacients amb FHM i SHM.

### 1.2.3 El gen *SCN1A*

El tercer gen identificat en FHM és el *SCN1A*, que codifica la subunitat  $\alpha 1$  del canal neuronal dependent de voltatge  $\text{Na}_v 1.1$ . S'hi ha identificat més de 700 variants associades a diferents fenotips, principalment epilèpsia o síndromes epilèptiques de la infantesa. Es poden diferenciar 25 fenotips, que inclouen entre d'altres, epilèpsia mioclònica severa de la infància, epilèpsia generalitzada amb convulsions febrils, encefalitis de Rasmussen i FHM, amb endofenotips que inclouen autisme, retard mental i atàxia (Claes et al. 2009; Gambardella i Marini 2009).

Aquest gen, de la mateixa manera que el *CACNA1A*, presenta heterogeneïtat al·lèlica. Les cinc mutacions identificades fins ara en migranya hemiplègica (p.Leu263Val, p.Gln1489His, p.Gln1489Lys, p.Phe1499Leu, p.Leu1649Gln) s'han trobat en casos familiars i en un cas esporàdic. A part de la migranya hemiplègica, algunes famílies presenten algun tipus d'epilèpsia o ERDB (Dichgans et al. 2005; Castro et al. 2009; Vahedi et al. 2009). L'epilèpsia també s'ha descrit en els altres dos gens FHM (Haan et al. 2008). A la nostra cohort s'ha identificat la mutació p.Ala606Thr al gen *ATP1A2* en un pacient amb convulsions epilèptiques focals.

A la nostra cohort no s'ha seqüenciat aquest gen, encara que en una sèrie anterior publicada pel nostre grup, les dues mutacions FHM3 més prevalents van ser negatives en una sèrie de 19

pacients espanyols amb HM (Cuenca-Leon et al. 2008). Ens estem plantejant la possibilitat de seqüenciar els exons que contenen les cinc mutacions descrites o fins i tot la totalitat del gen en els pacients en què no s'ha detectat cap mutació als gens *CACNA1A* o *ATP1A2*. Això tindria especial interès en el pacient 18\_8873, que presenta un fenotip similar a ERDB.

### 1.3 Mecanismes mutacionals

#### 1.3.1 Mutacions *de novo*

Dues de les mutacions que hem identificat tenen un origen *de novo*, ja que no estan presents en els progenitors. Per excloure una possible falsa paternitat i confirmar la naturalesa *de novo* de les mutacions, es van genotipar 16 marcadors de tipus mirosatèlit en el proband i en els pares.

La mutació p.Tyr1387Cys s'havia descrit prèviament en dues pacients amb origen *de novo* (Ducros et al. 2001; Riant et al. 2010), mentre que la mutació p.Ser218Leu s'havia descrit vuit vegades anteriorment, cinc d'elles en pacients SHM, encara que només en dues s'ha demostrat explícitament l'origen *de novo* (Kors et al. 2001; Curtain et al. 2006; Chan et al. 2008; Debiais et al. 2009; Stam et al. 2009; Zangaladze et al. 2010). Totes dues mutacions es troben en un dinucleòtid CG i són transicions C>T, de manera que es poden considerar punts calents de mutació.

#### 1.3.2 Transicions

Les transicions són canvis d'un base nitrogenada per una altra del mateix tipus: purines (A i G) per purines o bé pirimidines (C i T) per pirimidines. Totes les variants que hem identificat a la nostra cohort, amb l'única excepció del canvi p.Ala454Thr, són transicions C>T, G>A o A>G. (Taula 6).

Taula 6. Variants identificades en pacients HM.

Pacient	Gen	Mutació		Dinucleòtid CG?
		Proteïna	cDNA	
391A	<i>CACNA1A</i>	p.Ser218Leu	c.653C>T	CG
5A	<i>CACNA1A</i>	p.Ala454Thr	c.1360G>C	CG
A03_44	<i>CACNA1A</i>	p.Thr501Met	c.1502C>T	CG
A00_100	<i>CACNA1A</i>	p.Arg583Gln	c.1748G>A	no
322B	<i>CACNA1A</i>	p.Thr666Met	c.1997C>T	CG
GBT	<i>CACNA1A</i>	<i>splicing?</i>	c.2175+9G>A	no
336	<i>CACNA1A</i>	p.Tyr1387Cys	c.4160A>G	CG
387A	<i>ATP1A2</i>	p.Glu825Lys	c.2473G>A	no
I310	<i>ATP1A2</i>	p.Ala606Thr	c.1816G>A	CG

Dos terços (6/9) de les variants que hem identificat estan en un dinucleòtid CG (Taula 6). Als genomes eucariotes una de les modificacions epigenètiques del DNA més freqüents, la metilació, incorpora un grup metil a les citosines transformant-les en 5-metilcitosines. La gran



majoria de citosines situades en dinucleòtids CG estan metilades, i aquesta modificació permet una conformació tancada de la cromatina i s'associa amb el silenciament de gens (sobretot en regions promotores amb illes CpG).

També s'ha vist que és un mecanisme protector contra algunes endonucleases, que no reconeixen les dianes quan estan metilades i afectarien diferencialment als organismes eucariotes i procariotes. La desaminació de la 5-metilcitosina dóna lloc a una timina (**figura 11**) (Antonarakis et al. 2000), i aquesta desaminació en residus 5-metilcitosina es produeix 2-3 vegades més ràpidament que en els residus citosina sense modificar. De totes maneres es creu que l'augment observat de la freqüència mutacional en les posicions 5-metilcitosina és degut a la ineficient reparació dels aparellaments erronis G-T tot provocant, així, transicions G-C → A-T (Lutsenko i Bhagwat 1999; Gates 2009). Això explica la hipermutabilitat de les citosines en dinucleòtids CpG, que són els punts calents de mutació més freqüents en els canvis d'una base (Maki 2002).



Figura 11. Representació esquemàtica de les molècules de i els processos químics que ocorren en la transformació de citosina a timina. Adaptat de (Antonarakis et al. 2000).

## **2. Estudi d'associació genètica de tipus cas-control entre la migranya comuna i la superfamília gènica dels canals TRP**

### **2.1 Consideracions metodològiques de l'estudi cas-control**

Els estudis d'associació de tipus cas-control presenten diverses limitacions inherents a la metodologia emprada, que afecten al disseny del nostre estudi.

Abans de començar, definim dos termes estadístics:

- Falsos positius o errors de tipus I: És l'error que cometem quan rebutgem la hipòtesi nul·la quan aquesta és certa. Detectem per tant una associació que no és real.
- Falsos negatius o errors de tipus II: És l'error que cometem quan acceptem la hipòtesi nul·la quan és falsa. Per tant no detectem associacions quan aquestes són reals.

#### **Determinació del fenotip en una malaltia complexa i selecció de la mostra control**

En un estudi d'associació és important que el grup de pacients sigui homogeni, i això probablement facilitarà la identificació de factors genètics de predisposició per un fenotip concret. L'heterogeneïtat genètica de un grup amb diversos fenotips complica la detecció d'associacions (van der Sluis et al. 2010).

En el cas de la migranya, la manca de marcadors biològics dificulta el diagnòstic. Seguint la classificació de la ICHD-II s'ha procurat homogeneïtzar la mostra. Malgrat tot, hi ha algunes mancances en el mètode de classificació dicotòmic (MO/MA), ja que les característiques clíniques que s'utilitzen en el diagnòstic de MA o MO (p.ex. nàusees, vòmits, fotofòbia...) són les mateixes en diferents combinacions (i els pacients també poden tenir els dos tipus d'atacs) i conseqüentment el diagnòstic implica certa heterogeneïtat. Per intentar solucionar aquest problema s'han fet estudis adoptant altres enfoc analítics: L'anàlisi de components d'un tret (TCA) és una anàlisi simple que es basa en els trets individuals dels pacients utilitzant les característiques clíniques de l'ICHD-II per al diagnòstic, mentre que l'anàlisi de classes latents (LCA) és un enfoc complex que combina l'estadística i dades empíriques (revisat a (de Vries, B. et al. 2009). En aquest treball hem utilitzat únicament la classificació MA/MO d'acord amb els criteris ICHD-II, a causa de la manca de dades més exhaustives de tots els pacients, que serien imprescindibles en qualsevol dels altres dos abordatges.

Un factor d'heterogeneïtat difícil de controlar és la comorbiditat de la malaltia amb altres patologies com poden ser altres tipus de cefalees (Russell 2005), els accidents vasculars

cerebrals (Narbone et al. 2008), l'epilèpsia (Haut et al. 2006), la depressió i el trastorn d'ansietat (Radat i Swendsen 2005).

En els estudis d'associació de tipus cas-control és important emprar una mostra control en què s'hagi exclòs el fenotip patològic, ja que altrament es podrien emascarar els resultats i dificultar la detecció d'associacions (error de tipus II), sobretot si el trastorn és prevalent a la població general, com és el cas de la migranya. Per això en la mostra control utilitzada s'ha exclòs la història personal i familiar de mals de cap.

### **Poder estadístic**

El poder estadístic és la probabilitat de detectar una associació en el cas de que aquesta existeixi realment. La grandària de la nostra mostra ens limita a l'hora de detectar factors de susceptibilitat amb un efecte molt subtil, ja que el poder estadístic depèn directament de la mida de la mostra (Zondervan i Cardon 2004). En cercar homogeneïtat clínica subdividint la mostra en els subgrups MA i MO el poder estadístic es redueix considerablement. Altres factors que influeixen en el nivell de poder estadístic són la freqüència de l'al·lel de risc i el risc que confereix la variant causal (i en el cas que el marcador funcionalment rellevant no s'hagi genotipat, el grau de desequilibri de lligament entre el marcador genotipat i el causal) (Abou-Sleiman et al. 2006).

El poder estadístic mínim de la nostra mostra *discovery* (555 casos i 555 controls) per detectar una associació amb un SNP (el de menor MAF a la nostra mostra control, 0,099) tot considerant una herència codominant és del 84% per a tota la població migranyosa, del 73% per MO i del 64% per MA, mentre que a la població de rèplica (485 casos i 482 controls, MAF = 0,195) tenim un poder del 91% per a la migranya, 83% per MO i 62% per MA.

### **Estratificació poblacional**

En poblacions separades poden divergir de forma significativa les freqüències al·lèliques i genotípiques per deriva genètica, selecció natural, flux genètic o mutacions. Dins d'una població es pot donar el fenomen d'estratificació poblacional quan tenim una barreja de poblacions diferents. Això podria donar lloc a l'aparició de falsos positius en un estudi cas-control (Abou-Sleiman et al. 2006).

La mostra *discovery* prové de dues zones geogràfiques espanyoles, Galícia i Catalunya, i per aquest motiu es va avaluar i descartar la presència d'estratificació poblacional mitjançant la genotipació de 48 SNPs intergènics situats a una distància mínima de 100 kb de qualsevol gen conegut (Corominas et al. 2010). De totes maneres, s'havien pres mesures per reclutar individus de població espanyola genèticament homogènia; la mostra control va ser reclutada a la mateixa àrea geogràfica que els casos i es va aparellar per sexe amb la de pacients. També es va fer èmfasi a l'hora d'obtenir una mostra de pacients diagnosticada amb criteris homogenis i seleccionada clínicament per neuròlegs.

## **Variables de confusió**

En els estudis d'associació cal tenir en compte certes variables no relacionades amb el fenotip que poden donar lloc a l'aparició de falsos positius quan estan distribuïdes diferencialment en casos i controls. En els nostres estudis vam considerar com a variable de confusió el sexe, ja que la distribució de la malaltia per sexes presenta un clar desequilibri (veure apartat 1.3.2 de la Introducció). Hauria estat interessant considerar també variables ambientals, que poden actuar diferencialment en diferents grups de pacients, però aquestes dades no estan recollides a totes les mostres incloses en aquest estudi. No obstant, s'està recollint informació d'aquest tipus en una part dels pacients de cara a estudis futurs.

## **Correccions per comparacions múltiples**

Per reduir el nombre de falsos positius a l'hora de fer comparacions múltiples, cal augmentar la rigurositat dels llindars de significació tenint en compte el nombre de tests aplicats. En aquest treball s'ha utilitzat la correcció de Bonferroni en l'anàlisi de marcadors individuals i la correcció per permutacions en el cas dels marcadors múltiples.

### Correcció de Bonferroni

És un mètode que requereix l'existència d'independència entre tests. Segons el nombre de tests independents realitzats ( $n$ ), s'estableix un nou llindar de significació ( $\alpha'$ ) seguint la relació  $\alpha' = \alpha/n$ , amb  $\alpha = 0,05$ . És un mètode de correcció astringent i que assegura una probabilitat de falsos positius no superior al 5% en cada anàlisi. Tenint en compte que s'han analitzat 149 SNPs en tres grups clínics diferents, el nou llindar de significació es fixaria en  $P < 1.0^{-04}$ . Cap dels nostres SNPs amb associació nominal resisteix el test de Bonferroni. Tanmateix, cal tenir en compte que al nostre estudi s'analitzen variants dins d'un mateix gen amb un cert grau de LD entre elles i que per tant no són completament independents, i que els subgrups clínics tampoc ho són, ja que alguns pacients MA tenen atacs sense aura, i a més el grup "migranya total" inclou pacients MA i MO. Per tant estariem aplicant un rigor estadístic excessiu i afavorint la possible presència de falsos negatius.

### Correccions per permutacions

Amb aquesta correcció s'assigna el fenotip de manera aleatòria a les dades genotípiques, i així es generen dades que compleixen la hipòtesi nul·la de no associació amb el fenotip. Amb aquestes dades es realitzen múltiples comparacions i s'obtenen nous valors de  $\alpha$  ajustats. Aquesta correcció no requereix que les comparacions siguin independents.

## **Estimació d'haplotips**

En els estudis d'associació poblacionals els individus no estan emparentats i, per tant, no es disposa d'informació sobre la fase haplotípica dels progenitors. Per aquest motiu recorrem a algorismes estadístics per estimar les fases, que assumeixen un determinat nivell d'incertesa. En aquest treball s'han utilitzat els programes UNPHASED (Dudbridge 2003) per a la identificació dels haplotips de risc per a la migranya i PHASE (Stephens et al. 2001) per a l'assignació

d'haplotips específics a cada individu. Després hem avaluat el risc de patir migranya dels portadors de l'haplotip.

L'estimació de la fase dels haplotips es pot fer utilitzant la mostra sencera de casos i controls o bé en els casos i els controls per separat. Estimar la fase en casos i controls simultàniament permet una millor estimació de les freqüències sota la hipòtesi de no associació, però pot generar un major nombre de falsos negatius introduint un biaix cap a aquesta hipòtesi. Contràriament, estimar la fase en casos i controls per separat pot portar a un increment de falsos positius (Balding 2006). En aquest treball s'ha optat per estimar els haplotips en casos i en controls de forma separada, ja que l'estudi d'haplotips s'ha limitat a aquells gens que s'han trobat prèviament associats a nivell de l'estudi de marcadors individuals. És possible per tant que els valors de OR obtinguts siguin una mica més elevats del que s'esperaria.

D'altra banda, per tal de minimitzar el número de tests en aquest treball s'ha utilitzat una aproximació sistemàtica per a l'anàlisi d'haplotips; primer s'ha considerat només l'anàlisi d'un gen en el subgrup clínic en què s'havia detectat associació nominal. Segon, de totes les combinacions possibles de dues variants, s'ha fixat la millor parella de SNPs (OR més elevat) que contenia algun dels SNPs associats nominalment a nivell individual. A aquesta combinació s'ha afegit una tercera variant per estudiar totes les possibles combinacions, i així successivament. És possible que anar fixant un haplotip abans de procedir a l'estudi amb més marcadors estigui impeding la detecció d'altres combinacions que podrien ser més significatives.

### **Error de genotipació**

Els estudis d'associació poblacionals, en comparació amb els estudis d'associació familiars, són més vulnerables a errors de genotipació, ja que no és possible la detecció d'errors tècnics mitjançant l'anàlisi de segregació (Abou-Sleiman et al. 2006). Malauradament, en aquest treball no hem pogut disposar dels progenitors dels individus afectats.

Els estudis d'associació comporten la genotipació d'un elevat nombre de SNPs en una mostra gran. Errors de genotipació a petita escala o classificació aleatòria no tendeixen a incrementar els errors de tipus I. No obstant, tenen com a conseqüència una pèrdua de poder estadístic (Abou-Sleiman et al. 2006; Miller et al. 2008).

Per tal de controlar la fiabilitat dels resultats obtinguts en processos de genotipació automatitzada és habitual la inclusió de mostres duplicades entre plaques, la utilització de controls interns amb genotips coneguts (individus CEPH, genotipats al *Centre d'Étude du Polymorphisme Humain*), la utilització de controls negatius i la seqüenciació d'alguns individus per tal de comprovar l'assignació correcta dels al·lels (Abou-Sleiman et al. 2006). En els nostres estudis s'han pres totes aquestes precaucions. A més, per tal de detectar possibles errors de genotipació sistemàtics s'ha mesurat l'equilibri Hardy-Weinberg (HWE) a la mostra control i s'han eliminat de l'estudi dos polimorfismes que no estaven en equilibri (2/191).

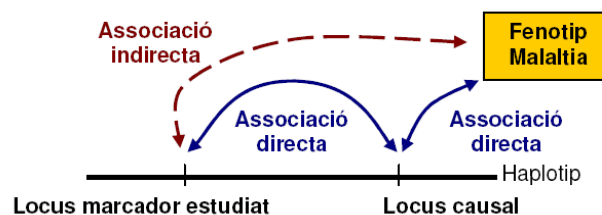
L'exclusió de SNPs a causa de problemes tècnics durant la genotipació implica necessàriament que la cobertura genètica d'alguns dels gens candidats estudiats no és total, situació que pot conduir a falsos negatius. Un 18,8% dels SNPs van fallar en la genotipació i un 3% van ser exclosos per incompatibilitats en el disseny dels assaigs SNPlex.

### Selecció de gens / tipus d'estudi associació

Per a la selecció de gens s'ha seguit l'estratègia de triar un sistema funcional (la superfamília dels canals TRPs, relacionats amb la fisiopatologia del dolor i per tant bons candidats per a la migranya) i cobrir-lo de forma exhaustiva. Es van seleccionar 14 gens de la superfamília, tots ells expressats al cervell. A més, sabem que participen en les vies del dolor i/o inflamació (*TRPA1*, *TRPV1*, *TRPV2*, *TRPV3*, *TRPV4*, *TRPM4* i *TRPM8*) (Cortright et al. 2007), que estan implicats en l'alliberament de neurotransmissors (*TRPC4* i *TRPM7*) (Munsch et al. 2003; Krapivinsky et al. 2006), en la formació de les connexions sinàptiques (*TRPC3* i *TRPC5*) (Li et al. 1999; Greka et al. 2003) i que poden tenir un paper en l'excitabilitat neuronal (*TRPC1*) (Kim et al. 2003). El canal *TRPC7* podria formar complexes multimèrics amb *TRPC1* i *TRPC3* (Zagranichnaya et al. 2005). I per últim, el *TRPM6* està relacionat amb l'hipomagnesèmia familiar amb hipocalcèmia secundària que condueix a convulsions infantils (Walder et al. 2002), que és una malaltia d'origen renal, però podria produir conseqüències a nivell cerebral.

### Selecció de polimorfismes

Per l'estudi d'associació s'han seleccionat variants polimòrfiques en els gens candidats seguint criteris de màxima cobertura genètica. A més s'han inclòs tots els canvis potencialment funcionals que s'ha pogut (SNPs en regions reguladores o exònics que produeixen substitucions d'aminoàcid). Per assolir aquesta cobertura genètica es parteix de patrons de LD de les regions genòmiques que conté els gens candidats tal i com estan definits a la base de dades HapMap ([www.hapmap.org](http://www.hapmap.org)) (en el nostre cas comprèn el gen a estudiar més 3-5 kb flanquejants per incloure possibles regions reguladores a 5' i a 3' del gen). El grau de LD entre les variants seleccionades és sempre inferior a  $r^2=0,85$ , per evitar genotipació redundant. Aquesta estratègia, que prioritza la cobertura genètica, pot conduir a la identificació d'associacions entre el fenotip i variants no causals però que estan en LD amb els canvis funcionalment rellevants (associació indirecta), en contraposició a l'associació directa, que es donaria amb variants causals (**figura 12**).



**Figura 12.** Estratègia de detecció d'associació indirecta. El locus estudiat està en alt desequilibri de lligament amb el locus causal. Adaptada de (Balding 2006)

La grandària de la nostra mostra limita el poder estadístic de l'estudi, així que no és possible detectar associacions entre el fenotip i variants rares. D'altra banda, els condicionants econòmics influeixen en la genotipació de SNPs, que vam optar per limitar a 191. Per aquestes raons es van seguir els següents criteris de MAF mínima a l'estudi: superior al 0,15 en gens amb menys de 15 tag SNPs i superior a 0,25 en gens amb més de 15 tag SNPs, segons dades de la base de dades HapMap. Això fa que no puguem detectar variants de baixa freqüència ( $MAF < 0,15/0,25$ ) associades a la malaltia.

En comparar els nostres resultats amb els de l'estudi GWAS en què es va detectar una associació nominal entre l'SNP rs17862920 del gen *TRPM8* i la migranya (Anttila et al. 2010), s'ha observat que a causa de la selecció diferent de polimorfismes que s'ha fet, no tenim informació sobre aquest SNP ni cap que hi mostri un desequilibri de lligament superior al 60%.

### **Interaccions gen-gen**

Els gens actuen en general a través de xarxes complexes d'interacció gen-gen i gen-ambient, i per això s'ha argumentat que els estudis d'associació, tal com estan plantejats en l'actualitat són simplistes i reduccionistes (Colhoun et al. 2003). L'epistasi és l'efecte pel qual una variant o al·lel en un *locus* modifica l'efecte d'una altra variant en un altre *locus*. A nivell estadístic es tradueix en una desviació de l'efecte additiu de dos al·lells de diferents *loci* respecte a la seva contribució al fenotip.

Els estudis d'associació han mostrat limitacions a l'hora de proporcionar nous coneixements per entendre els mecanismes biològics dels efectes epistàtics, però de fet acceptar diferents tipus d'interacció entre *loci* potencialment implicats en la malaltia podria augmentar les probabilitats de detectar efectes genètics (Cordell 2002).

Actualment s'utilitzen diferents mètodes estadístics per detectar interaccions gen-gen que presenten avantatges i inconvenients. La regressió logística és una aproximació que avalua interaccions gen-gen en variables discretes, i permet crear models matemàtics de la relació entre el fenotip i els diversos factors genètics (i també ambientals) de risc. En aquest treball hem avaluat la possible existència de fenòmens epistàtics entre *TRPV1* i *TRPV3*, els dos gens dels quals hem pogut replicar l'associació a migranya, ja que les proteïnes que codifiquen poden formar heterodímers entre elles (Smith et al. 2002; Cheng et al. 2007). El resultat ha estat negatiu, de manera que no s'ha pogut demostrar que la interacció tingui un efecte major que els efectes dels gens per separat. No es pot descartar, però, que aquest resultat sigui conseqüència del limitat poder estadístic de l'estudi d'interacció.

### **Mecanismes epigenètics**

Els mecanismes epigenètics descriuen canvis heretables que no depenen de la seqüència de nucleotídica dels gens. A nivell molecular, els mecanismes epigenètics són canvis en el DNA i les proteïnes reguladores de l'expressió gènica que no modifiquen la seqüència de nucleòtids però que poden comportar el silenciament o l'activació de gens. S'han descrit quatre processos

epigenètics principals: metilació i acetilació de DNA, remodelació de la cromatina, RNAs no codificants i edició de DNA i RNA (Montagna 2008).

En aquest treball de Tesi no hem estudiat els canvis epigenètics que podrien participar en l'etiologia de la migranya, però és possible que alguns dels gens estudiats estiguin sotmesos a aquest tipus de mecanismes, amb efectes potencialment més rellevants que les variants polimòrfiques analitzades i que podrien emascarar o confondre el seu efecte.

## Rèpliques

El propòsit de les rèpliques dels estudis d'associació és l'avaluació, en una cohort independent, d'un resultat positiu obtingut prèviament per confirmar que l'associació identificada inicialment és realment vàlida. Una bona rèplica implica l'anàlisi dels mateixos polimorfismes de l'estudi original i la detecció de la mateixa direcció de l'efecte en com a mínim una segona població. En molts casos els estudis de rèplica no aconsegueixen reproduir els resultats inicials, ja sigui per la diferent composició ètnica de les poblacions estudiades, pels problemes derivats de la mida mostral o per altres factors. Aquestes troballes són essencials per establir la credibilitat d'una associació genotip-fenotip (Chanock et al. 2007), i ajuden a distingir els falsos positius de les associacions realment positives que d'altra banda han de continuar essent estudiades per tal d'identificar la variant directament responsable de l'efecte fenotípic (Abou-Sleiman et al. 2006; Chanock et al. 2007). Actualment la inclusió d'una rèplica en els estudis d'associació està esdevenint un requisit necessari per a moltes revistes científiques per tal de donar credibilitat als resultats obtinguts.

## 2.2 Els canals TRP i la migranya

En aquest treball s'han analitzat gens de la superfamília dels canals TRP mitjançant un estudi d'associació de tipus cas-control entre la patologia i variants genètiques comunes. Com ja s'ha comentat anteriorment, l'estratègia utilitzada per a la selecció de polimorfismes ha estat la cobertura genètica dels gens candidats.

A la població inicial, *discovery*, es van genotipar 149 SNPs que cobreixen 14 gens. En l'anàlisi d'associació de tipus cas-control poblacional centrat en marcadors únics es van detectar 18 SNPs associats nominalment a la migranya, als quals es van afegir 12 SNPs associats en l'anàlisi de marcadors múltiples. Totes aquestes variants es van intentar replicar en una segona població, en què es van detectar associacions amb dos SNPs en l'anàlisi de marcadors únics: rs222741 al gen *TRPV1* en el grup de migranya general i rs7217270 al gen *TRPV3* en el subgrup MA. Els resultats de marcadors únics i múltiples de la primera població que no s'han pogut replicar a la segona població indicarien que possiblement es tracta d'associacions artefactuals degudes a errors de tipus I. No podem descartar, però, que es tracti d'un error de tipus II a la segona població.



Els dos gens que contenen els SNPs replicats co-localitzen a la regió cromosòmica 17p13. Codifiquen dos canals, TRPV1 i TRPV3, quimio- i termo-sensitius de la subfamília dels vanil·loids, moderadament permeables al  $\text{Ca}^{2+}$  (Nilius i Owsianik 2010).

El gen *TRPV1* fou clonat com a receptor de la capsaïcina (la substància responsable del picant al xili) i també pot ser activat per temperatures nocives ( $\geq 42^\circ\text{C}$ ), pH extracel·lular baix (Caterina et al. 1997), voltatge (Gunthorpe et al. 2000) i diversos derivats lipídics (Zygmunt et al. 1999). S'expressa abundantment al sistema nerviós, incloent estructures neuronals com les fibres sensorials C i A $\delta$ , l'arrel del gangli dorsal i el gangli trigemin (Caterina et al. 1997), regions implicades en la fisiopatologia de la migranya. Es creu que aquest canal juga un paper important en la transducció dels estímuls dolorosos.

Treballs previs han relacionat TRPV1 amb la migranya. En determinats pacients l'alcohol actua de factor desencadenant, de la migranya i un possible mecanisme que explicaria aquest fenomen és la inflamació neurogènica. L'etanol causa una inflamació neurogènica que inclou l'extravasació plasmàtica i la vasodilatació arterial mitjançant l'alliberament de neuropèptids mediat pel canal TRPV1 (Trevisani et al. 2002). En aquest procés està involucrat l'alliberament de CGRP (Nicoletti et al. 2008). Així, podria ser que l'activació del TRPV1, mitjançant un mecanisme com la CSD, l'alcohol o un altre esdeveniment desencadenant desconegut, iniciés l'atac de migranya mitjançant l'alliberament de CGRP. Referma aquesta hipòtesi el fet que l'alliberament de CGRP induït per la capsaïcina pugui ser bloquejat en administrar un antimigranyós convencional, el sumatriptan (Eltorp et al. 2000).

A més, s'ha estudiat l'efecte analgèsic del SB-705498, un antagonista del TRPV1, en models animals de mal de cap neurovascular (Lambert et al. 2009). Aquest component químic va ser capaç de prevenir i revertir la sensibilització a impulsos sensorials del TGVS i la *dura mater*. Per això es pensa que TRPV1 està implicat en la al·lodínia trigeminal cutània observada en alguns migranyosos. La firma GlaxoSmithKline està duent a terme un estudi clínic en fase II amb SB-705498 en el tractament agut de la migranya ([clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00269022](http://clinicaltrialsfeeds.org/clinical-trials/show/NCT00269022)), però els resultats encara no s'han fet públics.

El gen *TRPV3* fou identificat l'any 2002 per tres grups independents. També s'expressa a diferents estructures neurals com el gangli trigemin, l'arrel del gangli dorsal, la medul·la espinal i altres teixits del cervell com el tàlem i el nucli estriat (Peier et al. 2002; Smith et al. 2002; Xu, H. et al. 2002). S'activa també per temperatures nocives, però en un rang una mica inferior al TRPV1 ( $\geq 39^\circ\text{C}$ ) (Smith et al. 2002) o fins i tot molt inferior ( $>33^\circ\text{C}$ ) (Moqrich et al. 2005), per diversos agents químics com ara els monoterpènoids (Vogt-Eisele et al. 2007), i també està modulats per voltatge (Smith et al. 2002). Es coneix menys aquest canal que el TRPV1, però sembla que també estaria involucrat en la vasoregulació neurogènica i que està associat al dolor inflamatori.

Els canvis de temperatura són uns dels desencadenants més citats dels atacs de migranya. Així, un 53% de migranyosos identifiquen com a desencadenant els canvis de temps i un 30% la calor (Kelman 2007). A més, s'han descrit l·lindars anormals de resistència al dolor tèrmic en

pacients amb migranya episòdica i crònica, tot indicant que hi ha sensibilització cutània interictal (Schwedt et al. 2011). La manca de dades uniformes sobre els factors desencadenants dels atacs a la nostra mostra de migranyosos ens ha limitat a l'hora de fer una anàlisi estadística que hagués permès comparar les variants genètiques en els gens TRPV1/3 i aquests factors desencadenants.

Les dues variants que s'han trobat associades amb la migranya en el nostre estudi estan localitzades en introns. Es tracta dels SNPs rs222741 (NM\_080704.3:c.-34+2841C>T) i rs7217270 (NM\_145068.2:c.2085+395T>C), pels quals no s'han descrit alteracions de *splicing* o canvis a nivell proteic associats. Com s'ha comentat a l'apartat anterior de la Discussió, altres SNPs funcionals podrien estar en desequilibri de lligament amb els associats.

Els canals TRPV1 i TRPV3 són bons candidats a formar heterodímers dins de la subfamília dels vanil·loids ja que co-localitzen a nivell cromosòmic (i són per tant susceptibles a una regulació conjunta de l'expressió), s'ha vist que es co-expresen a les mateixes neurones i que comparteixen si més no un mecanisme d'activació (temperatura) (Smith et al. 2002). La unió entre les proteïnes TRPV1 i TRPV3 humanes s'ha verificat per experiments de co-immunoprecipitació i per assaigs funcionals en sistemes heteròlegs, i s'ha observat que els heteròmers mostren una resposta modulada del TRPV1 (Smith et al. 2002 64). En el model murí també s'ha detectat la unió de les dues subunitats mitjançant la tècnica *Fluorescence Resonance Energy Transfer* (FRET), tot observant-se senyals FRET limitats a la membrana plasmàtica. Finalment, enregistraments electrofisiològics d'un sol canal van mostrar canals heteromèrics que tenen propietats d'obertura i conductància intermèdia (Cheng et al. 2007 127).

Per totes aquestes evidències s'ha estudiat a la població rèplica la possible interacció entre els SNPs associats, però no es van trobar proves significatives de l'existència d'efectes epistàtics entre aquests gens que incrementessin el risc de desenvolupar migranya.

En el gen *TRPM6* es va detectar associació entre l'SNP rs9650767 i tot el grup de migranyosos, però l'al·lel de risc era diferent a la població *discovery* que a la població de rèplica. Això podria ser degut a un fenomen de *flip-flop* (Lin et al. 2007), però segurament es tracta d'un fals positiu, ja que les dues poblacions pertanyen a la mateixa regió geogràfica.

No coneixem altres estudis d'associació fets amb els gens TRPs però, tal i com s'ha indicat més amunt, en un GWAS de migranya (veure apartat 2.3.2 de la Introducció) es va detectar una associació nominal entre l'SNP rs17862920 del gen *TRPM8* i el fenotip MA ( $P=1.26E-05$ , OR=1.28 [1.14-1.44]). Aquest gen codifica el receptor de fred i mentol (Anttila et al. 2010). Lamentablement, el nostre disseny no cobria de forma adequada aquesta regió i no hem pogut intentar replicar aquest resultat (veure apartat 2.1 de la Discussió).

### 3. Consideracions generals sobre la migranya

#### 3.1 Heterogeneïtat clínica i genètica de la migranya

##### 3.1.1 El rol dels gens FHM en SHM i en MA no hemiplègica

La relació genotip-fenotip és més complexa del que hom podria pensar, *a priori*, en les formes monogèniques de migranya. Encara que hi ha pacients portadors de mutacions en un dels tres gens FHM1/2/3 amb les mateixes característiques clíniques, hi ha una variabilitat fenotípica molt gran entre els pacients que tenen migranya hemiplègica. Els individus portadors de mutacions en el mateix gen poden tenir diversos símptomes acompanyants de la migranya hemiplègica. A més, pacients amb la mateixa mutació en el mateix gen poden presentar símptomes molt diferents fins i tot dins la mateixa família, com es pot observar en el cas de la família A00\_100 en què portadors de la mutació p.Arg583Gln presenten un espectre clínic que comprèn l'atàxia episòdica de tipus 2, l'atròfia cerebel·losa, la migranya amb aura i la migranya hemiplègica (veure **figura 1** a l'Article 1 dels Resultats). També s'ha descrit penetració incompleta, com en el cas d'una família de portadors de la mutació freqüent p.Thr666Met en què l'únic fenotip que presentaven alguns membres portadors de la mutació eren atacs de confusió sense hemiparèsia (Kors et al. 2003).

En la migranya hemiplègica hi ha una àmplia heterogeneïtat genètica. Fins ara s'han identificat només tres gens responsables de la patologia, però hi ha un percentatge elevat de pacients en què encara no es coneix la causa del trastorn després d'haver analitzat els gens coneguts. A la nostra mostra de 19 pacients s'han identificat mutacions en un 42,1% dels casos. Els pacients en què no hem pogut detectar cap canvi potencialment patogènic, podrien presentar mutacions en regions no estudiades dels gens *CACNA1A* o *ATP1A2*, com els introns, la regió promotora o l'extrem 3'UTR. Un altre aspecte a tenir en compte és que la seqüenciació de les regions codificants dels gens candidats no permet identificar reordenaments grans, com CNVs, delecions o insercions. Aquest tipus d'alteracions moleculars són també objecte d'estudi en el marc del nostre projecte. També podrien tenir alteracions en el gen *SCN1A*, en què no s'ha dut a terme una cobertura sistemàtica per seqüenciació, tot i que és un gen relacionat principalment amb epilèpsia. El més probable, però, és que hi hagi altres *loci* implicats, que estem intentant identificar mitjançant anàlisi de lligament a escala genòmica i mètodes de seqüenciació massiva d'exomes.

En un estudi de seguiment dut a terme durant gairebé una dècada en pacients amb diagnòstic SHM, el diagnòstic canvia a FHM en un 22% dels casos, aportant evidències que SHM i FHM formen part del mateix espectre migranyós (Stam et al. 2011). Tot i que la proporció d'individus amb SHM que tenen mutacions als gens FHM1/2/3 és més baixa que als individus amb familiars afectats de HM, aquests resultats també ens indiquen que hi ha altres factors ambientals i potser genètics que estan involucrats en la SHM. Podria ser, per exemple, que la

HM fos causada no per un sinó per un conjunt de gens de penetració moderada, i només quan es dóna una determinada combinació de mutacions en diferents gens, es presenta el fenotip HM. I la presència d'una combinació més reduïda o diferent d'alteracions genètiques donaria lloc a fenotips migranyosos més lleus. Aquesta idea estaria recolzada pel fet que molts pacients HM tenen familiars amb formes de migranya comuna (MO o MA). Podríem parlar llavors d'una herència oligogènica, tot i que encara no s'ha trobat cap família amb mutacions patogèniques a diferents gens que pugui confirmar la validesa d'aquest model en la FHM.

La intervenció d'altres factors genètics i/o ambientals en la modulació del conjunt de símptomes que presenten els pacients amb migranya hemiplègica incrementaria l'heterogeneïtat clínica dins de les famílies. Un exemple de la influència de factors genètics seria el cas de la família 1\_5C, en què no s'ha pogut identificar la mutació causal de la migranya hemiplègica però s'ha identificat la variant moduladora p.Ala454Thr, que confereix als portadors un fenotip menys sever que a la resta de familiars. Els portadors no presenten aura sensitiva ni motora però sí aura visual (Article 3 dels Resultats). Això reforça la idea que la migranya hemiplègica i les formes comunes de la migranya són part del mateix espectre, essent la HM un fenotip més greu que la migranya amb aura visual aïllada.

### **3.1.2 L'heterogeneïtat en les formes complexes de la migranya**

La migranya comuna és, amb tota probabilitat, encara molt més heterogènia que les migranyes monogèniques, més rares, i això fa que la identificació de gens en les formes comunes sigui una tasca difícil. A les formes complexes de la malaltia hi ha una gran variabilitat clínica, de tal manera que els diversos endofenotips que s'utilitzen pel diagnòstic de migranya augmenten l'heterogeneïtat de la mostra. La classificació més utilitzada és la que segueix els estrictes criteris de la ICHD-II. La ICHD-II determina que amb un mínim de dos atacs de migranya amb aura el pacient rep un diagnòstic de MA. D'aquesta forma arbitrària se simplifica la classificació però augmenta molt la variabilitat dintre del grup MA, ja que hi ha pacients que manifesten els dos tipus d'atacs, amb aura i sense aura, en proporcions molt diverses. Encara que un pacient tingui una majoria d'atacs sense aura, en base a la ICHD-II es classificaria com a MA si ha tingut dos atacs amb aura al llarg de la vida. Aquest és un tema extensament discutit pels experts i en el marc del consorci IHGC s'ha proposat diagnosticar els pacients com a MA només quan tenen un percentatge elevat d'atacs amb aura (per exemple, un mínim d'un terç dels atacs). A més, hi ha pacients que queden fora de la classificació perquè no acaben de complir exactament els tres criteris diagnòstics (durada, característiques dels atacs i símptomes acompanyants). Aquesta heterogeneïtat clínica, deguda en part a l'arbitrarietat dels criteris diagnòstics, influeix segurament en la manca de resultats conclouents en la cerca de *loci* de susceptibilitat per a la migranya complexa.

Hi ha dues estratègies de classificació que s'han utilitzat per reduir la variabilitat de les poblacions de migranya comuna. L'anàlisi de classes latents (*Latent Class Analysis*, LCA) és una aproximació empírica que forma classes de pacients en base a patrons de símptomes

seleccionats a partir d'estimacions d'heretabilitat. Els grups es basen en la combinació i la gravetat dels símptomes. D'altra banda, l'anàlisi de components d'un tret (TCA) classifica en endofenotips definits a partir de subgrups de criteris ICHD-II (fotofòbia, fonofòbia, freqüència dels atacs, etc). Les dues estratègies s'han utilitzat per realitzar estudis de lligament genètic i s'han descobert nous *loci* de susceptibilitat per endofenotips, per exemple pel caràcter pulsatiu del dolor al cromosoma 5p21 amb el mètode LCA (Nyholt et al. 2005). Aquest tret no s'ha pogut replicar i de fet un altre estudi mitjançant TCA va determinar un altre locus a 17p13 pel mateix tret (Anttila et al. 2006). És necessari tenir una bona base de dades clínica per poder fer aquestes anàlisis.

Una altra possible forma de reduir l'heterogeneïtat consistiria a treballar amb poblacions genèticament aïllades. Aquestes poblacions tenen un fons genètic i ambiental més uniforme, una reducció de l'heterogeneïtat de les variants rares i estan més a prop de l'equilibri Hardy-Weinberg (Peltonen et al. 2000).

### 3.2 Comorbiditat amb altres trastorns

Un altre mètode per identificar gens i vies implicades en malalties complexes és l'estudi d'altres malalties que siguin comòrbides. Hi ha una relació bidireccional entre la migranya i diverses malalties neurològiques com l'epilèpsia, la depressió i els accidents vasculars cerebrals. Això fa pensar que comparteixen en part un fons etiològic comú. En el cas de la migranya i l'epilèpsia podria ser que la causa de les dues malalties fos una disfunció de canals iònics; mutacions als *locus* FHM1/2/3 poden causar epilèpsia, i de fet les mutacions al *SCN1A* (FHM3) s'associen majoritàriament a l'epilèpsia infantil i no tant a migranya. A més, s'ha identificat un *locus* al cromosoma 9q21-22 lligat a un fenotip d'epilèpsia del lòbul occipito-temporal i migranya amb aura (revisat a (Stam et al. 2008)).

La migranya pot ser també part de l'espectre clínic d'altres malalties monogèniques. Un dels exemples més clars és el CADASIL (arteriopatia dominant amb infarts subcorticals i leucoencefalopatia). Un terç dels pacients presenten MA i menys freqüentment MO. El CADASIL està causat per mutacions al gen *NOTCH3*, que codifica un receptor que juga un paper important en la funció de les cèl·lules vasculares de la musculatura llisa en petits vasos del cervell. El lligam sobretot amb MA fa pensar que d'alguna forma el *NOTCH3* mutant està implicat en un increment de susceptibilitat a la CSD (revisat a (Stam et al. 2008)). Un altre trastorn vascular amb migranya comòrbida és la vasculopatia retiniana amb leucodistrofia cerebral (RVLC), una síndrome vascular rara causada per mutacions al gen *TREX1* (Richards et al. 2007). Aquest gen codifica una exonucleasa d'ADN 3'-5', que s'expressa ubiqüament i que té una funció cel·lular bàsica en el mecanisme de resposta a l'estrès oxidatiu. També està involucrada en l'apoptosi. No se sap encara quin és el mecanisme mitjançant el qual les mutacions de *TREX1* causen la malaltia. Aquests trastorns genètics fan pensar que hi ha una disfunció neurovascular implicada en la fisiopatologia de la migranya, en particular en els primers esdeveniments que precedeixen l'aparició de mal de cap. (Dalkara et al. 2010). Una

altra malaltia relacionada és la síndrome MELAS (encefalomiopatia mitocondrial, acidosi làctica, episodis del tipus accident vascular encefàlic) originada principalment per mutacions puntuals en el DNA mitocondrial, i que pot ocasionar atacs de cefalea molt similars a la migranya. En aquest cas, els estudis en migranyosos amb aures greus o prolongades o amb patró d'herència materna, no han confirmat que aquestes mutacions siguin prevalents (Buzzi et al. 2000; Di Gennaro et al. 2000; Rozen et al. 2004).

Recentment s'han identificat mutacions al gen *SLC4A4*, que codifica un cotransportador de bicarbonat sòdic, en un trastorn d'herència monogènica que inclou migranya hemiplègica (Suzuki et al. 2010). En aquest treball identifiquen mutacions en homozigosi al gen *SLC4A4* en cinc famílies amb acidosi tubular proximal renal i anomalies oculars que presenten a més migranya (FHM, MA i/o MO). Els autors postulen que el mecanisme pel qual les mutacions donarien lloc a migranya és mitjançant un canvi de pH. Els astròcits que expressen la proteïna anòmala no serien capaços de regular el pH en resposta a un augment de  $K^+$  i aquesta alcalosi extracel·lular incrementaria l'excitabilitat neuronal i per tant el risc de CSD. En un altre treball es va identificar una mutació al gen *SCL1A3* que codifica la proteïna EAAT1, un transportador de glutamat, en un pacient amb atàxia episòdica severa, convulsions i hemiplègia alternant. Els estudis funcionals van mostrar que una pèrdua de funció del transportador de glutamat podria contribuir a la hiperexcitabilitat neuronal (Jen et al. 2005) En un altre pacient amb atàxia episòdica es va trobar una mutació que produïa una pèrdua de funció més lleu (de Vries, B. et al. 2009). Aquests dos trastorns amb migranya comòrbida apunten a un paper de l'hiperexcitabilitat cortical com a mecanisme fisiopatològic subjacent, el mateix que s'ha proposat per a la MA.

### **3.3 La migranya sense aura i la migranya amb aura són el mateix trastorn?**

Hi ha un important debat sobre si MA i MO són trastorns etiològicament diferenciats. La fase de cefalea d'aquests subtipus clínics de la migranya comparteix el mateix quadre clínic, però la MA està associada amb símptomes neurològics reversibles que tenen lloc en general just abans de l'inici de la fase de cefalea (IHS 2004). Per als dissenys dels estudis genètics, és important saber si els subtipus han de ser tractats com a entitats patològiques diferents amb una base genètica també potencialment diferent.

Actualment, la major part dels autors consideren més possible que MO i MA siguin simplement dues expressions clíniques del mateix trastorn més que no pas dues malalties diferents ((Ligthart et al. 2006; Wessman et al. 2007; Russell 2008; Maher i Griffiths 2011)). La separació en aquests dos subtipus es deu al fet d'utilitzar els criteris arbitraris de la IHS per classificar els casos. L'ús d'un mètode alternatiu de classificació LCA suggereix que MA i MO no serien entitats diferents. LCA reconeix tres classes de mal de cap: de classe lleugera, de classe moderada (8% que reporten símptomes d'aura) i un tipus greu de migranya (en general amb símptomes neurològics, amb un 50% de pacients que reporten símptomes d'aura); hi hauria

també una classe asimptomàtica (Nyholt et al. 2004; Ligthart et al. 2006). Donada la superposició dels símptomes neurològics i d'aura entre classes, aquests resultats no donen suport a la separació dels subtipus MO i MA. Per tant, podria esperar-se que uns quants gens de susceptibilitat estiguin a la base d'ambdós trastorns.

La identificació de la CSD com a fenomen responsable de l'aura està en gran mesura demostrat i acceptat dins la comunitat científica. Hi ha evidències que suggereixen que la CSD pot activar el sistema trigèminovascular (TGV) i les vies descendents del dolor pròpies de la migranya (Bolay et al. 2002; Ayata 2010; Eikermann-Haerter i Ayata 2010). No obstant, els mecanismes exactes que condueixen a l'activació TGV encara no s'han establert. Tampoc s'explica que el tractament amb ketamina pugui reduir els símptomes d'aura, però en canvi no eviti el mal de cap (Kaube et al. 2000). La presència de la CSD a la MO és encara motiu de debat. S'ha proposat la presència d'una aura 'silent' en la MO que comportaria el desencadenament dels mateixos mecanismes que per MA en àrees subcorticals clínicament silencis del cervell sense propagació a l'escorça visual (Moskowitz 2008), però això mai ha estat demostrat.

### 3.3.1 Hipòtesi de treball per a la migranya complexa

La migranya comuna està probablement influïda per múltiples gens i desencadenants ambientals. Les interaccions gen-gen i gen-ambient que segurament estan involucrades en el trastorn augmenten la variabilitat genètica i podrien explicar també per què als diferents estudis s'obtenen resultats conflictius en els estudis d'associació (Maher i Griffiths 2011).

En aquest treball hem partit, respectivament, de les hipòtesis *Rare Disease - Rare Variant* (RDRV) per a la FHM i *Common Disease - Common Variant* (CDCV) per a la migranya comuna. Hi ha, però, una aproximació alternativa per les malalties complexes que seguiria el paradigma *Common Disease - Rare Variant* (CDRV). A la **taula 7** es comparen de forma detallada les dues hipòtesis.

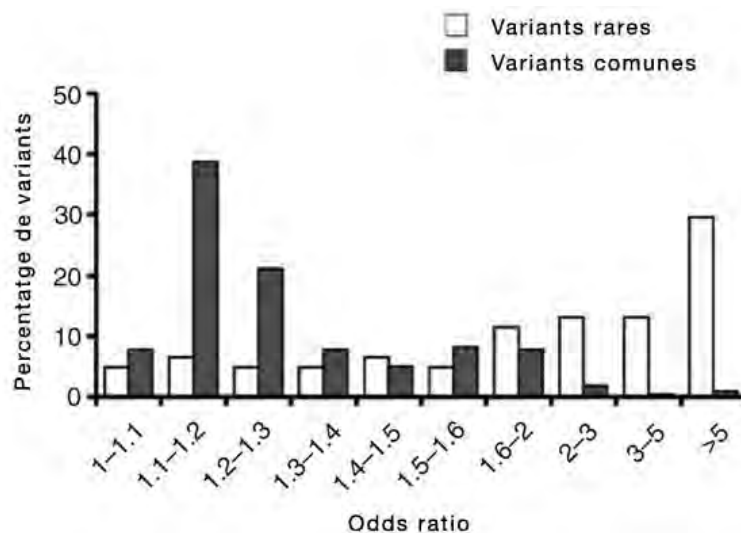
**Taula 7.** Variants comunes i variants rares i etiologia de les malalties complexes (Bodmer i Bonilla 2008)).

Common disease variants	Rare disease variants
Discovery by population association, case-control studies, using genome-wide markers (WGA)	Discovery by DNA resequencing of candidate genes, preferably in early onset cases
Mostly MAF > 5%	with one or more relatives affected MAF > 0.1% to 2–3%
Explained by LD with functional variant OR mostly between 1.2 and 1.5 Higher ORs could be due to recent natural selection No familial concentration Need large studies with control for ethnic heterogeneity to achieve statistical significance and minimize false positives Make substantial contribution to PAR Low penetrance makes prophylactic intervention unlikely Hard to find functionally relevant variant Contribution to disease etiology questionable May suggest candidates for rare variant search	Higher than rare familial mutations, lower than polymorphisms. Often population specific. Not detected by WGA OR mostly $\geq 2$ No familial concentration Assess significance by increased frequencies in cases vs. controls and by functional analysis of variant Summation of effects of several variants make significant contribution to PAR Penetrance often high enough to justify prophylactic interventions Variants identified are functionally relevant Make a contribution to understanding disease etiology Effect may be modified by common variants

La hipòtesi de treball que s'ha utilitzat per a l'estudi de la migranya complexa es basa en la creença que la component genètica està formada per moltes variants comunes que tenen un petit efecte individual en la susceptibilitat a la malaltia.

La hipòtesi de les variants rares proposa que una part significativa de la susceptibilitat genètica de les malalties complexes pot ser deguda a la suma dels efectes d'una sèrie de variants gèniques de baixa freqüència que actuen de forma dominant i independent; cadascuna d'aquestes variants aportaria un augment moderat però detectable del risc relatiu. Aquestes variants rares en la seva majoria serien específiques de la població a causa de l'efecte fundador resultant de la deriva genètica (revisat a (Bodmer i Bonilla 2008)).

En principi les variants comunes presents tindrien una petita contribució a la malaltia, mentre que les variants rares tindrien un efecte moderat. Això està recolzat pel fet que la mitjana de les OR de les variants comunes de risc identificades en un estudi que inclou més de 200 polimorfismes associats a patologies és de 1,36, mentre que les variants rares recollides presenten un OR mitjà de 3,74 (**Figura 13**) (Bodmer i Bonilla 2008). Un nombre relativament petit de variants rares (més de 10, probablement menys de 100) podrien tenir així una contribució substancial a l'herència multifactorial de la malaltia.



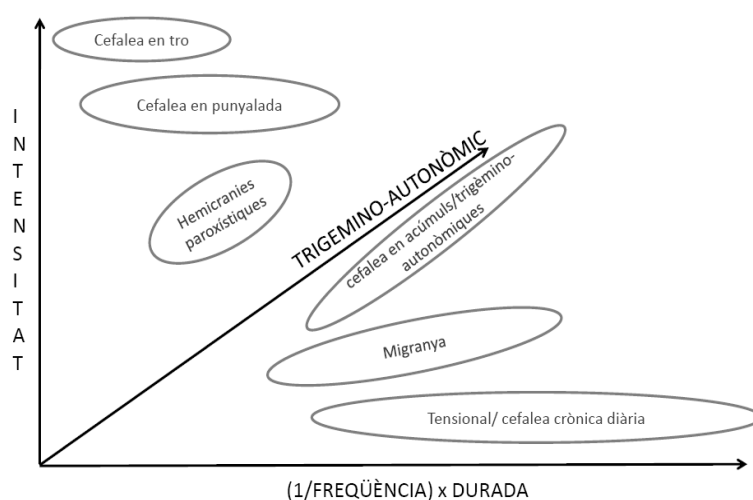
**Figura 13.** Distribució dels OR per a les variants comunes i rares. Es van incloure 61 variants rares i 217 variants comuns trobades a la literatura (Adaptat de (Bodmer i Bonilla 2008)).

### 3.4 Les cefalees primàries com a continuum

Alguns autors proposen una nova perspectiva de les cefalees. Així, es consideraria el conjunt de les cefalees primàries com un continuum, les dimensions del qual estarien delimitades per la severitat de la cefalea, la durada i la freqüència dels episodis, així com la presència de simptomatologia trigeminal autonòmica associada (**figura 14**) (Lane i Davies 2006). Actualment, la classificació ICHD-II inclou quatre grups diferenciats de cefalees primàries: les migranyes, les cefalees tensionals, cefalea en acúmuls i altres cefalees trigeminals



autonòmiques, a més d'un grup d'altres cefalees primàries (IHS 2004). La nova proposta es basa principalment en l'observació del fenotip del mal de cap. Una de les evidències que recolza aquesta hipòtesi és l'elevat grau de solapament clínic: cap símptoma es dona de forma exclusiva en un únic tipus de cefalea primària. D'una banda, alguns pacients pateixen una transformació del fenotip, p.ex. la presentació d'una cefalea com a migranya i la seva persistència en forma de cefalea tensional entre un episodi migranyós i el següent. D'altra banda, hi ha símptomes dependents de l'edat com els dels equivalents migranyosos en període infantil que evolucionen a fenotips més típics en adults. Finalment, hi ha individus que presenten co-ocurrència de diferents cefalees primàries en un mateix període de la vida (Lane i Davies 2006). És a dir, una cefalea no és sempre igual al llarg de la vida, de tal manera que es donen transicions entre els diferents tipus de cefalea en un mateix individu.



**Figura 14.** Ideograma de les síndromes de mal de cap primari vist com un continuum definit per paràmetres d'intensitat de la cefalea en l'eix Y, les variables de freqüència i la durada a l'eix X, i el grau en què les manifestacions són un reflex autonòmic trigeminal en l'eix Z. Es mostren alguns fenotips definits per la ICHD-II. El mal de cap primari de qualsevol pacient podria ser representat en el gràfic. (Lane i Davies 2006).

Segons aquesta teoria, les síndromes de mal de cap primari en comptes de constituir diferents trastorns causats per diferents factors genètics i esdeveniments neuroquímics, serien totes impulsades pel mateix procés, el mecanisme de la migranya. I seria el llindar d'activació d'aquest mecanisme el que estaria determinat genèticament. Es considera com una forma simptomàtica de migranya el grup de trastorns genètics rars i poc comuns que es caracteritzen per símptomes prominents de migranya, en particular l'aura, la migranya hemiplègica FHM, el CADASIL, i la migranya associada amb malaltia mitocondrial (Lane i Davies 2006).

Tenint en compte aquest punt de vista, seria crucial utilitzar, en els estudis sobre la base genètica de la migranya, controls en què s'hagin exclòs tots els tipus de cefalea i no només la migranya, tal i com s'ha fet en aquesta Tesi Doctoral. Aquesta estratègia podria esbiaixar, però, la població control, cap a l'extrem amb una genètica més "protectora" de la migranya, de manera que s'accentuarien, potser de forma poc real, les diferències entre casos i controls.

## 4. Perspectives de futur en l'estudi de la migranya

Fins ara no s'han identificat factors genètics que expliquin un elevat percentatge del fenotip migranyós. Encara estem lluny de tenir una idea clara sobre el paisatge gènic complet que determina el desenvolupament de la malaltia, tant en les formes monogèniques com en les formes complexes de la migranya.

### 4.1 Aproximació a les formes complexes

Els resultats, escassos, obtinguts fins ara en els estudis d'associació clàssics que se centren sobretot en variants de tipus SNP en gens candidats, subratllen la importància de 1) utilitzar mostres suficientment grans de pacients i controls o de famílies per assolir un poder estadístic apropiat per detectar diferències genotípiques entre individus, 2) insistir en aproximacions lliures d'hipòtesis per detectar variants comunes de risc, com els estudis d'associació a escala genòmica (GWAS), 3) utilitzar enfoc analítics centrats no només en els gens sinó també en sistemes de gens/vies funcionals, 4) analitzar altres tipus de variacions, com les variacions en el número de còpies (CNVs), les variants rares, ja siguin del tipus CNV o puntuals, 5) analitzar possibles efectes epigenètics i 6) incorporar als estudis genètics els factors de risc ambientals, que si no es tenen en compte poden actuar com a variables de confusió tot emmascarant factors genètics de susceptibilitat.

#### 4.1.1 GWAS: variants genètiques comunes

Actualment s'estan deixant enrere els estudis d'associació amb gens candidats per donar pas a abordatges a escala genòmica (*Genome-Wide Association Studies*, GWAS), en què s'analitzen sistemàticament centenars de milers o milions de SNPs distribuïts al llarg de tot el genoma sense una hipòtesi específica de partida sobre la possible identitat de les variants de susceptibilitat. Aquest abordatge és especialment interessant per a aquelles patologies en què no es coneixen amb certesa les bases fisiopatològiques, i té l'avantatge, respecte als estudis de gens candidats, que no hi ha biaixos o assumpcions apriorístiques sobre les causes del trastorn que tot sovint no són correctes. S'espera identificar així gens prèviament insospitats i descobrir nous processos biològics involucrats en la malaltia, tal i com s'ha esdevingut amb d'altres patologies. D'alguna manera, aquest canvi d'enfoc es podria comparar a l'adveniment dels estudis de lligament genètic a escala genòmica en malalties monogèniques ara fa uns 20 anys, que va donar lloc a un increment molt significatiu en el ritme d'identificació de nous gens causals.

De moment l'única variant significativa identificada en un GWAS està associada a la MA i està situada en un *locus* d'expressió d'un tret quantitatiu (eQTL) que afecta el metabolisme del glutamat. Les dades funcionals suggereixen que l'al·lel de predisposició rs1835740G>A

estimula l'expressió de la metadherina (MTDH), gen que al seu torn regula a la baixa el gen *EAAT2*, el principal transportador de glutamat al cervell. Aquesta troballa estimula la hipòtesi que l'acumulació de glutamat, un neurotransmissor potent, a la fenedura sinàptica podria contribuir a l'aparició de les crisis de migranya també en la MA (Anttila et al. 2010).

En un segon treball, consistent en una meta-anàlisi de sis GWAS (Ligthart et al. 2011), es va detectar una associació nominal de la migranya amb el gen *NGFR*, però no es va poder replicar. En aquest mateix estudi es va observar una associació modesta però significativa amb el gen *MTDH* després d'aplicar la correcció de Bonferroni per tests múltiples aplicada a gens ( $P = 0,026$ ). És evident que, malgrat l'elevat nombre de pacients i controls que es van incloure, l'estudi no tenia prou poder estadístic. A més d'augmentar la grandària de la mostra, és necessari utilitzar altres estratègies per reduir l'heterogeneïtat genètica i fenotípica en aquest tipus d'estudis. Entre les estratègies per assolir aquest objectiu d'homogeneïtzació es podria incloure la identificació de biomarcadors fiables o l'estratificació de la mostra en base a la similitud fenotípica (p.ex. utilitzant els sistemes de classificació TCA/LCA, més oberts que els relativament arbitraris criteris ICHD-II i/o considerant patologies comòrbides).

Els consorcis permeten l'agrupació de diferents laboratoris que aporten mostres i fons econòmics per assolir el repte d'identificar noves associacions a escala genòmica, però en contrapartida cal assumir generalment una heterogeneïtat elevada en les dades clíniques disponibles i fins i tot en el perfil fenotípic i ètnic de pacients i controls, especialment quan les mostres són retrospectives. És per això que, en consonància amb l'increment de la grandària mostral, cal treballar en l'homogeneïtzació de les cohorts. El nostre grup d'investigació està integrat a l'*International Headache Genetics Consortium* (IHGC) i participa actualment en un GWAS centrat en pacients amb migranya sense aura.

#### 4.1.2 Variants genètiques rares

L'estudi de variants rares a les malalties complexes té la problemàtica que en tenir una freqüència molt baixa a les poblacions, el poder estadístic dels estudis és en principi limitat. No obstant, partint de la premissa que aquestes variants podrien tenir un efecte major sobre el fenotip, a diferència de les variants comunes, sembla que seria possible identificar-les utilitzant cohorts de dimensions no massa grans. La idea subjacent és que les malalties complexes podrien ser degudes, almenys en part, a combinacions de variants rares altament penetrants en un conjunt limitat de gens (hipòtesi *Common Disease / Rare Variant*), per contraposició a la hipòtesi que s'ha estat valorant fins ara, segons la qual la causa dels fenotips complexes estaria en un grup ampli de variants comunes d'efecte menor (*Common Disease / Common Variant*). Aquests darrers mesos han aparegut els primers resultats en aquesta línia, en malalties complexes com el retard mental o l'autisme (Vissers et al. 2010; O'Roak et al. 2011). Curiosament, en el cas de l'estudi sobre pacients autistes, la seqüenciació de l'exoma de 20 triades familiars va conduir a la identificació de variants *de novo* possiblement patogèniques en quatre gens, un d'ells el *SCN1A*.

En el cas de la migranya, diversos grups, alguns dels quals formen part del IHGC, estan seqüenciant actualment l'exoma d'individus amb diferents tipus de migranya amb aura.

#### **4.1.3 Altres variants genètiques**

D'altra banda, a més de les variacions puntuals, hi ha altres canvis genètics, rars o freqüents, que contribueixen significativament a la diversitat genètica de les poblacions humanes i ja s'han relacionat amb alguns trastorns genètics, com per exemple els CNVs, les delecions o les insercions, que poden ocupar més d'una megabase (Zhang, F. et al. 2009). Com els SNPs, els CNVs poden estar presents en individus sans, encara que alguns estan clarament involucrats en malalties conegudes, que inclouen trastorns neuropsiquiàtrics com l'autisme, l'esquizofrenia o l'epilèpsia (Mefford i Eichler 2009).

#### **4.1.4 Efectes epigenètics**

L'epigenètica és l'estudi de canvis al DNA o a proteïnes que s'uneixen al DNA que, tot alterant l'estructura de la cromatina, no modifiquen la seqüència de nucleòtids. Aquestes modificacions poden estar associades a canvis heretables en la funció gènica.

Els mecanismes moleculars epigenètics inclouen la metilació de residus citosina a les illes CpG, que es troben a un 40% dels promotors i que donen lloc a un silenciament dels gens diana), mecanismes de RNA de interferència, pels quals petites molècules de microRNA silencien l'expressió gènica o canvis a les histones (proteïnes involucrades en la formació de la cromatina) que regulen l'activació o inactivació de regions genòmiques. Aquests canvis podrien anar-se acumulant/variant amb l'edat i poden ser modificats per l'estil de vida i la dieta (revisat a (Montagna 2008)). L'estudi d'aquest efectes podria explicar en part per què alguns pacients no responen mai a certs medicaments, o per què alguns pacients deixen de respondre als medicaments en un moment donat (Schurks 2008).

## **4.2 Aproximació a les formes mendelianes**

El fet que no es detectin mutacions en tots els pacients amb migranya hemiplègica als tres *loci* coneguts de FHM implica que hi ha d'altres gens implicats en la malaltia encara desconeguts.

Si es disposa de famílies extenses en què el fenotip no cosegrega amb cap dels *loci* prèviament descrits en FHM es pot intentar d'identificar el gen responsable tot realitzant estudis de lligament a escala genòmica. Hi ha un *locus* descrit per membres del nostre equip de recerca al cromosoma 14q32 que està lligat a la migranya hemiplègica en què de moment no s'ha identificat el gen responsable (Cuenca-Leon et al. 2009). Serà interessant comprovar si està implicat d'alguna forma en la neurotransmissió del glutamat o afecta d'altres mecanismes fisiològics.

### **4.2.1 Seqüenciació massiva**

Una aproximació que no requereix disposar de famílies grans i que podria oferir resultats positius és la seqüenciació massiva d'exomes o de genomes per tal de detectar variants rars

en formes monogèniques de la malaltia. En els darrers dos anys han aparegut desenes de publicacions en què s'analitzen els exomes en malalties monogèniques, algunes d'elles neurològiques, i s'identifica la causa del trastorn (Barak et al. 2011; Caliskan et al. 2011; Klein et al. 2011).

Aquesta podria ser una estratègia vàlida per cercar mutacions a les famílies FHM en què no s'han detectat mutacions als gens coneguts.

## CONCLUSIONS

---

1.- S'ha dut a terme el cribratge mutacional del gen **CACNA1A** en 17 pacients espanyols i dos pacients grecs amb migranya hemiplègica. S'han identificat cinc mutacions causals prèviament descrites (p.Ser218Leu, p.Thr501Met, p.Arg583Gln, p.Thr666Met i p.Tyr1387Cys), dues d'elles *de novo*. S'ha identificat a més una variant intrònica nova, c.2175+9G>A, que podria alterar el procés de *splicing*. S'ha identificat també un canvi modulador del fenotip, p.Ala454Thr.

2.- La mutació *de novo* **p.Tyr1387Cys** en el gen **CACNA1A** s'ha detectat en una pacient amb retard en el desenvolupament psicomotor, atàxia crònica i episodis prolongats de migranya hemiplègica. En aquesta pacient es va objectivar un edema citotòxic durant un dels episodis d'hemiplègia amb la troballa radiològica inusual d'afectació unilateral del neoestriat, congruent amb l'hemiplègia. En el seguiment de la pacient es va observar atrofia del nucli estriat i del cerebel, dada que reforça i estén als nuclis de substància gris central el caràcter degeneratiu d'algunes formes greus de migranya hemiplègica.

3.- La mutació **p.Thr501Met** en el gen **CACNA1A**, identificada en un pacient amb migranya hemiplègica, ha estat objecte d'estudis funcionals que indiquen que provoca una reducció del llindar del voltatge tant per a l'activació com per a la inactivació del canal. Aquests canvis condueixen a un augment de l'activitat del canal Ca<sub>v</sub>2.1.

4.- La mutació **p.Ala454Thr** en el gen **CACNA1A** s'ha identificat en una família amb individus FHM, MA i MO. Aquesta mutació altera la regulació de la inactivació dependent de voltatge de l'estat de repòs per part de les subunitats Ca<sub>v</sub>β del canal, accelera la inhibició provocada pel dímer βγ de la proteïna G després d'una despolarització facilitadora, i evita la interacció de la syntaxina 1A amb la subunitat Ca<sub>v</sub>2.1, tot anul·lant els efectes de la seva modulació i disminuint l'eficàcia en la secreció de neurotransmissor per la neurona. La presència de la mutació només en els individus de la família que no tenen símptomes sensitivo-motors (hemiplègia), suggereix que està implicada en la modulació del fenotip migranyós, tot disminuint-ne la gravetat.

5.- S'ha dut a terme el cribratge mutacional del gen **ATP1A2** en 17 pacients espanyols i dos pacients grecs amb migranya hemiplègica, i s'ha identificat la mutació prèviament descrita p.Ala606Thr i la mutació nova amb origen *de novo* p.Glu825Lys.

6.- S'han realitzat estudis funcionals per demostrar la patogenicitat del canvi **p.Glu825Lys** en el gen *ATP1A2*. Assaigs de supervivència en cèl·lules HeLa transfectades amb una construcció *ATP1A2* portadora de la mutació p.Glu825Lys en comparació amb cèl·lules transfectades amb la construcció WT mostren una baixa supervivència (10%) de les cèl·lules transfectades amb la construcció mutant, tot suggerint que la mutació afecta la funció de la bomba.

7.- S'ha avaluat la participació en la susceptibilitat a la migranya comuna i als seus dos subtipus clínics principals, migranya sense aura (MO) i migranya amb aura (MA), de 149 variants polimòrfiques de tipus SNP en 14 gens candidats de la **superfamília dels canals TRP**, mitjançant un estudi d'associació de tipus cas-control amb rèplica. S'han identificat associacions nominals entre MO i variants en els gens *TRPC1*, *TRPC7* i *TRPM8*, entre MA i els gens *TRPA1*, *TRPC4*, *TRPV3*, *TRPV4*, *TRPM4*, *TRPM8* i *TRPV1* i entre tota la mostra de migranyosos i els gens *TRPC4*, *TRPM8*, *TRPV1* i *TRPM6*.

8.- Les associacions entre la MA i el SNP rs7217270 situat al gen ***TRPV3*** i la migranya i el SNP rs222741 situat al gen ***TRPV1*** s'han replicat en una segona mostra, tot suggerint la participació d'aquests gens en la susceptibilitat a la migranya.

## BIBLIOGRAFIA

- Abou-Sleiman PM, Hanna MG i Wood NW** (2006). "Genetic association studies of complex neurological diseases." *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77(12): 1302-1304.
- Adams PJ, Garcia E, David LS, Mulatz KJ, Spacey SD i Snutch TP** (2009). "Ca(V)2.1 P/Q-type calcium channel alternative splicing affects the functional impact of familial hemiplegic migraine mutations: implications for calcium channelopathies." *Channels (Austin)* 3(2): 110-121.
- Adams PJ, Rungta RL, Garcia E, van den Maagdenberg AM, MacVicar BA i Snutch TP** (2010). "Contribution of calcium-dependent facilitation to synaptic plasticity revealed by migraine mutations in the P/Q-type calcium channel." *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(43): 18694-18699.
- Alonso I, Barros J, Tuna A, Coelho J, Sequeiros J, Silveira I, 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(4): 610-614.
- Antonarakis SE, Krawczak M i Cooper DN** (2000). "Disease-causing mutations in the human genome." *Eur J Pediatr* 159 Suppl 3: S173-178.
- Anttila V, Kallela M, Oswell G, Kaunisto MA, Nyholt DR, Hamalainen E, et al.** (2006). "Trait components provide tools to dissect the genetic susceptibility of migraine." *Am J Hum Genet* 79(1): 85-99.
- Anttila V, Nyholt DR, Kallela M, Artto V, Vepsalainen S, Jakkula E, et al.** (2008). "Consistently replicating locus linked to migraine on 10q22-q23." *Am J Hum Genet* 82(5): 1051-1063.
- Anttila V, Stefansson H, Kallela M, Todt U, Terwindt GM, Calafato MS, et al.** (2010). "Genome-wide association study of migraine implicates a common susceptibility variant on 8q22.1." *Nat Genet* 42(10): 869-873.
- Asuni C, Stochino ME, Cherchi A, Manchia M, Congiu D, Manconi F, et al.** (2009). "Migraine and tumour necrosis factor gene polymorphism. An association study in a Sardinian sample." *J Neurol* 256(2): 194-197.
- Aurora SK i Wilkinson F** (2007). "The brain is hyperexcitable in migraine." *Cephalalgia* 27(12): 1442-1453.
- Ayata C** (2010). "Cortical spreading depression triggers migraine attack: pro." *Headache* 50(4): 725-730.
- Ayata C, Jin H, Kudo C, Dalkara T i Moskowitz MA** (2006). "Suppression of cortical spreading depression in migraine prophylaxis." *Ann Neurol* 59(4): 652-661.
- Balding DJ** (2006). "A tutorial on statistical methods for population association studies." *Nat Rev Genet* 7(10): 781-791.
- Barak T, Kwan KY, Louvi A, Demirbilek V, Saygi S, Tuysuz B, et al.** (2011). "Recessive LAMC3 mutations cause malformations of occipital cortical development." *Nat Genet* 43(6): 590-594.
- Battistini S, Stenirri S, Piatti M, Gelfi C, Righetti PG, Rocchi R, et al.** (1999). "A new CACNA1A gene mutation in acetazolamide-responsive familial hemiplegic migraine and ataxia." *Neurology* 53(1): 38-43.
- Benarroch EE** (2008). "TRP channels: functions and involvement in neurologic disease." *Neurology* 70(8): 648-652.
- Bjornsson A, Gudmundsson G, Gudfinnsson E, Hrafnisdottir M, Benedikz J, Skuladottir S, et al.** (2003). "Localization of a gene for migraine without aura to chromosome 4q21." *Am J Hum Genet* 73(5): 986-993.
- Bodmer W i Bonilla C** (2008). "Common and rare variants in multifactorial susceptibility to common diseases." *Nat Genet* 40(6): 695-701.
- Bolay H, Reuter U, Dunn AK, Huang Z, Boas DA i Moskowitz MA** (2002). "Intrinsic brain activity triggers trigeminal meningeal afferents in a migraine model." *Nat Med* 8(2): 136-142.



- Bowyer SM, Aurora KS, Moran JE, Tepley N i Welch KM** (2001). "Magnetoencephalographic fields from patients with spontaneous and induced migraine aura." Ann Neurol 50(5): 582-587.
- Buzzi MG, Di Gennaro G, D'Onofrio M, Ciccarelli O, Santorelli FM, Fortini D, et al.** (2000). "mtDNA A3243G MELAS mutation is not associated with multigenerational female migraine." Neurology 54(4): 1005-1007.
- Cader ZM, Noble-Topham S, Dymont DA, Cherny SS, Brown JD, Rice GP, et al.** (2003). "Significant linkage to migraine with aura on chromosome 11q24." Hum Mol Genet 12(19): 2511-2517.
- Caliskan M, Chong JX, Uricchio L, Anderson R, Chen P, Sougnéz C, et al.** (2011). "Exome sequencing reveals a novel mutation for autosomal recessive non-syndromic mental retardation in the TECR gene on chromosome 19p13." Hum Mol Genet 20(7): 1285-1289.
- Castro MJ, Stam AH, Lemos C, de Vries B, Vanmolkot KR, Barros J, et al.** (2009). "First mutation in the voltage-gated Nav1.1 subunit gene SCN1A with co-occurring familial hemiplegic migraine and epilepsy." Cephalalgia 29(3): 308-313.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD i Julius D** (1997). "The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway." Nature 389(6653): 816-824.
- Catterall WA, Dib-Hajj S, Meisler MH i Pietrobon D** (2008). "Inherited neuronal ion channelopathies: new windows on complex neurological diseases." J Neurosci 28(46): 11768-11777.
- Cestele S, Scalmani P, Rusconi R, Terragni B, Franceschetti S i Mantegazza M** (2008). "Self-limited hyperexcitability: functional effect of a familial hemiplegic migraine mutation of the Nav1.1 (SCN1A) Na<sup>+</sup> channel." J Neurosci 28(29): 7273-7283.
- Chan YC, Burgunder JM, Wilder-Smith E, Chew SE, Lam-Mok-Sing KM, Sharma V, et al.** (2008). "Electroencephalographic changes and seizures in familial hemiplegic migraine patients with the CACNA1A gene S218L mutation." J Clin Neurosci 15(8): 891-894.
- Chanock SJ, Manolio T, Boehnke M, Boerwinkle E, Hunter DJ, Thomas G, et al.** (2007). "Replicating genotype-phenotype associations." Nature 447(7145): 655-660.
- Cheng W, Sun C i Zheng J** (2010). "Heteromerization of TRP channel subunits: extending functional diversity." Protein Cell 1(9): 802-810.
- Cheng W, Yang F, Takanishi CL i Zheng J** (2007). "Thermosensitive TRPV channel subunits coassemble into heteromeric channels with intermediate conductance and gating properties." J Gen Physiol 129(3): 191-207.
- Claes LR, Deprez L, Suls A, Baets J, Smets K, Van Dyck T, et al.** (2009). "The SCN1A variant database: a novel research and diagnostic tool." Hum Mutat 30(10): E904-920.
- Cleves C, Parikh S, Rothner AD i Tepper SJ** (2009). "Link between confusional migraine, hemiplegic migraine and episodic ataxia type 2: hypothesis, family genealogy, gene typing and classification." Cephalalgia 30(6): 740-743.
- Colhoun HM, McKeigue PM i Davey Smith G** (2003). "Problems of reporting genetic associations with complex outcomes." Lancet 361(9360): 865-872.
- Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, MacMillan J i Griffiths LR** (2004). "The estrogen receptor 1 G594A polymorphism is associated with migraine susceptibility in two independent case/control groups." Neurogenetics 5(2): 129-133.
- Colson NJ, Lea RA, Quinlan S, MacMillan J i Griffiths LR** (2005). "Investigation of hormone receptor genes in migraine." Neurogenetics 6(1): 17-23.
- Cooke LJ i Becker WJ** (2010). "Migraine prevalence, treatment and impact: the canadian women and migraine study." Can J Neuro Sci 37(5): 580-587.
- Cordell HJ** (2002). "Epistasis: what it means, what it doesn't mean, and statistical methods to detect it in humans." Hum Mol Genet 11(20): 2463-2468.
- Corominas R, Ribases M, Camina M, Cuenca-Leon E, Pardo J, Boronat S, et al.** (2009). "Two-stage case-control association study of dopamine-related genes and migraine." BMC Med Genet 10: 95.
- Corominas R, Sobrido MJ, Ribases M, Cuenca-Leon E, Blanco-Arias P, Narberhaus B, et al.** (2010). "Association study of the

- serotonergic system in migraine in the Spanish population." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 153B(1): 177-184.
- Cortright DN, Krause JE i Broom DC** (2007). "TRP channels and pain." Biochim Biophys Acta 1772(8): 978-988.
- Cricchi F, Di Lorenzo C, Grieco GS, Rengo C, Cardinale A, Racaniello M, et al.** (2007). "Early-onset progressive ataxia associated with the first CACNA1A mutation identified within the I-II loop." J Neurol Sci 254(1-2): 69-71.
- Cuenca-Leon E, Corominas R, Fernandez-Castillo N, Volpini V, Del Toro M, Roig M, et al.** (2008). "Genetic analysis of 27 Spanish patients with hemiplegic migraine, basilar-type migraine and childhood periodic syndromes." Cephalalgia 28(10): 1039-1047.
- Cuenca-Leon E, Corominas R, Montfort M, Artigas J, Roig M, Bayes M, et al.** (2009). "Familial hemiplegic migraine: linkage to chromosome 14q32 in a Spanish kindred." Neurogenetics 10(3): 191-198.
- Curtain RP, Smith RL, Ovcacic M i Griffiths LR** (2006). "Minor head trauma-induced sporadic hemiplegic migraine coma." Pediatr Neurol 34(4): 329-332.
- Dalkara T, Nozari A i Moskowitz MA** (2010). "Migraine aura pathophysiology: the role of blood vessels and microembolisation." Lancet Neurol 9(3): 309-317.
- Dalkara T, Zervas NT i Moskowitz MA** (2006). "From spreading depression to the trigeminovascular system." Neurol Sci 27 Suppl 2: S86-90.
- De Fusco M, Marconi R, Silvestri L, Atorino L, Rampoldi L, Morgante L, et al.** (2003). "Haploinsufficiency of ATP1A2 encoding the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> pump alpha2 subunit associated with familial hemiplegic migraine type 2." Nat Genet 33(2): 192-196.
- de Vries B, Frants RR, Ferrari MD i van den Maagdenberg AM** (2009). "Molecular genetics of migraine." Hum Genet 126(1): 115-132.
- de Vries B, Freilinger T, Vanmolkot KR, Koenderink JB, Stam AH, Terwindt GM, et al.** (2007). "Systematic analysis of three FHM genes in 39 sporadic patients with hemiplegic migraine." Neurology 69(23): 2170-2176.
- de Vries B, Mamsa H, Stam AH, Wan J, Bakker SL, Vanmolkot KR, et al.** (2009). "Episodic ataxia associated with EAAT1 mutation C186S affecting glutamate reuptake." Arch Neurol 66(1): 97-101.
- de Vries B, Stam AH, Beker F, van den Maagdenberg AMJM, Vanmolkot KRJ, Laan LAEM, et al.** (2008). "CACNA1A mutation linking hemiplegic migraine and alternating hemiplegia of childhood." Cephalalgia 28(8): 887-891.
- De Vries DR, Van Herwaarden MA, Baron A, Smout AJ i Samsom M** (2007). "Concomitant functional dyspepsia and irritable bowel syndrome decrease health-related quality of life in gastroesophageal reflux disease." Scand J Gastroenterol 42(8): 951-956.
- Debiais S, Hommet C, Bonnaud I, Barthez MA, Rimbaut S, Riant F, et al.** (2009). "The FHM1 mutation S218L: a severe clinical phenotype? A case report and review of the literature." Cephalalgia 29(12): 1337-1339.
- Di Gennaro G, Buzzi MG, Ciccarelli O, Santorelli FM, Pierelli F, Fortini D, et al.** (2000). "Assessing the relative incidence of mitochondrial DNA A3243G in migraine without aura with maternal inheritance." Headache 40(7): 568-571.
- Dichgans M, Freilinger T, Eckstein G, Babini E, Lorenz-Depiereux B, Biskup S, et al.** (2005). "Mutation in the neuronal voltage-gated sodium channel SCN1A in familial hemiplegic migraine." Lancet 366(9483): 371-377.
- Diener HC, Barbanti P, Dahlof C, Reuter U, Habeck J i Podhorna J** (2011). "BI 44370 TA, an oral CGRP antagonist for the treatment of acute migraine attacks: Results from a phase II study." Cephalalgia 31(5): 573-584.
- Dobler T, Springauf A, Tovornik S, Weber M, Schmitt A, Sedlmeier R, et al.** (2007). "TRESK two-pore-domain K<sup>+</sup> channels constitute a significant component of background potassium currents in murine dorsal root ganglion neurones." J Physiol 585(Pt 3): 867-879.
- Dodick DW** (2009). "Migraine triggers." Headache 49(6): 958-961.
- Ducros A** (2008). "[Familial and sporadic hemiplegic migraine]." Rev Neurol (Paris) 164(3): 216-224.

- Ducros A, Denier C, Joutel A, Cecillon M, Lescoat C, Vahedi K, et al.** (2001). "The clinical spectrum of familial hemiplegic migraine associated with mutations in a neuronal calcium channel." *N Engl J Med* 345(1): 17-24.
- Ducros A, Denier C, Joutel A, Vahedi K, Michel A, Darcel F, 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(1): 89-98.
- Dudbridge F** (2003). "Pedigree disequilibrium tests for multilocus haplotypes." *Genet Epidemiol* 25(2): 115-121.
- Eikermann-Haerter K i Ayata C** (2010). "Cortical spreading depression and migraine." *Curr Neurol Neurosci Rep* 10(3): 167-173.
- Eltorp CT, Jansen-Olesen I i Hansen AJ** (2000). "Release of calcitonin gene-related peptide (CGRP) from guinea pig dura mater in vitro is inhibited by sumatriptan but unaffected by nitric oxide." *Cephalalgia* 20(9): 838-844.
- Estevez M** (2006). "Invertebrate modeling of a migraine channelopathy." *Headache* 46 Suppl 1: S25-31.
- Fernandez F, Colson N, Quinlan S, MacMillan J, Lea RA i Griffiths LR** (2009). "Association between migraine and a functional polymorphism at the dopamine beta-hydroxylase locus." *Neurogenetics* 10(3): 199-208.
- Fernandez F, Esposito T, Lea RA, Colson NJ, Ciccodicola A, Gianfrancesco F, et al.** (2008). "Investigation of gamma-aminobutyric acid (GABA) A receptors genes and migraine susceptibility." *BMC Med Genet* 9: 109.
- Ferrari MD, Farkkila M, Reuter U, Pilgrim A, Davis C, Krauss M, et al.** (2010). "Acute treatment of migraine with the selective 5-HT<sub>1F</sub> receptor agonist lasmiditan—a randomised proof-of-concept trial." *Cephalalgia* 30(10): 1170-1178.
- Freilinger T, Bohe M, Wegener B, Muller-Myhsok B, Dichgans M i 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* 28(4): 403-407.
- Friedman DI i De ver Dye T** (2009). "Migraine and the environment." *Headache* 49(6): 941-952.
- Friend KL, Crimmins D, Phan TG, Sue CM, Colley A, Fung VS, 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(3): 261-265.
- Gambardella A i Marini C** (2009). "Clinical spectrum of SCN1A mutations." *Epilepsia* 50 Suppl 5: 20-23.
- Gates KS** (2009). "An overview of chemical processes that damage cellular DNA: spontaneous hydrolysis, alkylation, and reactions with radicals." *Chem Res Toxicol* 22(11): 1747-1760.
- Gervil M, Ulrich V, Kyvik KO, Olesen J i Russell MB** (1999). "Migraine without aura: a population-based twin study." *Ann Neurol* 46(4): 606-611.
- Goadsby PJ** (2005). "Migraine pathophysiology." *Headache* 45 Suppl 1: S14-24.
- Goadsby PJ** (2007). "Recent advances in understanding migraine mechanisms, molecules and therapeutics." *Trends Mol Med* 13(1): 39-44.
- Golovina VA, Song H, James PF, Lingrel JB i Blaustein MP** (2003). "Na<sup>+</sup> pump alpha 2-subunit expression modulates Ca<sup>2+</sup> signaling." *Am J Physiol Cell Physiol* 284(2): C475-486.
- Granziera C, DaSilva AF, Snyder J, Tuch DS i Hadjikhani N** (2006). "Anatomical alterations of the visual motion processing network in migraine with and without aura." *PLoS Med* 3(10): e402.
- Greka A, Navarro B, Oancea E, Duggan A i Clapham DE** (2003). "TRPC5 is a regulator of hippocampal neurite length and growth cone morphology." *Nat Neurosci* 6(8): 837-845.
- Gunthorpe MJ, Harries MH, Prinjha RK, Davis JB i Randall A** (2000). "Voltage- and time-dependent properties of the recombinant rat vanilloid receptor (rVR1)." *J Physiol* 525 Pt 3: 747-759.
- Haan J, Terwindt GM, van den Maagdenberg AM, Stam AH i Ferrari MD** (2008). "A review of the genetic relation between migraine and epilepsy." *Cephalalgia* 28(2): 105-113.

- Hadjikhani N, Sanchez Del Rio M, Wu O, Schwartz D, Bakker D, Fischl B, et al.** (2001). "Mechanisms of migraine aura revealed by functional MRI in human visual cortex." Proc Natl Acad Sci U S A 98(8): 4687-4692.
- Hagen K, Pettersen E, Stovner LJ, Skorpen F i Zwart JA** (2006). "The association between headache and Val158Met polymorphism in the catechol-O-methyltransferase gene: the HUNT Study." J Headache Pain 7(2): 70-74.
- Haut SR, Bigal ME i Lipton RB** (2006). "Chronic disorders with episodic manifestations: focus on epilepsy and migraine." Lancet Neurol 5(2): 148-157.
- Ikeda K, Onaka T, Yamakado M, Nakai J, Ishikawa TO, Taketo MM, et al.** (2003). "Degeneration of the amygdala/piriform cortex and enhanced fear/anxiety behaviors in sodium pump alpha2 subunit (Atp1a2)-deficient mice." J Neurosci 23(11): 4667-4676.
- International Headache Society (IHS) HCC** (1988). "Classification and diagnostic criteria for headache disorders, cranial neuralgias and facial pain." Cephalalgia 8: 1-96.
- International Headache Society (IHS) HCS** (2004). "The International Classification of Headache Disorders: 2nd edition." Cephalalgia 24 Suppl 1: 9-160.
- Jen JC, Klein A, Boltshauser E, Cartwright MS, Roach ES, Mamsa H, et al.** (2007). "Prolonged hemiplegic episodes in children due to mutations in ATP1A2." J Neurol Neurosurg Psychiatry 78(5): 523-526.
- Jen JC, Wan J, Palos TP, Howard BD i Baloh RW** (2005). "Mutation in the glutamate transporter EAAT1 causes episodic ataxia, hemiplegia, and seizures." Neurology 65(4): 529-534.
- Jensen R i Stovner LJ** (2008). "Epidemiology and comorbidity of headache." Lancet Neurol 7(4): 354-361.
- Jia S, Ni J, Chen S, Jiang Y, Dong W i Gao Y** (2011). "Association of the pentanucleotide repeat polymorphism in NOS2 promoter region with susceptibility to migraine in a Chinese population." DNA Cell Biol 30(2): 117-122.
- Jodice C, Mantuano E, Veneziano L, Trettel F, Sabbadini G, Calandriello L, et al.** (1997). "Episodic ataxia type 2 (EA2) and spinocerebellar ataxia type 6 (SCA6) due to CAG repeat expansion in the CACNA1A gene on chromosome 19p." Hum Mol Genet 6(11): 1973-1978.
- Johnson MP, Lea RA, Curtain RP, MacMillan JC i Griffiths LR** (2003). "An investigation of the 5-HT2C receptor gene as a migraine candidate gene." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 117B(1): 86-89.
- Jones KW, Ehm MG, Pericak-Vance MA, Haines JL, Boyd PR i Peroutka SJ** (2001). "Migraine with aura susceptibility locus on chromosome 19p13 is distinct from the familial hemiplegic migraine locus." Genomics 78(3): 150-154.
- Jorgensen PL, Hakansson KO i Karlsh SJ** (2003). "Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions." Annu Rev Physiol 65: 817-849.
- Jung A, Huge A, Kühlenbaumer G, Kempt S, Seehafer T, Evers S, et al.** (2010). "Genetic TPH2 variants and the susceptibility for migraine: association of a TPH2 haplotype with migraine without aura." J Neural Transm 117(11): 1253-1260.
- Kahlig KM, Rhodes TH, Pusch M, Freilinger T, Pereira-Monteiro JM, Ferrari MD, et al.** (2008). "Divergent sodium channel defects in familial hemiplegic migraine." Proc Natl Acad Sci U S A 105(28): 9799-9804.
- Kaube H, Herzog J, Kaufer T, Dichgans M i Diener HC** (2000). "Aura in some patients with familial hemiplegic migraine can be stopped by intranasal ketamine." Neurology 55(1): 139-141.
- Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, Kilpikari R, Havanka H, Harno H, et al.** (2006). "Testing of variants of the MTHFR and ESR1 genes in 1798 Finnish individuals fails to confirm the association with migraine with aura." Cephalalgia 26(12): 1462-1472.
- Kelman L** (2007). "The triggers or precipitants of the acute migraine attack." Cephalalgia 27(5): 394-402.
- Kim SJ, Kim YS, Yuan JP, Petralia RS, Worley PF i Linden DJ** (2003). "Activation of the TRPC1 cation channel by metabotropic glutamate receptor mGluR1." Nature 426(6964): 285-291.
- Klein CJ, Botuyan MV, Wu Y, Ward CJ, Nicholson GA, Hammans S, et al.** (2011). "Mutations in DNMT1 cause hereditary sensory

- neuropathy with dementia and hearing loss." Nat Genet 43(6): 595-600.
- Kors EE, Haan J, Giffin NJ, Pazdera L, Schnittger C, Lennox GG, 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(5): 684-688.
- Kors EE, Melberg A, Vanmolkot KR, Kumlien E, Haan J, Raininko R, et al.** (2004). "Childhood epilepsy, familial hemiplegic migraine, cerebellar ataxia, and a new CACNA1A mutation." Neurology 63(6): 1136-1137.
- Kors EE, Terwindt GM, Vermeulen FL, Fitzsimons RB, Jardine PE, Heywood P, 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(6): 753-760.
- Krapivinsky G, Mochida S, Krapivinsky L, Cibulsky SM i Clapham DE** (2006). "The TRPM7 ion channel functions in cholinergic synaptic vesicles and affects transmitter release." Neuron 52(3): 485-496.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Glossmann H, Hering S i Striessnig J** (1998). "Familial hemiplegic migraine mutations change alpha1A Ca<sup>2+</sup> channel kinetics." J Biol Chem 273(10): 5586-5590.
- Kraus RL, Sinnegger MJ, Koschak A, Glossmann H, Stenirri S, Carrera P, et al.** (2000). "Three new familial hemiplegic migraine mutants affect P/Q-type Ca<sup>2+</sup> channel kinetics." J Biol Chem 275(13): 9239-9243.
- Labrum RW, Rajakulendran S, Graves TD, Eunson LH, Bevan R, Sweeney MG, et al.** (2009). "Large scale calcium channel gene rearrangements in episodic ataxia and hemiplegic migraine: implications for diagnostic testing." J Med Genet 46(11): 786-791.
- Lafreniere RG, Cader MZ, Poulin JF, Andres-Enguix I, Simoneau M, Gupta N, et al.** (2010). "A dominant-negative mutation in the TRESK potassium channel is linked to familial migraine with aura." Nat Med 16(10): 1157-1160.
- Lambert GA, Davis JB, Appleby JM, Chizh BA, Hoskin KL i Zagami AS** (2009). "The effects of the TRPV1 receptor antagonist SB-705498 on trigeminovascular sensitisation and neurotransmission." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 380(4): 311-325.
- Lane R i Davies P** (2006). "Migraine." Taylor and Francis: New York: pp 259-278.
- Lashley KS** (1941). "Patterns of cerebral integration indicated by the scotomas of migraine." Arch Neurol Psychiatry 46: 331-339.
- Lassen LH, Ashina M, Christiansen I, Ulrich V, Grover R, Donaldson J, et al.** (1998). "Nitric oxide synthase inhibition: a new principle in the treatment of migraine attacks." Cephalalgia 18(1): 27-32.
- Lauritzen M** (1994). "Pathophysiology of the migraine aura. The spreading depression theory." Brain 117 (Pt 1): 199-210.
- Lauritzen M** (2001). "Cortical spreading depression in migraine." Cephalalgia 21(7): 757-760.
- Lauritzen M, Dreier JP, Fabricius M, Hartings JA, Graf R i Strong AJ** (2011). "Clinical relevance of cortical spreading depression in neurological disorders: migraine, malignant stroke, subarachnoid and intracranial hemorrhage, and traumatic brain injury." J Cereb Blood Flow Metab 31(1): 17-35.
- Lea RA, Nyholt DR, Curtain RP, Ovcacic M, Sciascia R, Bellis C, et al.** (2005). "A genome-wide scan provides evidence for loci influencing a severe heritable form of common migraine." Neurogenetics 6(2): 67-72.
- Lea RA, Ovcacic M, Sundholm J, MacMillan J i Griffiths LR** (2004). "The methylenetetrahydrofolate reductase gene variant C677T influences susceptibility to migraine with aura." BMC Med 2: 3.
- Lea RA, Shepherd AG, Curtain RP, Nyholt DR, Quinlan S, Brimage PJ, et al.** (2002). "A typical migraine susceptibility region localizes to chromosome 1q31." Neurogenetics 4(1): 17-22.
- Leao A** (1944). "Spreading depression of activity in the cerebral cor." J Neurophysiol 7: 359-390.
- Lee H, Slinger L, Jen JC, Cha YH, Baloh RW i Nelson SF** (2007). "Association of progesterone receptor with migraine-associated vertigo." Neurogenetics 8(3): 195-200.
- Li HS, Xu XZ i Montell C** (1999). "Activation of a TRPC3-dependent cation current through

- the neurotrophin BDNF." Neuron 24(1): 261-273.
- Ligthart L, Boomsma DI, Martin NG, Stubbe JH i Nyholt DR** (2006). "Migraine with aura and migraine without aura are not distinct entities: further evidence from a large Dutch population study." Twin Res Hum Genet 9(1): 54-63.
- Ligthart L, de Vries B, Smith AV, Ikram MA, Amin N, Hottenga JJ, et al.** (2011). "Meta-analysis of genome-wide association for migraine in six population-based European cohorts." Eur J Hum Genet.
- Lin PI, Vance JM, Pericak-Vance MA i Martin ER** (2007). "No gene is an island: the flip-flop phenomenon." Am J Hum Genet 80(3): 531-538.
- Lipton RB, Bigal ME, Ashina S, Burstein R, Silberstein S, Reed ML, et al.** (2008). "Cutaneous allodynia in the migraine population." Ann Neurol 63(2): 148-158.
- Liu H, Liu M, Wang Y, Wang XM, Qiu Y, Long JF, et al.** (2011). "Association of 5-HTT gene polymorphisms with migraine: A systematic review and meta-analysis." J Neurol Sci 305(1-2): 57-66.
- Lutsenko E i 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(1): 11-20.
- Maher BH i Griffiths LR** (2011). "Identification of molecular genetic factors that influence migraine." Mol Genet Genomics.
- Maki H** (2002). "Origins of spontaneous mutations: specificity and directionality of base-substitution, frameshift, and sequence-substitution mutageneses." Annu Rev Genet 36: 279-303.
- Mantuano E, Romano S, Veneziano L, Gellera C, Castellotti B, Caimi S, et al.** (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.
- McCallum LK, Fernandez F, Quinlan S, Macartney DP, Lea RA i Griffiths LR** (2007). "Association study of a functional variant in intron 8 of the dopamine transporter gene and migraine susceptibility." Eur J Neurol 14(6): 706-707.
- McCarthy LC, Hosford DA, Riley JH, Bird MI, White NJ, Hewett DR, et al.** (2001). "Single-nucleotide polymorphism alleles in the insulin receptor gene are associated with typical migraine." Genomics 78(3): 135-149.
- Meents JE, Neeb L i Reuter U** (2010). "TRPV1 in migraine pathophysiology." Trends Mol Med 16(4): 153-159.
- Mefford HC i Eichler EE** (2009). "Duplication hotspots, rare genomic disorders, and common disease." Curr Opin Genet Dev 19(3): 196-204.
- Melliti K, Grabner M i Seabrook GR** (2003). "The familial hemiplegic migraine mutation R192Q reduces G-protein-mediated inhibition of P/Q-type (Ca(V)2.1) calcium channels expressed in human embryonic kidney cells." J Physiol 546(Pt 2): 337-347.
- Miller MB, Schwander K i Rao DC** (2008). "Genotyping errors and their impact on genetic analysis." Adv Genet 60: 141-152.
- Montagna P** (2008). "The primary headaches: genetics, epigenetics and a behavioural genetic model." J Headache Pain 9(2): 57-69.
- Montfort M, Chabas A, Vilageliu L i Grinberg D** (2004). "Functional analysis of 13 GBA mutant alleles identified in Gaucher disease patients: Pathogenic changes and "modifier" polymorphisms." Hum Mutat 23(6): 567-575.
- Moqrich A, Hwang SW, Earley TJ, Petrus MJ, Murray AN, Spencer KS, et al.** (2005). "Impaired thermosensation in mice lacking TRPV3, a heat and camphor sensor in the skin." Science 307(5714): 1468-1472.
- Moskowitz MA** (2007). "Pathophysiology of headache--past and present." Headache 47 Suppl 1: S58-63.
- Moskowitz MA** (2008). "Molecular mechanism of migraine." Rinsho Shinkeigaku 48(11): 798.
- Moskowitz MA, Bolay H i Dalkara T** (2004). "Deciphering migraine mechanisms: clues from familial hemiplegic migraine genotypes." Ann Neurol 55(2): 276-280.
- Mulder EJ, Van Baal C, Gaist D, Kallela M, Kaprio J, Svensson DA, et al.** (2003). "Genetic and environmental influences on migraine: a twin study across six countries." Twin Res 6(5): 422-431.

- Mullner C, Broos LA, van den Maagdenberg AM i Striessnig J** (2004). "Familial hemiplegic migraine type 1 mutations K1336E, W1684R, and V1696I alter Cav2.1 Ca<sup>2+</sup> channel gating: evidence for beta-subunit isoform-specific effects." J Biol Chem 279(50): 51844-51850.
- Munsch T, Freichel M, Flockerzi V i Pape HC** (2003). "Contribution of transient receptor potential channels to the control of GABA release from dendrites." Proc Natl Acad Sci U S A 100(26): 16065-16070.
- Narbone MC, Gangemi S i Abbate M** (2008). "Migraine and stroke: from a questioned relationship to a supported comorbidity." Neurol Sci 29 Suppl 1: S7-11.
- Nelson DL, Phebus LA, Johnson KW, Wainscott DB, Cohen ML, Calligaro DO, et al.** (2010). "Preclinical pharmacological profile of the selective 5-HT<sub>1F</sub> receptor agonist lasmiditan." Cephalalgia 30(10): 1159-1169.
- Nelson PL, Beck A i Cheng H** (2011). "Transient receptor proteins illuminated: current views on TRPs and disease." Vet J 187(2): 153-164.
- Netzer C, Freudenberg J, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Goebel I, McCarthy LC, et al.** (2008). "Replication study of the insulin receptor gene in migraine with aura." Genomics 91(6): 503-507.
- Netzer C, Freudenberg J, Toliat MR, Heinze A, Heinze-Kuhn K, Thiele H, et al.** (2008). "Genetic association studies of the chromosome 15 GABA-A receptor cluster in migraine with aura." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B(1): 37-41.
- Ni JQ, Jia SS, Liu M, Chen SG, Jiang YT, Dong WL, et al.** (2010). "Lack of association between ADRA2B-4825 gene insertion/deletion polymorphism and migraine in Chinese Han population." Neurosci Bull 26(4): 322-326.
- Nicoletti P, Trevisani M, Manconi M, Gatti R, De Siena G, Zagli G, et al.** (2008). "Ethanol causes neurogenic vasodilation by TRPV1 activation and CGRP release in the trigeminovascular system of the guinea pig." Cephalalgia 28(1): 9-17.
- Nilius B i Owsianik G** (2010). "Transient receptor potential channelopathies." Pflugers Arch 460(2): 437-450.
- Nyholt DR, Curtain RP i Griffiths LR** (2000). "Familial typical migraine: significant linkage and localization of a gene to Xq24-28." Hum Genet 107(1): 18-23.
- Nyholt DR, Dawkins JL, Brimage PJ, Goadsby PJ, Nicholson GA i Griffiths LR** (1998). "Evidence for an X-linked genetic component in familial typical migraine." Hum Mol Genet 7(3): 459-463.
- Nyholt DR, Gillespie NG, Heath AC, Merikangas KR, Duffy DL i Martin NG** (2004). "Latent class and genetic analysis does not support migraine with aura and migraine without aura as separate entities." Genet Epidemiol 26(3): 231-244.
- Nyholt DR, LaForge KS, Kallela M, Alakurtti K, Anttila V, Farkkila M, et al.** (2008). "A high-density association screen of 155 ion transport genes for involvement with common migraine." Hum Mol Genet 17(21): 3318-3331.
- Nyholt DR, Lea RA, Goadsby PJ, Brimage PJ i Griffiths LR** (1998). "Familial typical migraine: linkage to chromosome 19p13 and evidence for genetic heterogeneity." Neurology 50(5): 1428-1432.
- Nyholt DR, Morley KI, Ferreira MA, Medland SE, Boomsma DI, Heath AC, et al.** (2005). "Genomewide significant linkage to migrainous headache on chromosome 5q21." Am J Hum Genet 77(3): 500-512.
- O'Roak BJ, Deriziotis P, Lee C, Vives L, Schwartz JJ, Girirajan S, et al.** (2011). "Exome sequencing in sporadic autism spectrum disorders identifies severe de novo mutations." Nat Genet 43(6): 585-589.
- Oedegaard KJ, Greenwood TA, Johansson S, Jacobsen KK, Halmoy A, Fasmer OB, et al.** (2010). "A genome-wide association study of bipolar disorder and comorbid migraine." Genes Brain Behav 9(7): 673-680.
- Ogiwara I, Miyamoto H, Morita N, Atapour N, Mazaki E, Inoue I, et al.** (2007). "Na(v)1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation." J Neurosci 27(22): 5903-5914.
- Olesen J** (2008). "The International Classification of Headache Disorders." Headache 48(5): 691-693.

- Olesen J** (2010). "Nitric oxide-related drug targets in headache." Neurotherapeutics 7(2): 183-190.
- Olesen J** (2011). "New plans for headache classification: ICHD-3." Cephalalgia 31(1): 4-5.
- Olesen J, Tfelt-Hansen P i Ashina M** (2009). "Finding new drug targets for the treatment of migraine attacks." Cephalalgia 29(9): 909-920.
- Ophoff RA, Terwindt GM, Vergouwe MN, van Eijk R, Oefner PJ, Hoffman SM, et al.** (1996). "Familial hemiplegic migraine and episodic ataxia type-2 are caused by mutations in the Ca<sup>2+</sup> channel gene CACNL1A4." Cell 87(3): 543-552.
- Oswell G, Kaunisto MA, Kallela M, Hamalainen E, Anttila V, Kaprio J, et al.** (2008). "No association of migraine to the GABA-A receptor complex on chromosome 15." Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet 147B(1): 33-36.
- Oterino A, Castillo J, Pascual J, Cayon A, Alonso A, Ruiz-Alegria C, et al.** (2007). "Genetic association study and meta-analysis of the HTR2C Cys23Ser polymorphism and migraine." J Headache Pain 8(4): 231-235.
- Oterino A, Toriello M, Cayon A, Castillo J, Colas R, Alonson-Arranz A, et al.** (2008). "Multilocus analyses reveal involvement of the ESR1, ESR2, and FSHR genes in migraine." Headache 48(10): 1438-1450.
- Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, et al.** (2002). "A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes." Science 296(5575): 2046-2049.
- Peltonen L, Palotie A i Lange K** (2000). "Use of population isolates for mapping complex traits." Nat Rev Genet 1(3): 182-190.
- Pietrobon D** (2005). "Migraine: new molecular mechanisms." Neuroscientist 11(4): 373-386.
- Pietrobon D** (2007). "Familial hemiplegic migraine." Neurotherapeutics 4(2): 274-284.
- Pietrobon D** (2010). "CaV2.1 channelopathies." Pflugers Arch 460(2): 375-393.
- Pietrobon D** (2010). "Insights into migraine mechanisms and CaV2.1 calcium channel function from mouse models of familial hemiplegic migraine." J Physiol 588(Pt 11): 1871-1878.
- Pietrobon D i Striessnig J** (2003). "Neurobiology of migraine." Nat Rev Neurosci 4(5): 386-398.
- Price EM, Rice DA i Lingrel JB** (1990). "Structure-function studies of Na,K-ATPase. Site-directed mutagenesis of the border residues from the H1-H2 extracellular domain of the alpha subunit." J Biol Chem 265(12): 6638-6641.
- Radat F i Swendsen J** (2005). "Psychiatric comorbidity in migraine: a review." Cephalalgia 25(3): 165-178.
- Rainero I, Grimaldi LM, Salani G, Valfre W, Rivoiro C, Savi L, et al.** (2004). "Association between the tumor necrosis factor-alpha -308 G/A gene polymorphism and migraine." Neurology 62(1): 141-143.
- Ramsey IS, Delling M i Clapham DE** (2006). "An introduction to TRP channels." Annu Rev Physiol 68: 619-647.
- Rapoport AM** (2008). "Acute and prophylactic treatments for migraine: present and future." Neurol Sci 29 Suppl 1: S110-122.
- Riant F, De Fusco M, Aridon P, Ducros A, Ploton C, Marchelli F, et al.** (2005). "ATP1A2 mutations in 11 families with familial hemiplegic migraine." Hum Mutat 26(3): 281.
- Riant F, Ducros A, Ploton C, Barbance C, Depienne C i Tournier-Lasserre E** (2010). "De novo mutations in ATP1A2 and CACNA1A are frequent in early-onset sporadic hemiplegic migraine." Neurology 75(11): 967-972.
- Richards A, van den Maagdenberg AM, Jen JC, Kavanagh D, Bertram P, Spitzer D, et al.** (2007). "C-terminal truncations in human 3'-5' DNA exonuclease TREX1 cause autosomal dominant retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy." Nat Genet 39(9): 1068-1070.
- Rozen TD, Shanske S, Otaegui D, Lu J, Young WB, Bradley K, et al.** (2004). "Study of mitochondrial DNA mutations in patients with migraine with prolonged aura." Headache 44(7): 674-677.
- Rubino E, Ferrero M, Rainero I, Binello E, Vaula G i Pinessi L** (2009). "Association of the C677T polymorphism in the MTHFR gene with



- migraine: a meta-analysis." Cephalalgia 29(8): 818-825.
- Russell MB** (2005). "Tension-type headache in 40-year-olds: a Danish population-based sample of 4000." J Headache Pain 6(6): 441-447.
- Russell MB** (2008). "Is migraine a genetic illness? The various forms of migraine share a common genetic cause." Neurol Sci 29 Suppl 1: S52-54.
- Russell MB i Ducros A** (2011). "Sporadic and familial hemiplegic migraine: pathophysiological mechanisms, clinical characteristics, diagnosis, and management." Lancet Neurol 10(5): 457-470.
- Russell MB, Iselius L i Olesen J** (1995). "Inheritance of migraine investigated by complex segregation analysis." Hum Genet 96(6): 726-730.
- Russell MB i Olesen J** (1995). "Increased familial risk and evidence of genetic factor in migraine." BMJ 311(7004): 541-544.
- Russell MB i Olesen J** (1996). "A nosographic analysis of the migraine aura in a general population." Brain 119 ( Pt 2): 355-361.
- Russell MB, Rasmussen BK, Thorvaldsen P i Olesen J** (1995). "Prevalence and sex-ratio of the subtypes of migraine." Int J Epidemiol 24(3): 612-618.
- Russo L, Mariotti P, Sangiorgi E, Giordano T, Ricci I, Lupi F, et al.** (2005). "A new susceptibility locus for migraine with aura in the 15q11-q13 genomic region containing three GABA-A receptor genes." Am J Hum Genet 76(2): 327-333.
- Scher AI, Terwindt GM, Verschuren WM, Kruit MC, Blom HJ, Kowa H, et al.** (2006). "Migraine and MTHFR C677T genotype in a population-based sample." Ann Neurol 59(2): 372-375.
- Schurks M** (2008). "Epigenetics in primary headaches: a new avenue for research." J Headache Pain 9(3): 191-192.
- Schurks M, Rist PM i Kurth T** (2010). "Sex hormone receptor gene polymorphisms and migraine: a systematic review and meta-analysis." Cephalalgia 30(11): 1306-1328.
- Schurks M, Rist PM i Kurth T** (2010). "STIN2 VNTR polymorphism in the serotonin transporter gene and migraine: pooled and meta-analyses." J Headache Pain 11(4): 317-326.
- Schurks M, Zee RY, Buring JE i Kurth T** (2008). "Interrelationships among the MTHFR 677C>T polymorphism, migraine, and cardiovascular disease." Neurology 71(7): 505-513.
- Schurks M, Zee RY, Buring JE i Kurth T** (2009). "ACE D/I polymorphism, migraine, and cardiovascular disease in women." Neurology 72(7): 650-656.
- Schurks M, Zee RY, Buring JE i Kurth T** (2009). "Polymorphisms in the renin-angiotensin system and migraine in women." Headache 49(2): 292-299.
- Schwedt TJ, Krauss MJ, Frey K i Gereau RWt** (2011). "Episodic and chronic migraineurs are hypersensitive to thermal stimuli between migraine attacks." Cephalalgia 31(1): 6-12.
- Schytz HW, Schoonman GG i Ashina M** (2010). "What have we learnt from triggering migraine?" Curr Opin Neurol 23(3): 259-265.
- Serra SA, Fernandez-Castillo N, Macaya A, Cormand B, Valverde MA i Fernandez-Fernandez JM** (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(3): 489-502.
- Shainskaya A, Schneeberger A, Apell HJ i Karlisch SJ** (2000). "Entrance port for Na(+) and K(+) ions on Na(+),K(+)-ATPase in the cytoplasmic loop between transmembrane segments M6 and M7 of the alpha subunit. Proximity Of the cytoplasmic segment of the beta subunit." J Biol Chem 275(3): 2019-2028.
- Smith GD, Gunthorpe MJ, Kessel RE, Hayes PD, Reilly P, Facer P, et al.** (2002). "TRPV3 is a temperature-sensitive vanilloid receptor-like protein." Nature 418(6894): 186-190.
- Soragna D, Vettori A, Carraro G, Marchioni E, Vazza G, Bellini S, et al.** (2003). "A locus for migraine without aura maps on chromosome 14q21.2-q22.3." Am J Hum Genet 72(1): 161-167.
- Stam AH, Louter MA, Haan J, de Vries B, van den Maagdenberg AM, Frants RR, et al.** (2011). "A long-term follow-up study of 18

- patients with sporadic hemiplegic migraine." Cephalalgia 31(2): 199-205.
- Stam AH, Luijckx GJ, Poll-The BT, Ginjaar IB, Frants RR, Haan J, et al.** (2009). "Early seizures and cerebral oedema after trivial head trauma associated with the CACNA1A S218L mutation." J Neurol Neurosurg Psychiatry 80(10): 1125-1129.
- Stam AH, van den Maagdenberg AM, Haan J, Terwindt GM i Ferrari MD** (2008). "Genetics of migraine: an update with special attention to genetic comorbidity." Curr Opin Neurol 21(3): 288-293.
- Stankewitz A i May A** (2009). "The phenomenon of changes in cortical excitability in migraine is not migraine-specific--a unifying thesis." Pain 145(1-2): 14-17.
- Stephens M, Smith NJ i Donnelly P** (2001). "A new statistical method for haplotype reconstruction from population data." Am J Hum Genet 68(4): 978-989.
- Stovner LJ i Andree C** (2010). "Prevalence of headache in Europe: a review for the Eurolight project." J Headache Pain 11(4): 289-299.
- Suzuki M, Van Paesschen W, Stalmans I, Horita S, Yamada H, Bergmans BA, et al.** (2010). "Defective membrane expression of the Na(+)-HCO(3)(-) cotransporter NBCe1 is associated with familial migraine." Proc Natl Acad Sci U S A 107(36): 15963-15968.
- Svensson DA, Larsson B, Waldenlind E i Pedersen NL** (2003). "Shared rearing environment in migraine: results from twins reared apart and twins reared together." Headache 43(3): 235-244.
- Tavraz NN, Friedrich T, Durr KL, Koenderink JB, Bamberg E, Freilinger T, 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(45): 31097-31106.
- Terwindt G, Kors E, Haan J, Vermeulen F, Van den Maagdenberg A, Frants R, et al.** (2002). "Mutation analysis of the CACNA1A calcium channel subunit gene in 27 patients with sporadic hemiplegic migraine." Arch Neurol 59(6): 1016-1018.
- Thomsen LL, Eriksen MK, Roemer SF, Andersen I, Olesen J i Russell MB** (2002). "A population-based study of familial hemiplegic migraine suggests revised diagnostic criteria." Brain 125(Pt 6): 1379-1391.
- Thomsen LL, Kirchmann M, Bjornsson A, Stefansson H, Jensen RM, Fasquel AC, et al.** (2007). "The genetic spectrum of a population-based sample of familial hemiplegic migraine." Brain 130(Pt 2): 346-356.
- Thomsen LL, Oestergaard E, Bjornsson A, Stefansson H, Fasquel AC, Gulcher J, et al.** (2008). "Screen for CACNA1A and ATP1A2 mutations in sporadic hemiplegic migraine patients." Cephalalgia 28(9): 914-921.
- Tikka-Kleemola P, Artto V, Vepsalainen S, Sobel EM, Raty S, Kaunisto MA, et al.** (2010). "A visual migraine aura locus maps to 9q21-q22." Neurology 74(15): 1171-1177.
- Tikka-Kleemola P, Kaunisto MA, Hamalainen E, Todt U, Gobel H, Kaprio J, et al.** (2009). "Genetic association study of endothelin-1 and its receptors EDNRA and EDNRB in migraine with aura." Cephalalgia 29(11): 1224-1231.
- Todt U, Netzer C, Toliat M, Heinze A, Goebel I, Nurnberg P, et al.** (2009). "New genetic evidence for involvement of the dopamine system in migraine with aura." Hum Genet 125(3): 265-279.
- Toriello M, Oterino A, Pascual J, Castillo J, Colas R, Alonso-Arranz A, et al.** (2008). "Lack of association of endothelial nitric oxide synthase polymorphisms and migraine." Headache 48(7): 1115-1119.
- Toru S, Murakoshi T, Ishikawa K, Saegusa H, Fujigasaki H, Uchihara T, et al.** (2000). "Spinocerebellar ataxia type 6 mutation alters P-type calcium channel function." J Biol Chem 275(15): 10893-10898.
- Tottene A, Fellin T, Pagnutti S, Luvisetto S, Striessnig J, Fletcher C, et al.** (2002). "Familial hemiplegic migraine mutations increase Ca(2+) influx through single human CaV2.1 channels and decrease maximal CaV2.1 current density in neurons." Proc Natl Acad Sci U S A 99(20): 13284-13289.
- Tottene A, Pivotto F, Fellin T, Cesetti T, van den Maagdenberg AM i 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." J Biol Chem 280(18): 17678-17686.

- Trevisani M, Smart D, Gunthorpe MJ, Tognetto M, Barbieri M, Campi B, et al.** (2002). "Ethanol elicits and potentiates nociceptor responses via the vanilloid receptor-1." Nat Neurosci 5(6): 546-551.
- Tronvik E, Stovner LJ, Bovim G, White LR, Gladwin AJ, Owen K, et al.** (2008). "Angiotensin-converting enzyme gene insertion/deletion polymorphism in migraine patients." BMC Neurol 8: 4.
- Ulrich V, Gervil M, Kyvik KO, Olesen J i Russell MB** (1999). "Evidence of a genetic factor in migraine with aura: a population-based Danish twin study." Ann Neurol 45(2): 242-246.
- Vahedi K, Denier C, Ducros A, Bousson V, Levy C, Chabriat H, et al.** (2000). "CACNA1A gene de novo mutation causing hemiplegic migraine, coma, and cerebellar atrophy." Neurology 55(7): 1040-1042.
- Vahedi K, Depienne C, Le Fort D, Riant F, Chaine P, Trouillard O, et al.** (2009). "Elicited repetitive daily blindness: a new phenotype associated with hemiplegic migraine and SCN1A mutations." Neurology 72(13): 1178-1183.
- van den Maagdenberg AM, Haan J, Terwindt GM i Ferrari MD** (2007). "Migraine: gene mutations and functional consequences." Curr Opin Neurol 20(3): 299-305.
- van der Sluis S, Verhage M, Posthuma D i Dolan CV** (2010). "Phenotypic complexity, measurement bias, and poor phenotypic resolution contribute to the missing heritability problem in genetic association studies." PLoS One 5(11): e13929.
- Veneziano L, Guida S, Mantuano E, Bernard P, Tarantino P, Boccone L, et al.** (2009). "Newly characterised 5' and 3' regions of CACNA1A gene harbour mutations associated with Familial Hemiplegic Migraine and Episodic Ataxia." J Neurol Sci 276(1-2): 31-37.
- Villalon CM, Centurion D, Valdivia LF, De Vries P i Saxena PR** (2002). "An introduction to migraine: from ancient treatment to functional pharmacology and antimigraine therapy." Proc West Pharmacol Soc 45: 199-210.
- Villalon CM i Olesen J** (2009). "The role of CGRP in the pathophysiology of migraine and efficacy of CGRP receptor antagonists as acute antimigraine drugs." Pharmacol Ther 124(3): 309-323.
- Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, et al.** (2010). "A de novo paradigm for mental retardation." Nat Genet 42(12): 1109-1112.
- Vogt-Eisele AK, Weber K, Sherkheli MA, Vielhaber G, Panten J, Gisselmann G, et al.** (2007). "Monoterpenoid agonists of TRPV3." Br J Pharmacol 151(4): 530-540.
- Wada T, Kobayashi N, Takahashi Y, Aoki T, Watanabe T i Saitoh S** (2002). "Wide clinical variability in a family with a CACNA1A T666m mutation: hemiplegic migraine, coma, and progressive ataxia." Pediatr Neurol 26(1): 47-50.
- Walder RY, Landau D, Meyer P, Shalev H, Tsolia M, Borochowitz Z, et al.** (2002). "Mutation of TRPM6 causes familial hypomagnesemia with secondary hypocalcemia." Nat Genet 31(2): 171-174.
- Weiss N, Sandoval A, Felix R, Van den Maagdenberg A i De Waard M** (2008). "The S218L familial hemiplegic migraine mutation promotes de/inhibition of Ca(v)2.1 calcium channels during direct G-protein regulation." Pflugers Arch 457(2): 315-326.
- Wessman M, Kallela M, Kaunisto MA, Marttila P, Sobel E, Hartiala J, et al.** (2002). "A susceptibility locus for migraine with aura, on chromosome 4q24." Am J Hum Genet 70(3): 652-662.
- Wessman M, Terwindt GM, Kaunisto MA, Palotie A i Ophoff RA** (2007). "Migraine: a complex genetic disorder." Lancet Neurol 6(6): 521-532.
- WHO** (2008). Global burden of disease 2004 Summary tables informatics, H.s.a. Geneva.
- Wieser T, Pascual J, Oterino A, Soso M, Barmada M i Gardner KL** (2010). "A novel locus for familial migraine on Xp22." Headache 50(6): 955-962.
- Winter AC, Hoffmann W, Meisinger C, Evers S, Vennemann M, Pfaffenrath V, et al.** (2011). "Association between lifestyle factors and headache." J Headache Pain.
- Wood H** (2010). "Migraine: Familial migraine with aura is associated with a mutation in the TRESK potassium channel." Nat Rev Neurol 6(12): 643.

- Xu G, Farley RA, Kane DJ i Faller LD** (2003). "Site-directed mutagenesis of amino acids in the cytoplasmic loop 6/7 of Na,K-ATPase." Ann N Y Acad Sci 986: 96-100.
- Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, et al.** (2002). "TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel." Nature 418(6894): 181-186.
- Yabe I, Kitagawa M, Suzuki Y, Fujiwara K, Wada T, Tsubuku T, et al.** (2008). "Downbeat positioning nystagmus is a common clinical feature despite variable phenotypes in an FHM1 family." J Neurol 255(10): 1541-1544.
- Yu FH, Mantegazza M, Westenbroek RE, Robbins CA, Kalume F, Burton KA, et al.** (2006). "Reduced sodium current in GABAergic interneurons in a mouse model of severe myoclonic epilepsy in infancy." Nat Neurosci 9(9): 1142-1149.
- Zagranichnaya TK, Wu X i Villereal ML** (2005). "Endogenous TRPC1, TRPC3, and TRPC7 proteins combine to form native store-operated channels in HEK-293 cells." J Biol Chem 280(33): 29559-29569.
- Zangaladze A, Asadi-Pooya AA, Ashkenazi A i Sperling MR** (2010). "Sporadic hemiplegic migraine and epilepsy associated with CACNA1A gene mutation." Epilepsy Behav 17(2): 293-295.
- Zhang F, Gu W, Hurles ME i Lupski JR** (2009). "Copy number variation in human health, disease, and evolution." Annu Rev Genomics Hum Genet 10: 451-481.
- Zhang X, Levy D, Kainz V, Nosedá R, Jakubowski M i Burstein R** (2011). "Activation of central trigeminovascular neurons by cortical spreading depression." Ann Neurol 69(5): 855-865.
- Zhang X, Levy D, Nosedá R, Kainz V, Jakubowski M i Burstein R** (2010). "Activation of meningeal nociceptors by cortical spreading depression: implications for migraine with aura." J Neurosci 30(26): 8807-8814.
- Zondervan KT i Cardon LR** (2004). "The complex interplay among factors that influence allelic association." Nat Rev Genet 5(2): 89-100.
- Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, et al.** (1999). "Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide." Nature 400(6743): 452-457.